

Université de Montréal

**Mécanismes moléculaires d'activation du récepteur A des
peptides natriurétiques**

Par
Marie Parat

Département de Pharmacologie
Faculté de Médecine

Thèse présentée à la Faculté des études supérieures
En vue de l'obtention du grade de
Philosophiae Doctor (Ph. D.)
En Pharmacologie

Aout 2009

© Marie Parat, 2009

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Cette thèse intitulée :

**Mécanismes moléculaires d'activation du récepteur A des
peptides natriurétiques**

Présentée par :
Marie Parat

A été évaluée par un jury composé des personnes suivantes :

Dr. Jean François Gauchat, président rapporteur

Dr. André De Léan, directeur de recherche

Dr. Audrey Claing, membre du jury

Dr. Emanuel Escher, examinateur externe

Résumé

Le récepteur A des peptides natriurétiques (NPRA) fait partie de la famille des guanylates cyclases membranaires. L'activation du NPRA par ses agonistes naturels, ANP et BNP, induit une production de GMPc qui est responsable de leur rôle dans l'homéostasie cardiovasculaire, l'inhibition de l'hypertrophie et de la fibrose cardiaques et la régulation de la lipolyse. Le NPRA est un homodimère non covalent composé d'un domaine extracellulaire de liaison du ligand (ECD), d'un unique domaine transmembranaire (TM), d'un domaine d'homologie aux kinases et d'un domaine guanylate cyclase. Bien que le NPRA ait un rôle physiologique important, les mécanismes moléculaires régissant son processus d'activation restent inconnus. Nous avons donc analysé les premières étapes du processus d'activation du NPRA. Nous avons d'abord étudié le rôle de la dimérisation des ECD dans l'activation du récepteur. Nous avons utilisé les techniques de liaison de radioligand, de FRET et de modélisation moléculaire, pour caractériser la liaison à l'ECD des agonistes naturels, d'un superagoniste et d'un antagoniste. L'ANP se lie à un dimère d'ECD préformé et la dimérisation spontanée est l'étape limitante du processus de liaison. De plus, comme le démontrent nos études de FRET, tous les peptides, incluant l'antagoniste, stabilisent le récepteur sous sa forme dimérique. Cependant, l'antagoniste A71915 stabilise le dimère d'ECD dans une conformation différente de celle induite par l'ANP. La dimérisation du NPRA semble donc nécessaire, mais non suffisante à l'activation du récepteur. L'état d'activation du NPRA dépend plutôt de l'orientation des sous unités dans le dimère. Nous avons ensuite étudié le mécanisme moléculaire de transduction du signal à travers la membrane. Plusieurs études ont suggéré que l'activation du NPRA implique un changement de conformation du domaine juxtamembranaire (JM). Cependant, les études de cristallographie de l'ECD soluble de NPRA n'ont pas permis de documenter la structure du JM et le changement de conformation impliqué dans la transduction du signal reste inconnu. Pour analyser ce changement de conformation, nous avons d'abord séquentiellement substitué les neuf acides aminés du JM par une cystéine. En étudiant la capacité des mutants à former des dimères covalents de façon constitutive ou induite par l'ANP, nous avons pu évaluer la proximité relative des résidus du JM, avant et après activation du NPRA. Ces résultats ont démontré la proximité élevée de certains résidus spécifiques et sont

en contradiction avec les données cristallographiques. Nous avons également démontré que le domaine intracellulaire impose une contrainte conformationnelle au JM à l'état de base, qui est levée après liaison de l'ANP. En introduisant de 1 à 5 alanines dans l'hélice- α transmembranaire, nous avons montré qu'une rotation des TM de 40° induit une activation constitutive du NPRA. Le signal d'activation pourrait donc être transmis à travers la membrane par un mécanisme de rotation des TM. En utilisant nos données expérimentales, nous avons généré le premier modèle moléculaire illustrant la conformation active du NPRA, où les domaines JM et TM sont représentés. Dans son ensemble, cette étude apporte une meilleure compréhension des mécanismes moléculaires régissant les premières étapes du processus complexe d'activation du NPRA

Mots-clés : Guanylate cyclase, transduction du signal, changement de conformation, dimérisation, rotation, balayage de cystéine, FRET.

Abstract

Natriuretic peptide receptor-A (NPRA) is a member of the particulate guanylate cyclase family. NPRA activation by natural agonists, ANP and BNP, leads to cGMP production, which is responsible for their role in cardiovascular homeostasis, cardiac hypertrophy and fibrosis inhibition and lipolysis regulation. NPRA is a non covalent dimer composed of an extracellular domain (ECD) with a ligand binding site, a single transmembrane region (TM), a kinase homology domain, and a guanylyl cyclase domain. Although NPRA plays an important physiologic role, molecular mechanisms driving its activation process are yet unknown. We thus analysed the first steps of NPRA's activation process. First, we studied the role of ECD dimerization in receptor activation and determined the sequential steps of this dimerization process. We used radioligand binding, FRET and molecular modeling to characterize the interaction of ECD with natural agonists, a superagonist and an antagonist. ANP binds to preformed ECD dimers and spontaneous dimerization is the rate-limiting step of the ligand binding process. Furthermore, like demonstrated with fluorescence homoquenching, all the studied peptides, including A71915 antagonist, stabilize a dimeric form of the receptor. However, A71915 stabilizes the ECD dimer in a conformation distinct from those induced by ANP. Thus, ECD dimerization is necessary but not sufficient for NPRA activation. The activation state of NPRA seems to depend on the orientation of the receptor subunits within the dimer. Then, we tried to identify the molecular mechanism of signal transduction through the plasma membrane. Previous studies have shown that activation of NPRA involves a conformational change of the juxtamembrane domain (JM). However, crystallographic study of the soluble ECD of NPRA has failed to document JM structure, and the conformational change involved in transmembrane signal transduction is still unknown. To analyse this conformational change, we first sequentially substituted nine amino acids of JM by a cysteine residue. By studying the mutant's capacity to form ANP-induced or constitutive covalent disulfide dimers, we evaluated the relative proximity of JM residues, before and after NPRA activation. These results demonstrate a high proximity of specific JM residues and are in disagreement with crystallography data. We also demonstrated that intracellular

domain imposes a conformational constraint on JM at basal state, which becomes relaxed upon ANP binding. We finally confirmed, with a full-length receptor, that A71915 stabilizes NPRA in a dimeric form where JM are in a conformation distinct from the basal state. By introducing 1 to 5 alanine residues in the transmembrane α -helix, we showed that a TM rotation of 40° leads to constitutive NPRA activation. Activation signal could thus be transmitted through the membrane by a TM rotation mechanism. We finally studied the role of the TM in NPRA dimerization. By using the ToxR system, we demonstrated that the last JM residues are required to stabilize the TM dimer. Using these experimental data, we generated the first molecular model illustrating the active conformation of NPRA, where JM and TM are depicted. In summary, this study allows a better understanding of molecular mechanisms driving the first steps of NPRA's complex activation process.

Keywords : Guanylate cyclase, signal transduction, conformational change, dimerization, rotation, cysteine-scanning, FRET.

Table des matières

Résumé.....	iii
Table des matières	vii
Liste des figures	xiii
Liste des abréviations	xvi
Remerciements	xxi
PREMIÈRE PARTIE : REVUE DE LA LITTÉRATURE	1
<u>CHAPITRE 1 : Les peptides natriurétiques</u>	2
A. <u>Le peptide natriurétique de l'oreillette</u>	4
1. Biosynthèse et structure	4
2. Régulation de l'expression	6
B. <u>Le peptide natriurétique de type B</u>	8
1. Biosynthèse et structure	8
C. <u>Le peptide natriurétique de type C</u>	11
1. Biosynthèse et structure	11
2. Régulation de l'expression	13
D. <u>Les autres membres de la famille des peptides natriurétiques</u>	13
1. L'urodilatine	13
2. Le peptide natriurétique de type Dendroaspis.....	14
3. La guanyline, l'uroguanyline et les endotoxines bactériennes ST....	14
4. L'ostéocrine (Muscline).....	15
E. <u>Inactivation des peptides natriurétiques</u>	16
<u>CHAPITRE 2 : Les récepteurs des peptides natriurétiques et la famille des</u> <u>guanylates cyclases.</u>	19
A. <u>La guanylate cyclase soluble</u>	20
B. <u>Les guanylates cyclases membranaires</u>	24
1. Les récepteurs des peptides natriurétiques	25
1.1. <u>Le récepteur A des peptides natriurétiques</u>	27
1.1.1. <i>Expression</i>	27
1.1.2. <i>Structure et fonction des différents domaines</i>	28
1.2. <u>Le récepteur B des peptides natriurétiques</u>	41
1.2.1. <i>Expression</i>	41

1.2.2. <i>Structure</i>	42
1.3. <u>Le récepteur C des peptides natriurétiques</u>	44
1.3.1. <i>Expression</i>	44
1.3.2. <i>Structure</i>	44
1.4. <u>Désensibilisation du NPRA et du NPRB</u>	47
1.5.1 <i>Désensibilisation homologue</i>	47
1.5.2 <i>Désensibilisation hétérologue</i>	47
1.5.3 <i>Kinases et phosphatases des récepteurs aux peptides natriurétiques</i>	49
1.5. <u>Mécanisme d'activation du NPRA</u>	51
1.6. <u>Internalisation des récepteurs aux peptides natriurétiques</u>	52
1.7. <u>Protéines d'interactions</u>	54
1.8. <u>Agonistes et antagonistes spécifiques</u>	55
2. La guanylate cyclase C	57
3. La guanylate cyclase D	58
4. Les guanylates cyclases E et F	59
5. La guanylate cyclase G.....	62
<u>CHAPITRE 3 : Les effets physiologiques des peptides natriurétiques.</u>	63
A. <u>Les effecteurs du GMPc</u>	64
1. Les protéines kinases sensibles au GMPc.....	65
2. Les phosphodiesterases	67
3. Les canaux ioniques sensibles au GMPc.....	68
B. <u>Fonctions physiologiques régulées par le NPRA</u>	69
1. Régulation de la natriurèse et de la diurèse	70
2. Régulation du tonus vasculaire	71
3. Régulation de la perméabilité endothéliale et du volume intravasculaire	73
4. Régulation du système rénine-aldostérone.....	75
5. Régulation de l'hypertrophie cardiaque et la fibrose.....	77
6. Régulation du métabolisme des lipides	79
7. Autres effets physiologiques régulés par le NPRA	82
C. <u>Les fonctions physiologiques régulées par le NPRB</u>	84
1. Fonctions cardiovasculaires.....	84

1.1	<u>Effets sur le tonus vasculaire</u>	85
1.2	<u>Effets sur le remodelage vasculaire</u>	86
1.3	<u>Effets sur l'hypertrophie et le remodelage cardiaques</u>	87
1.4	<u>Effets sur le système nerveux autonome</u>	89
2.	Régulation de la croissance osseuse	89
D.	<u>Fonctions physiologiques régulées par le NPRC</u>	93
E.	<u>Contribution génétique du système des peptides natriurétiques aux maladies cardiovasculaires.</u>	95
	<u>CHAPITRE 4 : Applications thérapeutiques des peptides natriurétiques</u>	97
A.	<u>ANP (Carperitide)</u>	98
B.	<u>BNP (Nesiritide)</u>	98
C.	<u>Autres peptides natriurétiques</u>	100
	<u>CHAPITRE 5 : Problématiques</u>	104
	DEUXIEME PARTIE : PRÉSENTATION DES ARTICLES	108
	<u>CHAPITRE 6 : Role of Extracellular Domain Dimerization in Agonist-Induced Activation of Natriuretic Peptide Receptor A</u>	109
	<u>Abstract</u>	110
	<u>Introduction</u>	112
	<u>Materials and Methods</u>	114
	Materials	114
	Construction of Soluble hNPRA-ECD WT and C423S Mutant	114
	Transfection of Sf9 Insect Cells	114
	Titration of Recombinant Baculovirus by Expression in Sf9 Cells	115
	Expression of hNPRA-ECD^{WT} and hNPRA-ECD^{C423S} Mutant in Sf9 Cells	115
	Purification of hNPRA-ECD	116
	Electrophoresis and Immunoblot Analysis	116
	Radioligand Binding Assays	117
	Labeling of Mutant at the Cys432 with Fluorescent Probe	117
	Measurement of ECD Dimerization by FRET Homotransfer	118
	Molecular Modeling of NP-hNPRA-ECD	118
	Data Analysis and Statistics	119
	<u>Results</u>	121

Characterization of Soluble hNPRA-ECD WT and C423S Mutant.....	121
Equilibrium Binding and Kinetics of ANP on NPRAECD WT and C423S Mutant	122
Specificity of Binding for Natriuretic Peptide Agonists and Antagonist	123
Dimerization of ECDWT	124
Molecular Modeling of NP-NPRA-ECD Complex	126
<u>Discussion</u>	128
<u>References</u>	132
<u>CHAPITRE 7: Role of Juxtamembrane and Transmembrane Domains in the Mechanism of Natriuretic Peptide Receptor A Activation</u>	147
<u>Abbreviations</u>	148
<u>Abstract</u>	149
<u>Introduction</u>	150
<u>Materials and Methods</u>	152
<i>Construction of NPRA Mutants.</i>	152
<i>Cell Culture.</i>	152
<i>Stable Expression in Flp-In-293 cells.</i>	153
<i>Transient Expression in HEK293 Cells.</i>	153
<i>Dimerization Assay.</i>	153
<i>Membrane Preparations.</i>	153
<i>Immunoblot Analysis.</i>	154
<i>Whole Cell Guanylyl Cyclase Stimulation.</i>	154
<i>Construction of the ToxR Chimeras.</i>	155
<i>In Vivo Detection of TM Homodimerization.</i>	155
<i>ToxR Chimera Protein Expression Levels.</i>	155
<i>Maltose Complementation Assay.</i>	156
<i>Molecular Modeling of ECD and TM of NPRA in an Active Conformation.</i>	156
<i>Data Analysis and Statistics.</i>	157
<u>Results</u>	157
Evaluation of the Relative Proximity of the JM Residues within the NPRA Dimer.	157
Dimerization Is Necessary but Not Sufficient for NPRA activation.	158

The Intracellular Domain Imposes a Conformational Constraint on the JM in the Basal State.	160
Constitutive NPRA Activation by Relative Subunit Rotation.	160
The Last Residues of the JM Stabilize the NPRA TM Dimer.	161
Active Conformational Model of NPRA.	162
<u>Discussion</u>	163
<u>Acknowledgement</u>	167
<u>References</u>	168
TROISIÈME PARTIE : DISCUSSION ET CONCLUSION	183
A. <u>Discussion</u>	184
1. Rôle de la dimérisation du domaine extracellulaire dans l'activation du NPRA	184
2. Rôle du domaine juxtamembranaire dans la transduction du signal induit par l'ANP	192
B. <u>Conclusion</u>	201
Références	204

Liste des tableaux

Tableau 1.1 : Importants régulateurs du gène du BNP.	10
Tableau 2.1 : Expression tissulaire des récepteurs aux peptides natriurétiques.	27
Tableau 3.1 : Altérations des gènes codant pour les guanylates cyclases membranaires, leurs ligands et certains éléments de leurs voies de signalisation, dans des modèles de souris.	64
Tableau 3.2 : Propriétés structurales, biochimiques et fonctionnelles des phosphodiesterases de mammifères.....	68
Tableau 4.1 : Effets bénéfiques et délétères du Néséritide dans le système cardiovasculaire et rénal.	100
Tableau 6.1 : Kinetic parameters of [¹²⁵ I]ANP binding to hNPRA-ECD.....	136
Tableau 6.2 : IC ₅₀ for competition curves and FRET homotransfer	137
Tableau 6.3 : Residues interactions in the peptide-bound hNPRA-ECD complexes	138

Liste des figures

Figure 1.1 : Alignement des séquences en acides aminés des peptides natriurétiques et de leurs homologues.	3
Figure 1.2 : Structure en boucle des peptides natriurétiques.	4
Figure 1.3 : Expression et maturation des peptides natriurétiques.	6
Figure 1.4 : Représentation schématique du promoteur proximal du gène de l'ANP. 7	
Figure 1.5 : Représentation schématique du promoteur du gène du BNP.	9
Figure 1.6 : Dégradation des peptides natriurétiques par les peptidases.	18
Figure 2.1 : Structure et activation de la guanylate cyclase soluble.	21
Figure 2.2 : Mécanisme catalytique de la guanylate cyclase soluble.	22
Figure 2.3 : Structure cristalline du domaine catalytique de la guanylate cyclase d'algue verte <i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	23
Figure 2.4 : Topologie générale des guanylates cyclases membranaires et leurs activateurs.	24
Figure 2.5 : Structure des récepteurs aux peptides natriurétiques et spécificité de liaison des peptides.	25
Figure 2.6. : Représentation schématique du promoteur du gène du NPRA.	27
Figure 2.7 : Structure cristalline de l'ECD de NPRA sans son ligand.	30
Figure 2.8 : Cristal de l'ECD de NPRA complexé ou non à l'ANP.	31
Figure 2.9 : Changement de conformation de l'ECD induit par l'ANP.	34
Figure 2.10 : Mécanisme de rotation des domaines extracellulaires du NPRA induit par l'ANP.	34
Figure 2.11 : Modèle structural du domaine KHD de NPRA.	36
Figure 2.12 : Sites de phosphorylation dans le KHD de NPRA.	38
Figure 2.13 : Modèle de la structure en hélice enroulée du domaine de dimérisation de GC-E.	39
Figure 2.14 : Modèle structural du domaine guanylate cyclase de NPRA.	41
Figure 2.15 : Sites de phosphorylation dans le KHD de NPRB.	43
Figure 2.16 : Structures cristallines du NPRC non lié et en complexe avec le CNP. 45	
Figure 2.17 : Modèle hypothétique d'activation et de désensibilisation du NPRA. .	52
Figure 2.18 : Agonistes et antagonistes synthétiques des récepteurs aux peptides natriurétiques.	55

Figure 2.19 : Régulation de la sécrétion intestinale par la guanylate cyclase GC-C.	58
Figure 2.20 : Transduction olfactive dans les cils des neurones olfactifs : rôle de la GC-D.	59
Figure 2.21 : Phototransduction dans les bâtonnets de la rétine : rôle des guanylates cyclases GC-E et F.	61
Figure 3.1 : Les effecteurs du GMPc.	65
Figure 3.2 : Structure des protéines kinase GMPc-dépendantes.	66
Figure 3.3 : Les canaux ioniques sensibles aux nucléotides cycliques	69
Figure 3.4 : Processus physiologiques régulés par le système ANP/BNP/NPRA.	70
Figure 3.5 : Effets de l'ANP sur le rein.	71
Figure 3.6 : Relaxation du muscle vasculaire lisse dépendante des peptides natriurétiques.	73
Figure 3.7 : Effet de l'ANP sur la production d'aldostérone par les glandes surrénales.	76
Figure 3.8 : Stimulation de la lipolyse par les peptides natriurétiques dans les adipocytes humains.	82
Figure 3.9 : Fonctions cardiovasculaires du système CNP/NPRB.	84
Figure 3.10 : Représentation schématique de l'ossification endochondrale.	90
Figure 3.11 : Régulation de la croissance endochondrale par le CNP.	92
Figure 3.12 : Voies de signalisation du NPRC.	95
Figure 5.1 : Processus de dimérisation du GHR.	105
Figure 6.1 : Coomassie staining of purified hNPRA-ECD WT and C423S.	140
Figure 6.2 : Association (A) and dissociation (B) kinetics for ANP.	141
Figure 6.3 : Competition curves for peptides.	142
Figure 6.4 : Inhibition of ANP-induced homo-FRET by addition of excess WT.	143
Figure 6.5 : Dose-response curves of peptides on FRET homotransfer.	144
Figure 6.6 : Model for binding of ANP (A), BANP (B), and A71915 (C) to hNPRA-ECD dimer.	145
Figure 6.7 : Schematic model for ANP binding to hNPRA-ECD homodimer.	146
Figure 7.1 : Covalent dimerization of NPRA cysteine mutants.	174
Figure 7.2 : Guanylyl cyclase activity of NPRA cysteine mutants.	176
Figure 7.3 : Effect of A71915 antagonist on the covalent dimerization of NPRA cysteine mutants.	176

Figure 7.4 : Covalent dimerization of NPRA cysteine mutants lacking their ICD.	177
Figure 7.5 : Effect of subunits rotation on NPRA guanylyl cyclase activity.	178
Figure 7.6 : Homodimerization of NPRA TM domains.	179
Figure 7.7 : Model of the active conformation of NPRA ECD and TM.	181
Figure 8.1 : Mécanismes potentiels de transduction du signal des récepteurs à 1 passage transmembranaire.	193

Liste des abréviations

- A71915 : Antagoniste compétitif du NPRA
- ABDH5 : α/β -hydrolase domain-containing protein 5
- ACE : Enzyme de conversion de l'angiotensine
- ACTH : Corticotropine
- ADP : Adénosine diphosphate
- AMPc : Adénosine monophosphate cyclique
- AMPc-RE : Élément de réponse à l'AMPc
- Ang II : Angiotensine II
- ANP : Peptide natriurétique de l'oreillette
- AP-1 : Activator protein 1
- AP-2 : Activator protein 2
- ATGL : Lipase des triglycérides adipeux
- ATP : Adénosine triphosphate
- AVP : Arginine-vasopressine ou hormone diurétique
- BANP : ou pBNP1, superagoniste du NPRA
- BFGF : Facteur de croissance basique des fibroblastes
- BiFC : Complémentation de fluorescence bimoléculaire
- BK_{Ca} : Canal potassique calcium dépendant
- BNP : Peptide natriurétique de type B
- BRET : Bioluminescence resonance energy transfer
- CAII : Carbohydrase II
- CaM : Calmoduline
- CaMKII : protéine kinase calcium/calmoduline dépendante de type II
- C-ANP : ANP (4-23) de rat, agoniste spécifique du NPRC
- CD-NP : peptide chimérique qui combine la structure en anneau et l'extrémité exocyclique N-terminale du CNP et l'extrémité exocyclique C-terminale de 15 acides aminés du DNP
- CFTR : Canal régulateur de la conductance transmembranaire de la fibrose kystique
- CNBD : Domaine de liaison aux nucléotides cycliques
- CNG : Canal ionique sensible aux nucléotides cycliques
- CNP : Peptide natriurétique de type C

CO : Monoxyde de carbone
CRE : Élément de réponse à l'AMPc
CREB : Protéine de liaison à l'élément de réponse à l'AMPc
DNP : Peptide natriurétique de type Dendroaspis
DPP-IV : Dipeptidyl peptidase IV
ECD : Domaine extracellulaire
EGF : Facteur de croissance épidermique
EGFR : Récepteur du facteur de croissance épidermique
EMP1 : Agoniste mimétique de l'EpoR
eNOS : NO synthase endothéliale
Epo : Érythropoïétine
EpoR : Récepteur de l'érythropoïétine
ErbB2 : Epidermal growth factor receptor-related protein B2
ERK : Extracellular signal regulated kinase
ET : Endotheline
FGF : Facteur de croissance des fibroblastes
FGFR : Récepteur du facteur de croissance des fibroblastes
FRET : Fluorescence resonance energy transfer
GC : Guanylate cyclase
GCAP : Protéine activatrice de la guanylate cyclase
GCm : Guanylate cyclase membranaire
GCs : Guanylate cyclase soluble
GH : Hormone de croissance
GHR : Récepteur de l'hormone de croissance
GMPc : Guanosine monophosphate cyclique
GRE : Élément de réponse aux glucocorticoïdes
GTP : Guanosine triphosphate
GSK3 β : kinase de la glycogène synthase 3 β
HCK : Kinase des cellules hématopoïétiques
HEK : Cellules embryonnaires de rein humain
HIF-1 : Hypoxia inducible factor 1
HRE : Élément de réponse à l'hypoxie
HS-142-1 : Antagoniste allotypique du NPRA et du NPRB

HSP : Heat shock protein
HSL : Lipase hormone-sensible
IC : Insuffisance cardiaque
IGF-1 : Facteur de croissance apparenté à l'insuline
IGF-1R : Récepteur de l'IGF-1
IL : Interleukine
iNOS : NO synthase inductible
IP3 : Inositol-1,4,5-triphosphate
IP3R1 : Récepteur de l'IP3
IR : Récepteur de l'insuline
IRAG : IP3R-associated cGMP kinase substrate
IV : Intraveineuse
JAK : Janus kinase
JM : Domaine juxtamembranaire
KHD : Domaine d'homologie aux kinases
LDL : Lipoprotéine de faible densité
M372049 : Antagoniste spécifique du NPRC
MCAT : Site de liaison muscle-CAT
MAPK : Protéine kinase activée par les agents mitogènes
MGL : Lipase des monoglycérides
MKK : MAPK kinase
MLCP : Phosphatase de la chaîne légère de la myosine
MMP : Métalloprotéase de la matrice
NEFA : Acides gras non estérifiés
NEP : Endopeptidase neutre
N-FAT : Facteur nucléaire des lymphocytes T activés
NF- κ B : Nuclear factor kappa B
NKE : Élément de réponse NK-Homebox
NO : Monoxyde d'azote
NPR : Récepteur des peptides natriurétiques
Ostn : Ostéocrine
pBNP32 : BNP de porc
PDE : Phosphodiesterase

PDGF : Facteur de croissance dérivé des plaquettes
PI : Phosphatidylinositol
PI3K : Phosphatidylinositol-3 kinase
PKA : Protéine kinase dépendante de l'AMPc
PKC : Protéine kinase C
PKG : Protéine kinase dépendante du GMPc
PLC : Phospholipase C
PMA : Phorbol 12-myristate 13-acétate
PP5 : Protéine phosphatase 5
PPi : Pyrophosphate
RAAS : Système rénine angiotensine-aldostérone
Rec : Recoverine
RET : Transfert d'énergie de résonance
Rh : Rhodopsine
RK : Rhodopsine kinase
SERCA : Calcium/ATPase du réticulum sarcoplasmique
SRE : Élément de réponse au sérum
SSRE : Élément de réponse aux forces de cisaillement
ST : Entérotoxine stable
TBE : Élément de réponse TBox
TGF- β : Transforming growth factor beta
TM : Domaine transmembranaire
TNF- α : Tumor necrosis factor alpha
TR : Transducine
TRE : Élément de réponse au TPA
TSF1 : TGF-beta stimulated factor 1
Uro : Uroguanyline
VEGF : Facteur de croissance de l'endothélium vasculaire

À la mémoire de Robert
À la mémoire de mon grand-père chéri

‘La science consiste à passer d’un étonnement à un autre.’

Aristote

Remerciements

En premier lieu, je tiens à adresser mes plus sincères remerciements à mon directeur de recherche, le Dr André De Léan, professeur émérite du département de pharmacologie de l'Université de Montréal, pour son accueil chaleureux dans son laboratoire et son soutien indéfectible tout au long de mon parcours, dans les bons moments comme dans les plus difficiles. Je le remercie pour m'avoir fait partager sa vision de la recherche, pour sa disponibilité et ses précieux conseils.

Je remercie tout particulièrement Normand McNicoll, qui toujours été disponible pour me faire profiter de sa longue expérience dans le domaine des peptides natriurétiques, ce fut réellement un plaisir de travailler en sa compagnie.

Je voudrais ensuite remercier chaleureusement mes parents qui assument courageusement cette longue séparation de leur fille unique et sans qui la réalisation de ce rêve n'aurait jamais été possible. Je les remercie de leurs encouragements et de leur confiance sans limites dans le succès de mon projet. Il n'y a pas de plus grande satisfaction pour moi que de lire de la fierté dans leurs yeux.

Je remercie ma famille et mes amis, qui sont restés présents pour moi malgré l'éloignement et tout particulièrement mes grands-parents qui n'ont jamais cessé de m'encourager même quand ils ont eu à traverser des moments très difficiles.

Je tiens également à remercier la famille Joubert qui a rendu mon expérience culturelle québécoise si agréable, pour les bons moments passés en leur compagnie, ils ont grandement contribué à l'accomplissement de ce travail.

Je suis heureuse de remercier Simon, rencontré dès le début de ce long voyage qu'a été mon doctorat, je le remercie de son appui, de sa générosité et de son enthousiasme à toute épreuve.

Enfin, je remercie les membres de mon jury, le Dre Audrey Claing, le Dr Jean-François Gauchat et le Dr Emanuel Escher d'avoir accepté d'évaluer mon travail.

**PREMIÈRE PARTIE : REVUE DE LA
LITTÉRATURE**

CHAPITRE 1 : Les peptides natriurétiques

En 1956, deux publications sans aucun lien apparent pavaient la voie de la découverte des peptides natriurétiques. Kirsch observait que les cellules de l'oreillette, contrairement à celles du ventricule, contenaient un appareil de Golgi très développé, signe de la présence d'un système de sécrétion (Kisch 1956). Henry et ses collaborateurs découvraient quant à eux qu'une pression élevée dans l'oreillette gauche stimulait la production d'urine (Henry, Gauer et al. 1956; Henry and Pearce 1956). Les auteurs expliquaient alors ce phénomène par une inhibition réflexe de la sécrétion d'hormone antidiurétique. Il a fallu 25 années pour que le lien entre ces deux articles soit fait et que la connexion entre le cœur et le rein soit démontrée. En effet, en 1981, De Bold et ses collaborateurs ont montré que l'injection en intraveineuse (IV) d'homogénats de l'oreillette chez le rat, induisait une forte baisse de la pression sanguine, accompagnée d'une excrétion rénale de sodium et d'eau (de Bold, Borenstein et al. 1981). Suite à cette publication phare, plusieurs laboratoires ont purifié des peptides de différentes tailles à partir de tissus de l'oreillette, possédant à la fois une activité natriurétique et des propriétés vasodilatatrices (Flynn, de Bold et al. 1983; Currie, Geller et al. 1984; Kangawa, Tawaragi et al. 1984; Misono, Grammer et al. 1984). Plusieurs noms ont été donnés à ces molécules : facteur natriurétique auriculaire, cardionatine, cardiodilatine, atriopeptine et peptide natriurétique de l'oreillette (ANP), qui est le terme le plus utilisé aujourd'hui.

Quelques années plus tard, deux autres peptides apparentés à l'ANP, le peptide natriurétique de type B (BNP) et le peptide natriurétique de type C (CNP), ont été purifiés à partir d'extraits de cerveau de porc, sur la base de leur habilité à induire une relaxation du muscle lisse (Sudoh, Kangawa et al. 1988; Sudoh, Minamino et al. 1990).

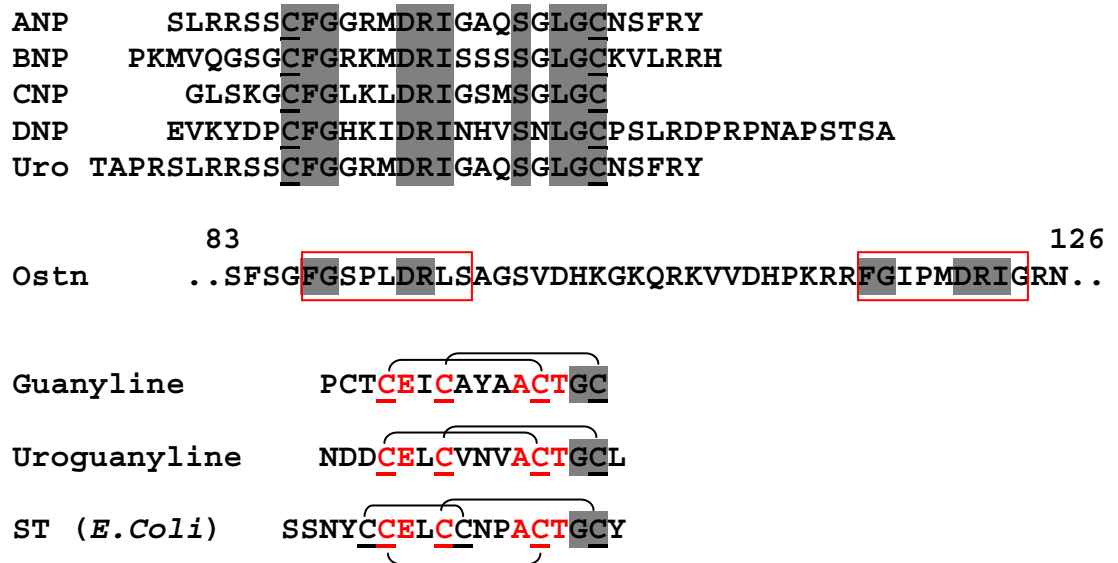


Figure 1.1 : Alignement des séquences en acides aminés des peptides natriurétiques (ANP, BNP, CNP, DNP et Urodilatine) et de leurs homologues (Ostéocrine, Guanyline, Uroguanyline et entérotoxine bactérienne ST). Les acides aminés conservés dans tous les peptides apparaissent en ombré, ceux conservés dans les peptides homologues, en rouge. Les cystéines impliquées dans la formation de ponts disulfures sont soulignées. Pour l'ostéocrine (Ostn), les 2 deux régions d'homologie aux peptides natriurétiques sont encadrées en rouge.

ANP, BNP et CNP, sont les membres de la famille des peptides natriurétiques qui ont été les plus étudiés. Une attention particulière leur sera accordée ici. Il existe cependant d'autres peptides apparentés aux peptides natriurétiques, qui partagent leurs propriétés structurales et/ou physiologiques. Ainsi, l'urodilatine, initialement purifiée à partir d'urine humaine, et plus récemment, le peptide natriurétique de type Dendroaspis (DNP), présent dans le venin de serpent, ont été ajoutés à cette famille de peptides (Schulz-Knappe, Forssmann et al. 1988; Schweitz, Vigne et al. 1992). Ces cinq peptides contiennent la séquence conservée **CFGXXXDRIXXSXLGC** ou X représente n'importe quel acide aminé (**Figure 1.1**). Ils partagent également la même structure en boucle de 17 acides aminés, maintenue par un pont disulfure et requise pour leur activité biologique (**Figure 1.2**).

Il existe enfin des peptides homologues aux peptides natriurétiques, qui ne montrent qu'une similarité limitée, en séquence et en structure, avec les peptides

natriurétiques (**Figure 1.1**). Ce sont l'ostéocrine, la guanyline, l'uroguanyline et l'entérotoxine bactérienne (ST) (Field, Graf et al. 1978; Currie, Fok et al. 1992; Hamra, Forte et al. 1993).

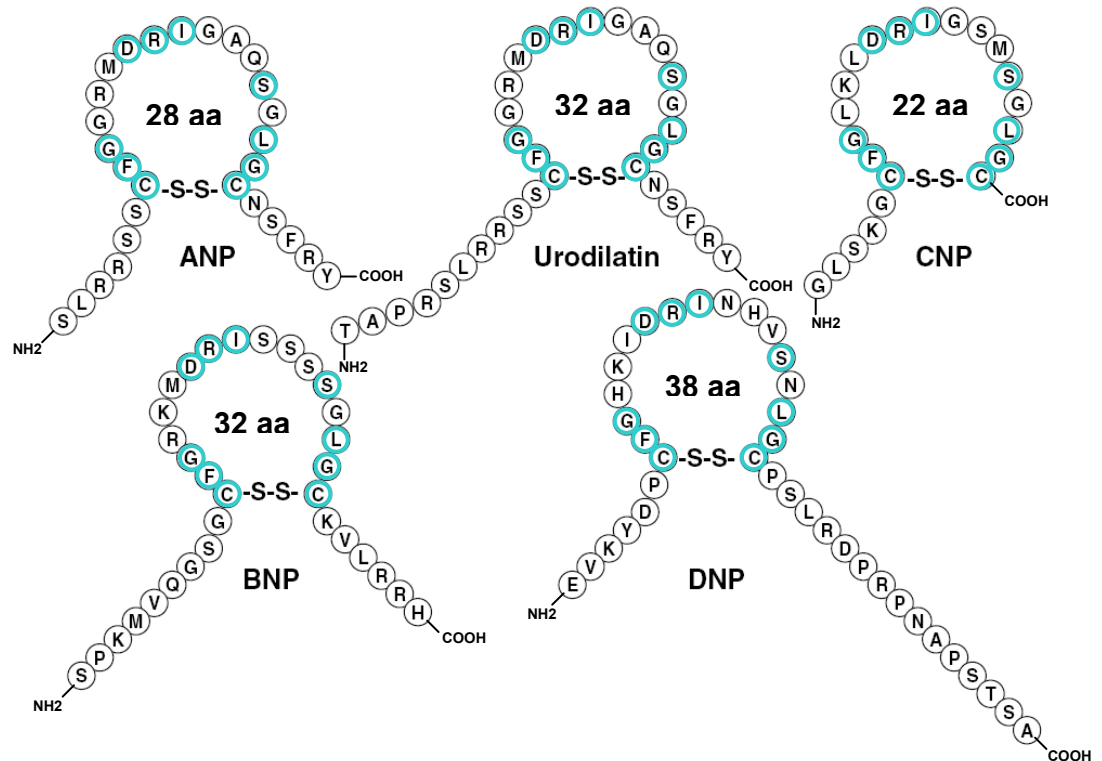


Figure 1.2 : Structure en boucle des peptides natriurétiques. Les acides aminés conservés sont entourés en bleu. Modifié de (Lee and Burnett 2007).

A. Le peptide natriurétique de l'oreillette

1. Biosynthèse et structure

Tous les peptides natriurétiques sont synthétisés sous forme de pré-pro-hormones (**Figure 1.3**). Le gène humain codant pour l'ANP, appelé *Nppa* (GeneID 4878) est localisé sur le chromosome 1p36.21. *Nppa* a une longueur approximative de 2 Kb et est formé de 3 exons et 2 introns. L'ARNm qui en résulte est traduit en un polypeptide de 151 acides aminés, appelé pré-pro-ANP. Les 25 premiers acides aminés constituent un peptide signal qui est clivé pour donner un peptide de 126 acides aminés appelé pro-ANP. C'est sous cette forme que l'ANP est stocké dans les granules de sécrétions des cardiomyocytes de l'oreillette (Potter, Yoder et al. 2009).

Une fois sécrété, le pro-ANP est rapidement clivé par la corine, une sérine protéase membranaire, pour former le peptide biologiquement actif de 28 acides aminés (**Figure 1.3**). La corine est hautement exprimée à la surface extracellulaire des cardiomyocytes de l'oreillette et est capable de cliver le pro-ANP en ANP biologiquement actif *in vitro* (Yan, Wu et al. 2000). De plus, les souris dont l'expression du gène de la corine a été inhibée montrent un niveau d'ANP pleinement maturé indétectable et sont hypertendues (Chan, Knudson et al. 2005). La délétion du gène *Nppa* chez la souris induit une hypertension marquée (John, Veress et al. 1996), alors que sa surexpression induit une hypotension artérielle (Steinhilper, Cochrane et al. 1990).

Comme tous les peptides natriurétiques, l'ANP possède une structure en boucle de 17 acides aminés, fermée par un pont disulfure, requise pour son activité biologique (Misono, Fukumi et al. 1984). Il possède également 2 extrémités exocycliques N- et C-terminales (**Figure 1.2**). La modification de l'extrémité exocyclique N-terminale de l'ANP n'a pas d'effet significatif sur son affinité pour son récepteur, ni sur son activité biologique. Par contre, la délétion de l'extrémité exocyclique C-terminale ou l'ajout de résidus arginine en C-terminal réduit de 1000 fois l'affinité et l'activité biologique de l'ANP (De Lean, Thibault et al. 1985; Garcia, Thibault et al. 1985).

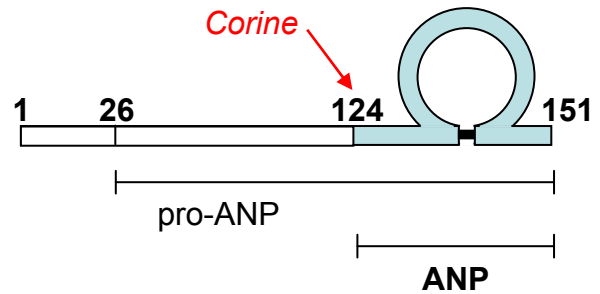
L'ANP est très conservé parmi les espèces. La forme mature de 28 acides aminés de l'ANP humain ne diffère que d'un acide aminé de celui du rat, et est identique à celui du chimpanzé, du chien, du cochon, du cheval et du mouton. De plus, la séquence entière du pré-pro-ANP est également très conservée chez les mammifères, avec 100, 86, 81 et 81 % d'homologie entre l'humain et le chimpanzé, le chien, la souris et le rat, respectivement (Potter, Yoder et al. 2009).

L'ANP est majoritairement exprimé et entreposé dans l'oreillette cardiaque, mais il est présent à des concentrations plus faibles dans d'autres tissus comme le ventricule, le rein, le tissu adipeux et le cerveau (**Figure 1.3**).

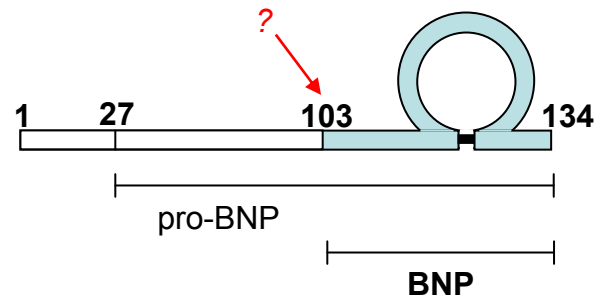
Expression

Maturation

Oreillette
Ventricule
Rein
Tissu adipeux
Cerveau



Ventricule
Oreillette
Cerveau



Os
Cerveau
Endothélium
Cœur

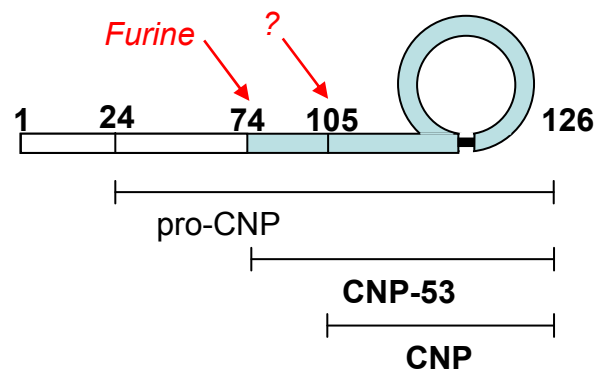


Figure 1.3 : Expression et maturation des peptides natriurétiques. ANP, BNP et CNP sont exprimés dans les tissus indiqués sous forme de pré-pro-hormones. Leurs peptides signaux sont ensuite clivés pour former des pro-hormones, qui seront à leur tour clivées par des protéases spécifiques pour former les peptides natriurétiques matures (colorés en bleu). Modifié de (Potter, Yoder et al. 2009).

2. Régulation de l'expression

L'ANP est sécrété selon un mode semi-constitutif: 60 % de l'ANP nouvellement synthétisé est stocké dans les myocytes alors que les 40 % restant sont sécrétés en absence de stimulation (Iida and Shibata 1994). Le stimulant principal de

la sécrétion de l'ANP est l'étirement de la paroi de l'oreillette causé par une augmentation du volume intravasculaire (Lang, Tholken et al. 1985; Edwards, Zimmerman et al. 1988). De plus, certaines hormones comme l'endothéline (ET) (Stasch, Hirth-Dietrich et al. 1989), l'angiotensine (Soualmia, Barthelemy et al. 1997) et l'arginine-vasopressine (AVP) (Lachance, Garcia et al. 1986), ainsi que les agonistes α - et β -adrénergiques (Schiebinger, Baker et al. 1987), stimulent la relâche d'ANP. L'immersion dans l'eau (Ogihara, Shima et al. 1986), la position couchée, l'ingestion massive de sel (Hollister, Tanaka et al. 1986) et l'exercice physique induisent également une augmentation des taux plasmatiques d'ANP (Evrard, Hober et al. 1999). La concentration plasmatique physiologique en ANP est de 10 fmol/mL approximativement. Cette concentration peut être multipliée de 10 à 30 fois chez les patients atteints d'insuffisance cardiaque congestive (Cody, Atlas et al. 1986; Mukoyama, Nakao et al. 1991).

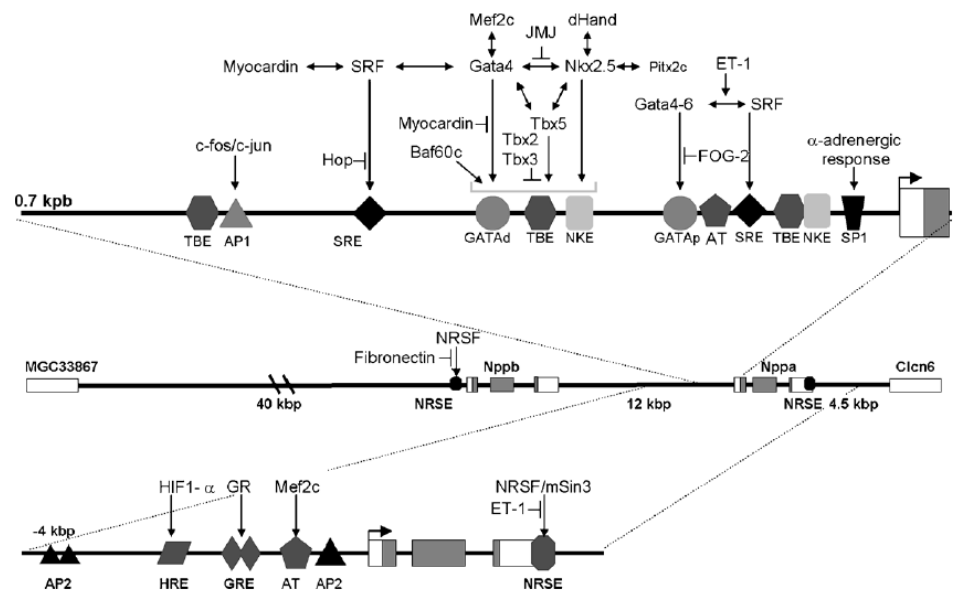


Figure 1.4 : Représentation schématique du promoteur proximal du gène de l'ANP (*Nppa*), du locus génomique contenant le gène *Nppa* et *Nppb* (gène du BNP) et les gènes voisins *Clcn6* et *MGC33867*. Les facteurs de transcriptions impliqués dans la régulation du gène *Nppa* et les éléments cis correspondants sont indiqués. La plupart des éléments montrés ont été d'abord identifiés dans le promoteur du gène *Nppa* de rat et sont conservés chez la souris et l'humain. D'après (Houweling, van Borren et al. 2005).

L'expression de l'ANP est également régulée au niveau transcriptionnel, par le promoteur de son gène (**Figure 1.4**). Les éléments de réponse GATA, TBE, NKE et SRE jouent un grand rôle dans la transcription basale du gène de l'ANP. Les facteurs de transcription de la famille GATA, en particulier GATA-4 et GATA-6, se lient sur deux sites de réponse GATA positionnés dans le promoteur proximal (-280 et -120). Le facteur NK-homeobox Nkx2-5 et le facteur T box Tbx5, qui jouent un rôle critique dans le développement cardiaque, se lient à l'élément de réponse NKE2 (-240) et aux sites TBE (-485, -252, -90), respectivement. Ces 2 facteurs sont capables de s'associer pour induire la transcription du gène. Enfin, le facteur de transcription Srf, exprimé dans les cellules cardiaques, squelettiques et du muscle lisse, se lie sur deux éléments de réponse au sérum (SRE) présents à moins de 700 pb du gène (Garg and Pandey 2005; Houweling, van Borren et al. 2005).

L'induction du gène *Nppa* est une caractéristique conservée de l'hypertrophie ventriculaire. Ce phénomène implique les facteurs de transcription c-fos/c-jun qui se lient directement sur l'élément de réponse AP-1 (-496 à -489). La transcription de *Nppa* est également induite par les glucocorticoïdes via 2 éléments de réponse aux glucocorticoïdes (GRE) et par les agonistes α -adrénergiques via les éléments de réponses SP-1, AP-1 et SRE. L'hypoxie induit la transcription du gène par activation du facteur de transcription HIF-1 qui se lie à l'élément de réponse à l'hypoxie (HRE). Enfin, l'ET-1, qui induit une hypertrophie *in vitro* dans les cellules atriales et ventriculaires, stimule aussi l'expression du gène *Nppa*. La réponse à l'ET-1 passe par l'activation des sites SRE et GATA situés tout prêt du gène (Garg and Pandey 2005; Houweling, van Borren et al. 2005).

B. Le peptide natriurétique de type B

1. Biosynthèse et structure

Le gène humain codant pour le BNP, *Nppb* (GeneID 4879) est localisé sur le chromosome 1p36.2. Comme *Nppa*, *Nppb* est composé de 3 exons et 2 introns. Le BNP est synthétisé sous forme de pré-pro-hormone, composé d'une séquence signal de 26 acides aminés, suivie par les 108 acides aminés constituant le pro-BNP. La peptidase qui clive le pro-BNP en BNP biologiquement actif n'a pas encore été

identifiée, mais la corine pourrait être impliquée (**Figure 1.3**) (Potter, Yoder et al. 2009). Le BNP biologiquement actif est composé de 32 acides aminés, formant une boucle de 17 aminés et 2 extrémités exocycliques N- et C-terminales (**Figure 1.2**). La délétion du gène *Nppb* chez la souris induit une fibrose cardiaque (Tamura, Ogawa et al. 2000), alors que sa surexpression induit une hypotension artérielle et une surcroissance osseuse (Ogawa, Itoh et al. 1994; Suda, Ogawa et al. 1998).

Contrairement au pré-pro-ANP, la séquence du pré-pro-BNP varie beaucoup parmi les mammifères, ce qui donne lieu à une différence de taille des BNP biologiquement actifs entre les espèces. Par exemple, chez l'humain et le cochon, le BNP circulant comprend 32 acides aminés alors qu'il comprend 45 acides aminés chez le rat et la souris (Potter, Yoder et al. 2009).

Bien qu'il ait d'abord été purifié à partir d'extrait de cerveau de porc, le BNP est présent en plus grande concentration dans le ventricule cardiaque (Mukoyama, Nakao et al. 1991). De faibles concentrations de BNP sont également stockées avec l'ANP dans des granules de sécrétions au niveau de l'oreillette, cependant 70% du BNP d'origine cardiaque provient du ventricule (Martinez-Rumayor, Richards et al. 2008). Le BNP est également retrouvé à de plus faibles concentrations dans le poumon, le rein et la glande surrénale.

2. Régulation de l'expression

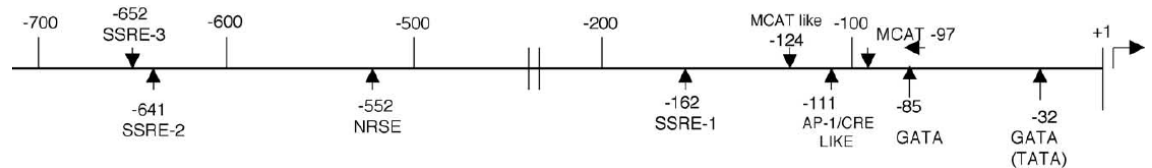


Figure 1.5 : Représentation schématique du promoteur du gène du BNP (*Nppb*). Les éléments *cis* sont indiqués. D'après (LaPointe 2005).

Dans le ventricule, le BNP n'est pas stocké dans des granules de sécrétion, mais plutôt transcrit au besoin en réponse à un étirement de la paroi, dû à une surcharge volumique. Le facteur de transcription nucléaire GATA-4 joue un rôle

important dans la régulation de ce processus (Grepin, Dagnino et al. 1994; Hanford, Thuerauf et al. 1994). La concentration plasmatique en BNP, chez un sujet sain, est très faible, 1 fmol/mL approximativement, soit $1/10^{\text{ième}}$ de la concentration en ANP. Par contre, la concentration plasmatique en BNP chez les patients atteints d'insuffisance cardiaque (IC) congestive est multipliée de 200 à 300 fois. Cette différence énorme entre les concentrations physiologique et pathologique de BNP en fait un marqueur idéal du stress cardiaque (Mukoyama, Nakao et al. 1991).

Stimulus	Effecteurs potentiels	Éléments <i>cis</i> régulateurs
Agoniste β-adrénergique	AMPc, Src, Rac, GSK3 β , CaMKII, PI3K	GATA (-85), MCAT (-97 et -124)
Interleukine-1β	Ras, Rac, p38 MAPK, PKC	MCAT (-97)
ET-1	Rac, Src	GATA, région entre -1818 et -408, TRE (-1000)
Stress	Activateurs de MKK6 et p38 MAPK	Site AP-1/CRE-like (-111)
Blessure ischémique	Inconnus	Région entre -408 et +100
Phényléphrine	Calcineurine	NF-AT (-927)
Hormone thyroïdienne (T₃)	Récepteur thyroïdien	TRE (-1000)
Étirement mécanique	p38 MAPK	SSRE (-652 à -633 et -162)

Tableau 1.1 : Importants régulateurs du gène du BNP. AP-1 : activating protein-1, CaMKII : protéine kinase calcium/calmoduline dépendante de type II, CRE : élément de réponse à l'AMPc, GSK3 β : glycogène synthase kinase-3 β , MAPK : protéine kinase activée par les agents mitogènes, MCAT : site de liaison muscle-CAT, MKK6 : MAPK kinase 6, NF-AT : facteur nucléaire des lymphocytes T activés, PI3K : phosphatidylinositol-3 kinase, PKC : protéine kinase C, SSRE : éléments de réponse au cisaillement, TRE : élément de réponse TPA. Modifié de (Martinez-Rumayor, Richards et al. 2008).

Le gène codant pour le BNP est localisé sur le même chromosome que le gène de l'ANP, à 8 Kb en amont. On ne sait cependant pas si cette proximité entre les 2 gènes permet leur régulation coordonnée. Le promoteur du gène *Nppb* chez l'humain contient plusieurs éléments *cis* régulateurs, comme les sites GATA, les sites MCAT et le site AP-1/CRE-like, tous connus pour être des éléments régulateurs spécifiques

au cœur (**Figure 1.5**). Ces éléments *cis* régulateurs sont les cibles moléculaires de différents stimuli, qui, par différentes voies de signalisation, mènent à la régulation basale et inductible du gène du BNP. Ces stimuli, répertoriés dans le **Tableau 1.1**, incluent l'étirement mécanique, la blessure ischémique et l'hypoxie, l'ET-1, l'Ang II, l'interleukine-1 β et les agonistes α -adrénergiques (phényléphrine) et β -adrénergiques. Le promoteur du BNP contient de multiples cibles pour une régulation positive de l'expression du gène, avec différentes voies de signalisation qui peuvent être activées par des stimuli pro-inflammatoires et hypertrophiques variés. Ceci est compatible avec la large gamme de pathologies connues pour augmenter les concentrations en BNP (Martinez-Rumayor, Richards et al. 2008).

La régulation de l'expression du BNP a majoritairement lieu au niveau transcriptionnel (Onuoha, Nicholls et al. 1998), contrairement à l'ANP, dont le mécanisme de sécrétion est également régulé. La majeure partie du BNP est synthétisée par salve en réponse aux stimuli physiologiques (Yasue, Yoshimura et al. 1994). La sécrétion de l'infime partie de BNP stocké dans les oreillettes fait également augmenter la synthèse du peptide (Bruneau and de Bold 1994).

C. Le peptide natriurétique de type C

1. Biosynthèse et structure

Contrairement à l'ANP et au BNP, le gène humain du CNP, *Nppc* (GeneID 4880), n'est pas localisé sur le chromosome 1, mais sur le chromosome 2q24-qter. De plus, *Nppc* n'est composé que de 2 exons et d'un intron. *Nppc* code pour une pré-pro-hormone de 126 acides aminés, avec une séquence signal de 23 acides aminés suivie du pro-CNP comprenant 103 acides aminés (Potter, Yoder et al. 2009). Le clivage du pro-CNP en CNP mature peut être accompli par une serine endoprotéase intracellulaire, appelée furine. *In vitro*, la furine clive le pro-CNP de 103 acides aminés en un peptide biologiquement actif de 53 acides aminés (Wu, Wu et al. 2003). Ce CNP de 53 acides aminés (CNP-53) est la forme active majoritaire du CNP dans les tissus (Brown, Chen et al. 1997). Il peut ensuite être clivé, par une protéase encore inconnue, pour donner un CNP de 22 acides aminés (CNP-22), qui est la forme active majoritaire dans la circulation systémique (**Figure 1.3**). Le CNP-22 est la forme la

plus abondante *in vivo*. On attribue donc la majorité des effets physiologiques au CNP-22 (Yeung, Ho et al. 1996). Les souris chez qui le gène *Nppc* a été inactivé ont une tension artérielle normale, mais souffrent d'un nanisme sévère et meurent prématurément à cause d'une mauvaise ossification endochondrale (Chusho, Tamura et al. 2001).

Le CNP possède également une structure en boucle de 17 acides aminés, fermée par un pont disulfure, mais ne possède qu'une extrémité exocyclique N-terminale (**Figure 1.2**). Bien que possédant une extrémité exocyclique N-terminale beaucoup plus longue, le CNP-53 a la même affinité pour son récepteur que le CNP-22. Les 2 peptides ont aussi des activités identiques (Yeung, Ho et al. 1996).

Le CNP est le plus conservé des peptides natriurétiques parmi les espèces. Les pré-pro-CNP montrent une homologie remarquable, supérieure à celle des pré-pro-ANP. Les pré-pro-CNP des espèces de mammifères montrent 99, 96, 91 et 94 % d'homologie entre la forme humaine et celles du chimpanzé, du chien, de la souris et du rat respectivement. De plus, le CNP-22 de toutes les espèces citées ci-dessus est identique (Potter, Yoder et al. 2009). Le fait que le CNP soit le peptide le plus conservé parmi les espèces, laisse à penser qu'il est l'ancêtre de la famille des peptides natriurétiques. Des études sur l'histoire de l'évolution des gènes des peptides natriurétiques suggèrent d'ailleurs que l'ANP et le BNP sont issus d'événements de duplication du gène du CNP (Inoue, Naruse et al. 2003).

Le CNP a initialement été purifié à partir d'extraits de cerveau de porc, et c'est le peptide natriurétique le plus exprimé dans le cerveau. Il est également fortement exprimé dans les chondrocytes (Hagiwara, Sakaguchi et al. 1994) et dans les cellules endothéliales (Suga, Nakao et al. 1992). Il est par contre très peu exprimé dans le cœur (Yandle 1994). CNP-53 est la forme majeure dans le cerveau, les cellules endothéliales et le cœur, alors que le CNP-22 est prédominant dans le plasma humain et le liquide cébrospinal (Potter, Abbey-Hosch et al. 2006).

2. Régulation de l'expression

Le CNP n'est pas stocké dans des granules de sécrétion. Dans les cellules endothéliales en culture, son expression est augmentée par les facteurs de croissance et les cytokines comme TNF- α , TGF- β et IL-6 (Suga, Nakao et al. 1992; Suga, Itoh et al. 1993), et par les forces de cisaillement (Chun, Itoh et al. 1997). Son expression est au contraire inhibée, par l'insuline (Igaki, Itoh et al. 1996), les lipoprotéines oxydées (Sugiyama, Kugiyama et al. 1995) et le VEGF (Doi, Itoh et al. 1996). La concentration plasmatique normale du CNP (dans ses 2 formes) est de l'ordre de 5 à 10 fmol/mL (Stingo, Clavell et al. 1992), et augmente très peu, ou pas du tout, chez les patients souffrants d'IC congestive (Kalra, Clague et al. 2003).

La régulation de la transcription du gène *Nppc* a été beaucoup moins étudiée que pour les gènes de l'ANP et du BNP. Deux éléments *cis* régulateurs riches en GC ont été identifiés dans le promoteur proximal du gène du CNP. Ils sont requis pour assurer la transcription constitutive du gène *Nppc* (Ohta, Shimekake et al. 1993). Les facteurs de transcription TSC-22 et TSF1, tous 2 capables de se lier à ces éléments riches en GC, seraient responsables de la transcription du gène *Nppc* stimulée par le TGF- β (Ohta, Shimekake et al. 1996; Ohta, Takeuchi et al. 2000).

D. Les autres membres de la famille des peptides natriurétiques

1. L'urodilatine

L'urodilatine est issue d'un processus de maturation alternatif du pro-ANP dans le rein. Le clivage du pro-ANP par une protéase, qui n'a pas encore été identifiée, donne un peptide de 32 acides aminés qui contient 4 acides aminés supplémentaires du côté N-terminal (**Figure 1.1 et 1.2**). L'urodilatine est synthétisée uniquement dans les cellules tubulaires rénales et sécrétée du côté luminal. Une fois sécrétée elle interagit en aval, au niveau des segments distaux du néphron, avec le récepteur NPRA présent au niveau luminal et induit une inhibition GMPc-dépendante de la réabsorption de sodium et d'eau. L'urodilatine est considérée comme un régulateur paracrine intrarénal de la natriurèse (Forssmann, Meyer et al. 2001).

L'urodilatine est actuellement évaluée en clinique pour le traitement de l'IC aigue (Lee and Burnett 2007).

2. Le peptide natriurétique de type *Dendroaspis*

Le peptide natriurétique de type *Dendroaspis* (DNP), originellement isolé du venin de mamba vert (*Dendroaspis angusticeps*), est un nouveau venu dans la famille des peptides natriurétiques (Schweitz, Vigne et al. 1992). C'est un peptide de 38 acides aminés, avec la même structure en boucle que les autres peptides natriurétiques, mais ayant une extrémité exocyclique C-terminale plus longue (**Figure 1.1 et 1.2**). Des études montrant une immunoréactivité au DNP dans le plasma et certains tissus humains (Schirger, Heublein et al. 1999), ont soulevé la possibilité que le DNP pourrait être un autre peptide natriurétique endogène. Cependant, cette hypothèse est encore débattue (Richards, Lainchbury et al. 2002), puisqu'aucun gène codant pour le DNP n'a encore été identifié. Cependant, il a été démontré que le DNP possède les mêmes propriétés vasodilatatrice, natriurétique et diurétique dans les modèles animaux et les tissus humains (Lisy, Jougasaki et al. 1999; Collins, Bracamonte et al. 2000), que l'ANP et le BNP (Burnett 2006). Le DNP se lie au NPRA, avec une affinité similaire à l'ANP, et au NPRC, avec une affinité 30 fois plus faible que l'ANP, mais n'a aucune affinité pour le NPRB. Il est de plus 10 fois plus puissant que l'ANP à stimuler la production de GMPC dans des cellules exprimant le NPRA (Johns, Ao et al. 2007).

3. La guanyline, l'uroguanyline et les endotoxines bactériennes ST

La guanyline et l'uroguanyline ont d'abord été purifiées à partir de jéjunum de rat et d'urine d'opossum, respectivement (Currie, Fok et al. 1992; Hamra, Forte et al. 1993). Leurs séquences et leurs structures sont différentes de celles des peptides natriurétiques conventionnels. Ils n'ont en commun qu'une séquence conservée (Gly-Cys) en C-terminal (**Figure 1.1**). Guanyline et uroguanyline partagent cependant une séquence et une structure similaire à des entérotoxines résistantes à la chaleur (ST), sécrétées par certaines bactéries et responsables de diarrhées sécrétoires. Ces 3 peptides lient et activent le même récepteur apical de la bordure en brosse intestinale :

la guanylate cyclase C (GC-C) (Chapitre 2). La guanyline et l'uroguanyline sont des peptides endogènes sécrétés par l'intestin, dont le rôle physiologique est de réguler, de façon GMPc-dépendante, la sécrétion d'eau et d'électrolyte par les cellules épithéliales de l'intestin et de moduler la balance en sodium de l'organisme par des actions sur le rein (Forte 2004). Les entérotoxines ST, résistantes à la chaleur grâce à 3 ponts disulfures (**Figure 1.1**), stimulent la GC-C de façon disproportionnée entraînant une sécrétion massive d'eau et d'électrolytes.

4. L'ostéocrine (Muscline)

Un nouveau peptide avec des similarités limitées aux peptides natriurétiques a été récemment identifié par 2 groupes de recherche, grâce à une stratégie « signal-trap ». De façon intéressante, un des groupes l'a découvert dans l'os et appelée ostéocrine ; alors que l'autre groupe l'a découvert dans les muscles squelettiques et l'a appelée muscline (Thomas, Moffatt et al. 2003; Nishizawa, Matsuda et al. 2004). Comme les peptides natriurétiques, l'ostéocrine est synthétisée sous forme de pré-peptide de 133 acides aminés qui donne un peptide actif d'environ 50 acides aminés. L'ostéocrine n'a pas la structure en boucle des peptides natriurétiques. C'est un peptide linéaire qui possède 2 régions d'homologie aux peptides natriurétiques (**Figure 1.1**). Ces 2 régions d'homologie sont responsables de sa capacité à lier le NPRC. En effet, l'ostéocrine lie le NPRC avec une haute affinité et de manière compétitive avec l'ANP (Moffatt, Thomas et al. 2007; Kita, Nishizawa et al. 2009). Elle ne lie cependant ni NPRA, ni NPRB. Quand le NPRA ou le NPRB est coexprimé avec NPRC dans une cellule, l'ostéocrine augmente la production de GMPc induite par l'ANP ou le CNP, probablement en bloquant la dégradation NPRC-dépendante des peptides natriurétiques (Moffatt, Thomas et al. 2007; Kita, Nishizawa et al. 2009). L'ostéocrine est hautement exprimée dans l'os en développement ou en régénération, dans les ostéoblastes et les chondrocytes particulièrement. De plus, les souris surexprimant l'ostéocrine spécifiquement dans l'os présentent une surcroissance osseuse, un phénotype similaire aux souris surexprimant le CNP ou déficientes en NPRC. Ces résultats suggèrent que l'ostéocrine augmente les niveaux locaux de CNP dans la plaque osseuse en bloquant la liaison au NPRC (Moffatt, Thomas et al. 2007).

E. Inactivation des peptides natriurétiques

Les peptides natriurétiques sont rapidement dégradés et/ou éliminés de la circulation sanguine. Le mécanisme d'élimination majeur passe par leur liaison au récepteur de clairance NPRC (Chapitre 2), exprimé à la surface des cellules et qui contrôle les concentrations locales de peptides natriurétiques via une internalisation constitutive et une dégradation dans les lysosomes (Cohen, Koh et al. 1996). L'affinité de l'ANP pour le NPRC est plus élevée que pour le BNP ou le CNP (Suga, Nakao et al. 1992).

L'inactivation des peptides natriurétiques se fait également par clivage protéolytique par l'endopeptidase neutre 24.11 (NEP) aussi appelée néprilysine (**Figure 1.6**). Cette métalloprotéase à zinc est retrouvée surtout dans la bordure en brosse du tubule rénal proximal, mais aussi à la surface des cellules endothéliales, des cellules du muscle lisse vasculaire, des cardiomyocytes et des fibroblastes (Skidgel, Engelbrecht et al. 1984). Le site préférentiel de clivage des peptides natriurétiques par la NEP se situe entre les résidus Cys-Phe de la boucle (Kenny, Bourne et al. 1993; Yandle 1994). La NEP est non-saturable et contribue à l'élimination rapide des peptides natriurétiques par le rein. Contrairement à l'ANP et au CNP, le BNP n'est pas initialement clivé par la NEP. Les 6 premiers acides aminés du BNP sont d'abord clivés par la métalloprotéase meprine A dans la bordure en brosse du rein. Le produit de dégradation obtenu peut alors être clivé à son tour par la NEP (Pankow, Wang et al. 2007). Le BNP peut également être clivé par la dipeptidyl peptidase IV (DPP-IV) pour donner le BNP 3-32 privé de ses 2 premiers acides aminés. Cette forme tronquée est retrouvée dans le plasma sanguin humain, mais son activité biologique n'est pas confirmée. En effet, une étude faite chez le chien a démontré que le BNP 3-32 avait une activité réduite comparée au BNP normal, alors qu'une autre étude, réalisée sur des cardiomyocytes et des fibroblastes humains, démontre qu'ils ont la même activité. D'autres études sont nécessaires pour déterminer l'implication de la DPP-IV dans la dégradation du BNP (Vanderheyden, Bartunek et al. 2009).

L'inhibition de la NEP augmente la demi-vie des peptides natriurétiques, *in vitro* et *in vivo*, suggérant que la NEP contribue à la clairance rapide des peptides natriurétiques (Yandle, Brennan et al. 1989). Cependant, il est important de noter, que les souris n'ayant pas de NEP fonctionnelle ne montrent pas d'augmentation de l'activité des peptides natriurétiques (Lu, Gerard et al. 1995). Par contre, les souris dont le gène du NPRC a été inactivé sont hypotensives, montrent une surcroissance osseuse et une habilité réduite à éliminer les peptides natriurétiques, suggérant que le NPRC est aussi un régulateur physiologique majeur de la concentration en peptides natriurétiques circulants (Matsukawa, Grzesik et al. 1999).

L'ANP et le CNP ont une demi-vie plasmatique d'environ 2 min, alors que la demi-vie plasmatique du BNP est d'environ 20 min (Potter, Abbey-Hosch et al. 2006). Ceci est dû au fait que la NEP est moins active sur le BNP (Stoupakis and Klapholz 2003) et que le BNP a moins d'affinité pour le NPRC que les autres peptides (Suga, Nakao et al. 1992).

L'urodilatine est également inactivée par liaison au NPRC et dégradée par la NEP. Elle est cependant plus résistante à la dégradation par la NEP que l'ANP (Forssmann, Meyer et al. 2001). Le DNP n'est pas sensible à la NEP, mais est capable de lier le NPRC, ce qui laisse supposer que l'internalisation par NPRC est son processus majeur d'inactivation (Chen, Lainchbury et al. 2002). La guanyline et l'uroguanyline sont inactivés de façon protéolytique, par des protéases de type chymotrypsine. L'uroguanyline est cependant plus résistante aux protéases que la guanyline (Forte 2004).

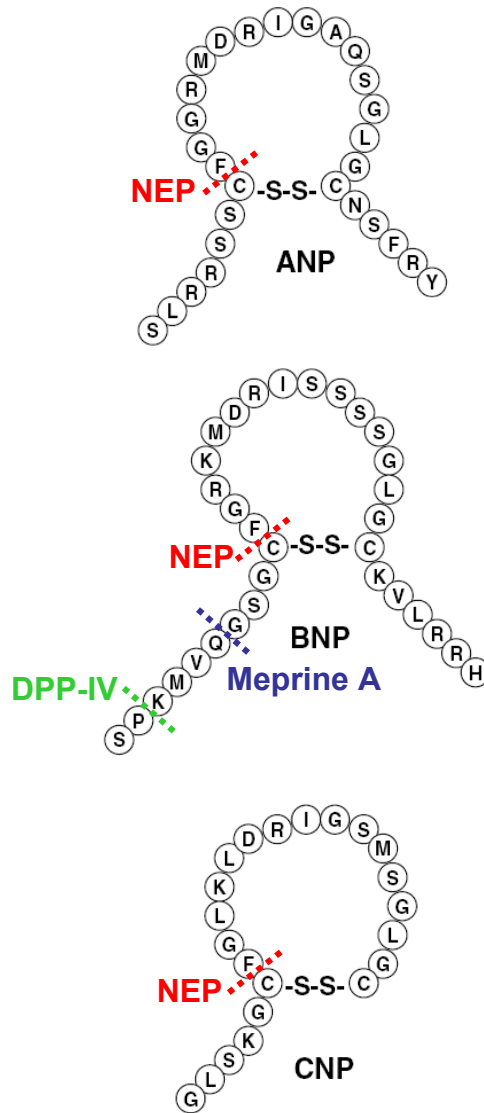


Figure 1.6 : Dégradation des peptides natriurétiques par les peptidases. Les sites de clivage préférentiels apparaissent en pointillés. NEP : Endopeptidase neutre; DPP-IV : Dipeptidyl peptidase IV.

CHAPITRE 2 : Les récepteurs des peptides natriurétiques et la famille des guanylates cyclases.

Depuis la découverte de l'AMPc en 1958, il était devenu évident que d'autres nucléotides cycliques devaient exister et qu'ils pourraient être importants dans la régulation de la physiologie de la cellule. En 1960, du GMPc a été synthétisé pour la première fois et à peu près au même moment, son existence était confirmée par l'isolation et l'identification du GMPc dans l'urine de lapin. Plus tard, ces résultats furent confirmés avec des rats traités au ^{32}P et il fut suggéré que le GMPc était issu d'une réaction catalysée par une cyclase, qui devait être similaire à l'adénylate cyclase découverte plus tôt. Il a été démontré par la suite qu'une variété d'hormones pouvaient réguler la production de GMPc et que ce dernier avait certains effets pharmacologiques. L'activité guanylate cyclase a été décrite pour la première fois en 1969. Il avait alors été démontré que les guanylates cyclases existaient sous plusieurs isoformes, certaines solubles se retrouvant dans la fraction cytosolique des cellules et d'autres associées à la membrane, se retrouvant dans la fraction particulaire. À ce point, il était connu que plusieurs hormones et neuromédiateurs étaient capables d'influencer l'activité des guanylates cyclases, mais il n'y avait pas d'évidence de leur action directe sur l'enzyme. En fait, leurs régulateurs clés n'avaient pas encore été découverts (le monoxyde d'azote et les peptides natriurétiques) et leur découverte allait prendre encore quelques années (Kots, Martin et al. 2009).

La purification de la guanylate cyclase soluble (GCs) en 1986 a permis de montrer qu'elle avait une structure hétérodimérique et qu'elle présentait un élément prosthétique hème. Mais c'est son clonage, une dizaine d'années plus tard, qui a permis de la caractériser pleinement (Kots, Martin et al. 2009).

La première publication d'une activation spécifique d'une guanylate cyclase membranaire (GCm) décrivait l'activation d'une GCm intestinale, la GC-C, par une entérotoxine d'*E. Coli* (Hughes, Murad et al. 1978). Une dizaine d'années plus tard, la structure de la GC-C était décrite et ses activateurs endogènes, guanyline et uroguanyline, identifiés.

Dans le cas des autres GCm, de gros progrès ont été faits grâce aux études sur l'oursin de mer. En effet, il avait été démontré que le sperme de l'oursin de mer était riche en GCm et que ces dernières pouvaient être activées par liaison directe, par des peptides spécifiques sécrétés par les œufs (Ramarao and Garbers 1985). Cette observation a permis d'émettre l'hypothèse que les GCm étaient aussi des récepteurs de ligands peptidiques. Un peptide de structure similaire était d'ailleurs identifié au même moment dans des extraits d'oreillette cardiaque (Chapitre 1). La première GCm a été clonée en 1988 à partir d'une librairie d'ADNc d'oursin de mer, en utilisant des sondes basées sur les fragments peptidiques issus du clivage protéolytique de la protéine purifiée (Singh, Lowe et al. 1988). Ce clone fournira les sondes qui serviront ensuite au clonage des autres GCm de mammifères. Les GC-A et GC-B, récepteurs des peptides natriurétiques, ont été les premières à être clonées à partir de tissus humains. Les 5 autres GCm (GC-C à G) ont été clonées par la suite. La présence de GCm, GC-E et GC-F, dans la rétine avait été décrite pour la première fois au début des années 70. La GC-D a été identifiée dans les neurones sensoriels olfactifs (Fulle, Vassar et al. 1995) et la GC-G a été la dernière GCm à être clonée, à partir d'une librairie d'ADNc d'intestin (Schulz, Wedel et al. 1998).

A. La guanylate cyclase soluble

La guanylate cyclase soluble est exprimée dans le cytoplasme de presque toutes les cellules de mammifères. Elle est impliquée dans un large éventail de fonctions physiologiques telles que l'inhibition de l'agrégation plaquettaire, la relaxation du muscle lisse, la vasodilatation, la transduction du signal neuronale et l'immunomodulation. C'est une enzyme hétérodimérique, formée de 2 sous-unités homologues α et β , toutes deux essentielles à l'activité enzymatique. Chaque sous-unité est formée d'un domaine régulateur N-terminal, d'un domaine de dimérisation en hélice et d'un domaine catalytique guanylate cyclase en C-terminal (Lucas, Pitari et al. 2000) (**Figure 2.1**). La guanylate cyclase soluble est activée par le monoxyde d'azote (NO), dont la liaison augmente l'activité guanylate cyclase de 200 à 300 fois (Padayatti, Pattanaik et al. 2004). Tout comme les GCm, elle catalyse la transformation du substrat GTP en GMPc et pyrophosphate (PPi).

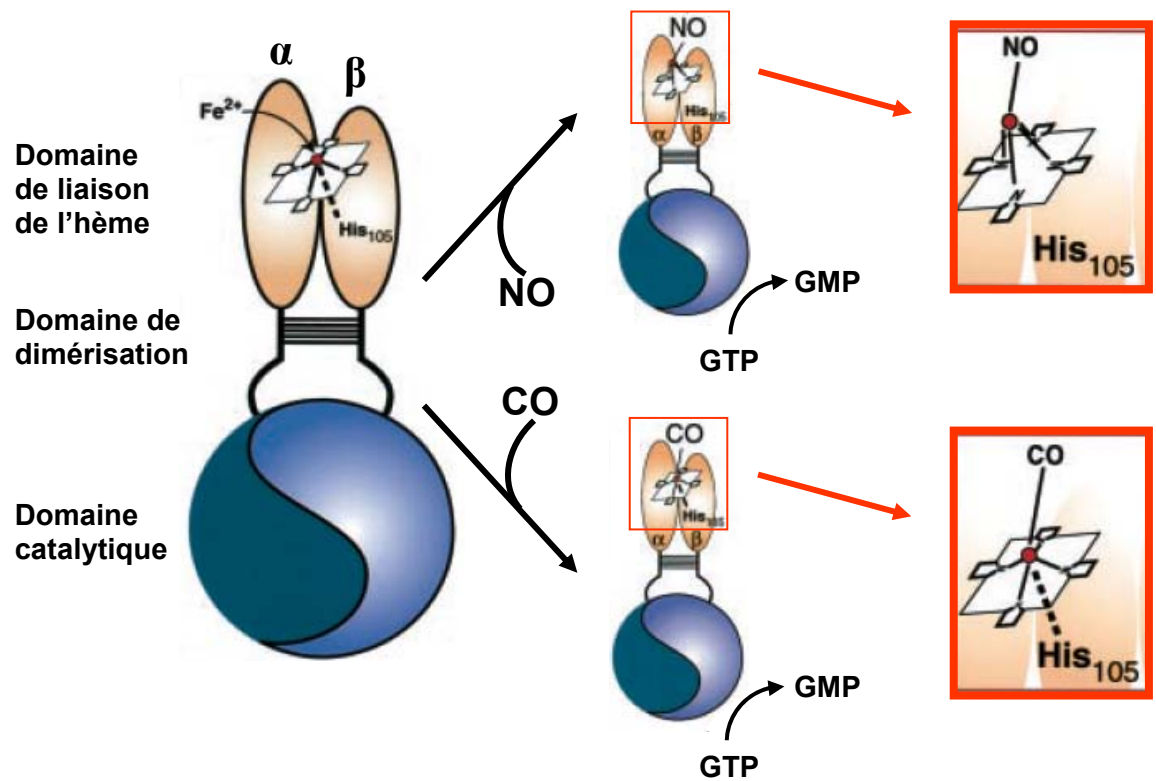


Figure 2.1 : Structure et activation de la guanylate cyclase soluble. La guanylate cyclase soluble contient un groupement prosthétique hème avec un cœur ferreux (Fe^{2+}) pentavalent, associé à l'histidine en position 105 de la sous unité β . Le NO active la GCs en se liant directement à la 6^{ème} position du cœur ferreux, cassant le lien entre l'atome de fer et le résidu histidine, et déplaçant l'atome de fer hors du plan du centre porphyrrique. Le CO peut également se lier au groupe hème de la GCs, menant à la formation d'un complexe hexavalent dans lequel l'atome de fer est associé à la fois au résidu histidine et au CO. L'incapacité du CO à casser le lien entre l'atome de fer et l'histidine pour former un complexe pentavalent, ne permet pas au fer de sortir hors du plan de l'hème, ce qui fait du CO un activateur moins puissant que le NO. Il a par contre une plus grande affinité pour la GCs que le NO. Modifié de (Lucas, Pitari et al. 2000).

Il existe plusieurs isotypes de guanylates cyclases solubles, avec différentes compositions en sous unités ($\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$, $\beta 1$, $\beta 2$ et $\beta 3$). L'hétérodimère $\alpha 1/\beta 1$ est le plus abondant. La sous unité $\alpha 2$ contient un domaine d'interaction PDZ qui permet une localisation du dimère $\alpha 2/\beta 1$ à la membrane synaptique. La sous unité $\beta 2$ quant à

elle contient une séquence consensus d'isoprénylation qui suggère également sa localisation à la membrane (Lucas, Pitari et al. 2000; Padayatti, Pattanaik et al. 2004).

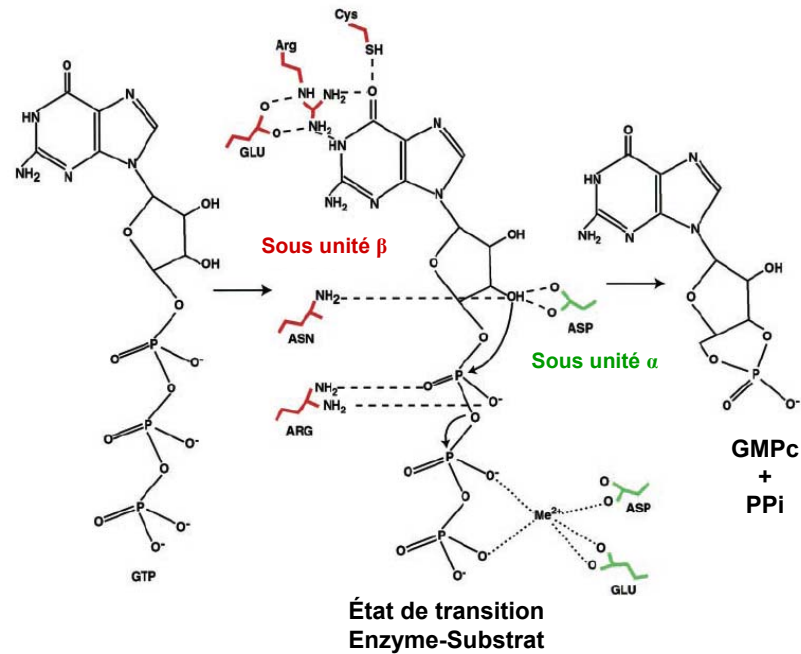


Figure 2.2 : Mécanisme catalytique de la guanylate cyclase soluble. Le GTP se lie à un seul site catalytique. La purine est liée de façon spécifique à des résidus de la sous unité β (en rouge), et le cation divalent (Me^{2+}), qui stabilise les phosphates β et γ du nucléotide, lie des résidus acides de la sous unité α (en vert). Chaque sous unité contribue à la formation du site catalytique responsable du clivage du lien α -phosphoanhydre par une réaction directe de déplacement. Les produits de cette catalyse sont le GMPc et le pyrophosphate (PPi). Modifié de (Lucas, Pitari et al. 2000).

Dans l'hétérodimère $\alpha 1/\beta 1$, qui a été le mieux caractérisé, chaque sous unité possède un domaine régulateur. De ces 2 domaines régulateurs, celui de la sous unité $\beta 1$ est considéré comme le plus important, puisqu'il est le seul à contenir le groupement prosthétique hème requis pour la liaison du NO. Le domaine de régulation de la sous unités $\alpha 1$ est pour sa part indispensable dans la transduction du signal initié par la liaison du NO. Le mécanisme de liaison du NO au groupement hème ferreux est décrit dans la **Figure 2.1**. Le mécanisme de transduction du signal vers le domaine guanylate cyclase est encore inconnu ; on ne sait pas comment un

petit changement de conformation au niveau de l'hème peut affecter l'hétérodimère entier et stimuler l'activité (Padayatti, Pattanaik et al. 2004). Dans l'hétérodimère, le domaine C-terminal de chaque sous unité contribue à la formation d'un unique site catalytique. Trois résidus de la sous unité β déterminent la spécificité du substrat (Glu, Arg et Cys). Trois autres résidus, 2 de la sous unités β (Asn et Arg) et 1 de la sous unité α (Asp) forment le site catalytique. Les domaines guanylate cyclases des sous unités α et β sont homologues ; la sous unité α possèdent aussi les 3 résidus responsables de la spécificité du substrat (Glu, Arg et Cys). Cependant, les résidus responsables de la formation du site actif sont modifiés dans les sous unités correspondantes, ce qui explique la présence d'un site actif unique et suggère la présence de 2 sites de liaison pour le GTP (Lucas, Pitari et al. 2000). Il a d'ailleurs été démontré que le site non catalytique pouvait lier des nucléotides et réguler l'activité du site actif adjacent (Chang, Lemme et al. 2005).

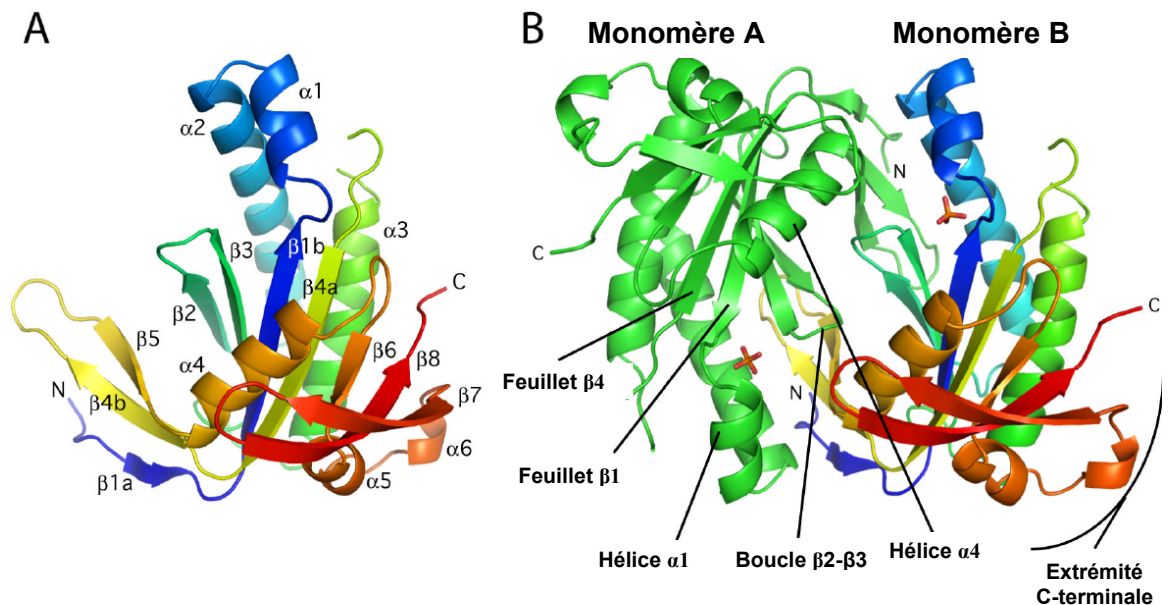


Figure 2.3 : Structure cristalline du domaine catalytique de la guanylate cyclase d'algue verte *Chlamydomonas reinhardtii*. A, structure du domaine guanylate cyclase d'un monomère et éléments de structure secondaire. B, Domaine catalytique de la guanylate cyclase. Le monomère A est coloré en vert et le monomère B est multicolore, l'échelle de coloration partant du bleu pour l'extrémité N-terminale jusqu'au rouge pour l'extrémité C-terminale. Modifié de (Winger, Derbyshire et al. 2008).

Les premières structures cristallographiques du domaine guanylate cyclase de GCs ont récemment été décrites. L'une provient de la cyanobactérie *Synechocystis PCC6803* (Cya2) (Rauch, Leipelt et al. 2008) et l'autre de l'algue verte *Chlamydomonas reinhardtii* (Winger, Derbyshire et al. 2008) (**Figure 2.3**). Contrairement au GCs de mammifères, ces 2 GCs ont une structure homodimérique, à 2 sites actifs. Elles ont cependant permis de confirmer le mécanisme catalytique précédemment proposé pour les GCs de mammifères, basé sur des études de mutagenèse dirigée et des modèles structuraux obtenus à partir du cristal de l'adénylate cyclase. Elles pourront également servir de modèle pour les GCm qui sont également homodimériques, mais dont la structure du domaine guanylate cyclase n'a encore pas été résolue.

B. Les guanylates cyclases membranaires

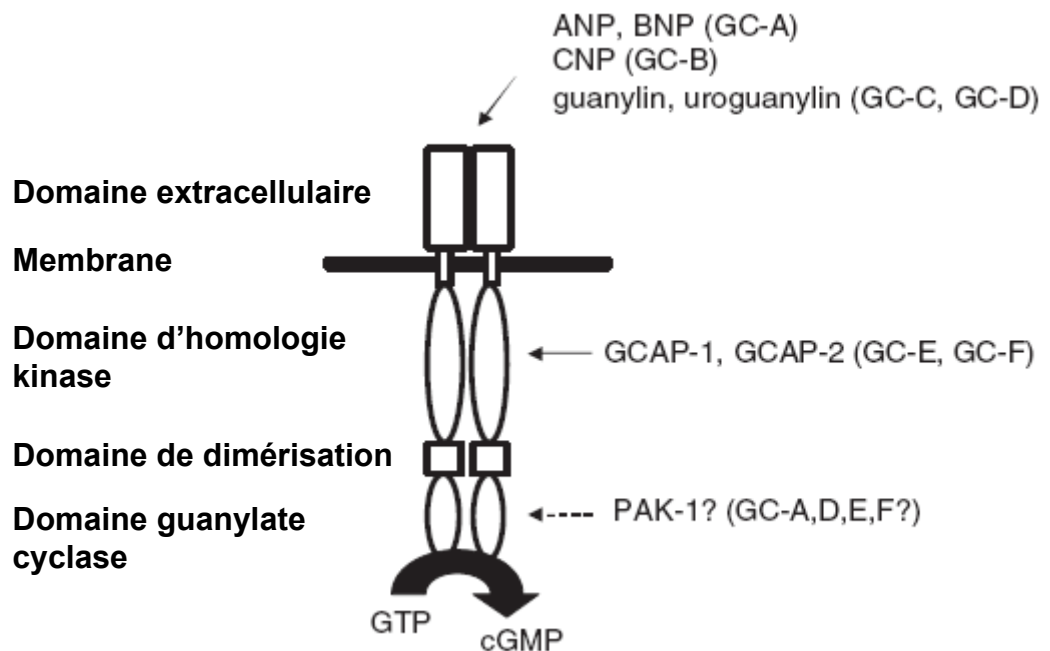


Figure 2.4 : Topologie générale des guanylates cyclases membranaires (GC-A à GC-G) et leurs activateurs. Modifié de (Kuhn 2009).

Il existe 7 isoformes de guanylates cyclases membranaires chez les mammifères : GC-A à GC-G. Les GC-A et B, plus communément appelés NPRA et NPRB, sont les récepteurs des peptides natriurétiques. Le NPRA est le récepteur de l'ANP et du BNP et le CNP se lie sur le NPRB. La GC-C a deux ligands endogènes,

guanyline et uroguanyline, mais lie également les entérotoxines bactériennes (ST). Seules ces 3 GCm ont des ligands connus, les GC-D, E, F et G sont des récepteurs orphelins. Les GC-E et F, n'ont pas de ligands connus, mais sont activées par des protéines de liaison du calcium, appelées GCAP (**Figure 2.4**).

Toutes les GCm ont la même topologie générale. Un unique passage transmembranaire sépare le domaine extracellulaire des domaines intracellulaires d'homologie kinase, de dimérisation et d'activité guanylate cyclase. Les GCm forment des homodimères ou des oligomères.

1. Les récepteurs des peptides natriurétiques

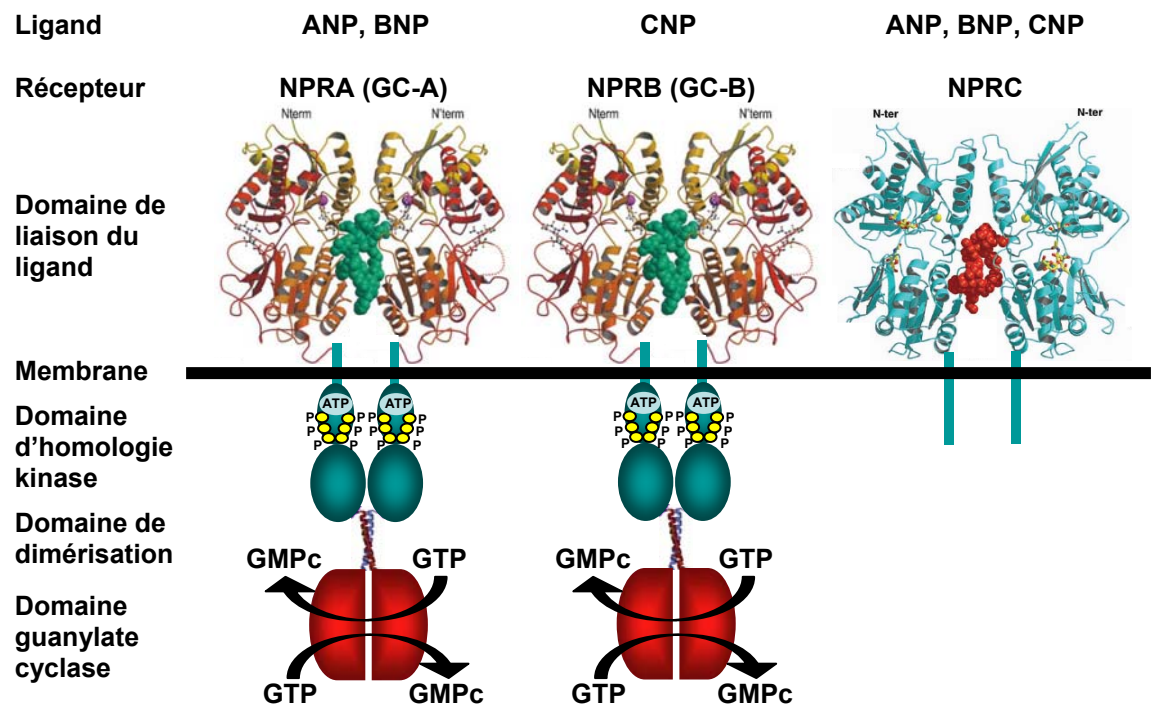


Figure 2.5 : Structure des récepteurs des peptides natriurétiques et spécificité de liaison des peptides.

En 1984, il était démontré que l'ANP faisait augmenter les concentrations de GMPC dans les tissus de rat, l'urine et les cultures primaires de cellules tubulaires rénales (Hamet, Tremblay et al. 1984). Au même moment, on rapportait que l'ANP activait une guanylate cyclase membranaire, mais pas de guanylate cyclase soluble, dans des tissus variés de rat (Waldman, Rapoport et al. 1984; Winkvist, Faison et al.

1984). Les premières études de liaison covalente chimique et de marquage de photoaffinité ont montré l'existence de deux récepteurs de l'ANP, un d'environ 70 kDa et l'autre de 120-140 kDa, tel qu'estimé sur un SDS-PAGE en condition réductrice (Hirose, Akiyama et al. 1985; Misono, Grammer et al. 1985; Vandlen, Arcuri et al. 1985; Yip, Laing et al. 1985).

Plus tard, des sites de haute affinité pour l'ANP furent co-purifiés avec une activité GCm, indiquant que le site de liaison à l'ANP et l'activité GC résidaient dans la même molécule de 120-140 kDa (Kuno, Andresen et al. 1986; Meloche, McNicoll et al. 1988). Le récepteur de 70 kDa fut également purifié, et décrit comme un homodimère contenant un pont disulfure interchaîne, mais n'ayant aucune activité GC (Schenk, Phelps et al. 1987; Takayanagi, Snajdar et al. 1987). Le clonage de son ADNc révéla que cette protéine, appelée NPRC, était composée d'un domaine extracellulaire de liaison du ligand, d'un unique passage transmembranaire et d'un petit domaine intracellulaire de 37 acides aminés (Fuller, Porter et al. 1988). Le récepteur de 120-140 kDa, appelé NPRA, a été cloné à partir d'une librairie d'ADNc de cerveau de rat, en utilisant une sonde issue du clonage de la GCm de l'oursin de mer. La même méthode a permis d'identifier un autre récepteur, le NPRB. Le clonage et l'expression de ces 2 récepteurs ont permis de caractériser leur topologie générale et leur spécificité de liaison. (**Figure 2.5**). NPRA et NPRB ont des topologies très similaires (62 % d'identité de séquence en acides aminés) : un domaine extracellulaire de 450 résidus environ (44 % d'identité), un domaine transmembranaire unique d'une vingtaine de résidus, un domaine d'homologie kinase de 250 acides aminés (60 % d'identité), un domaine de dimérisation d'une quarantaine de résidus et un domaine guanylate cyclase d'environ 250 acides aminés (88 % d'identité). Le domaine extracellulaire de NPRC n'a que 30 % d'identité avec les récepteurs NPRA et NPRB, et son court domaine intracellulaire ne présente aucune homologie avec d'autres récepteurs connus (Pandey 2005).

Récepteur	Expression tissulaire
NPRA	Muscle lisse vasculaire, Endothélium, Cœur, Rein, Glande surrénale, Poumon, Intestin, Système nerveux central et périphérique, Tissu adipeux, Rate, Ovaire, Testicule
NPRB	Muscle lisse vasculaire, Endothélium, Cœur, Glande surrénale, Poumon, Cerveau, Tissu adipeux, Os, Fibroblaste, Foie, Utérus
NPRC	Muscle lisse vasculaire, Cœur, Rein, Glande surrénale, Poumon, Intestin, Cerveau

Tableau 2.1 : Expression tissulaire des récepteurs aux peptides natriurétiques.

Modifié de (Garbers, Chrisman et al. 2006; Kuhn 2009; Potter, Yoder et al. 2009)

1.1. Le récepteur A des peptides natriurétiques

1.1.1. Expression

Le gène codant pour le NPRA humain (*Npr1*) fait approximativement 16 kb. Il est composé de 22 exons et 21 introns et est localisé sur le chromosome 1q21-22 (Takahashi, Nakayama et al. 1998).

L'ARNm codant pour le NPRA est retrouvé dans de nombreux tissus, répertoriés dans le **tableau 2.1**. Des analyses de Western Blot chez le rat ont indiqué des niveaux élevés de NPRA dans les poumons, le rein, la surrénale, les testicules et le foie (Potter, Abbey-Hosch et al. 2006).

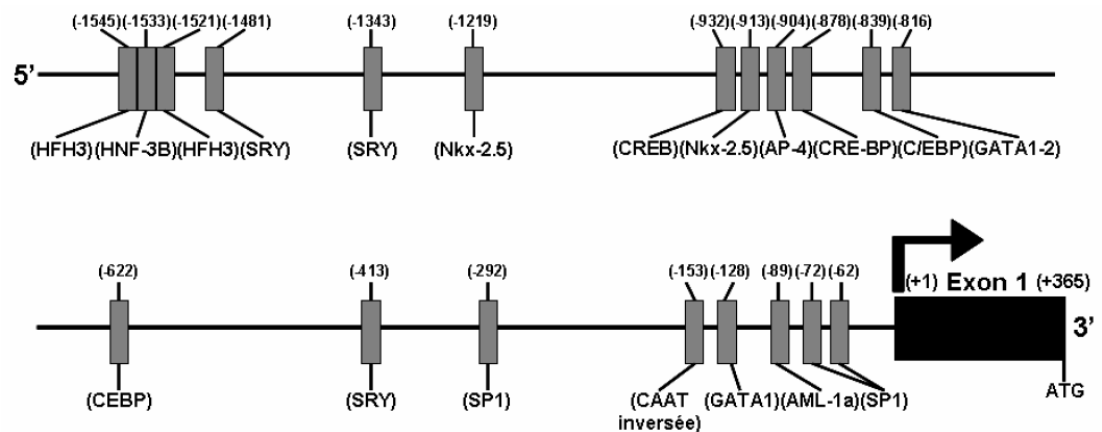


Figure 2.6. : Représentation schématique du promoteur du gène du NPRA (*Npr1*).

Les éléments *cis* régulateurs sont indiqués. Modifié de (Garg, Oliver et al. 2002).

L'analyse de la séquence du promoteur du gène de NPRA a permis d'identifier plusieurs éléments *cis* régulateurs, mais le rôle fonctionnel de ces sites

reste encore à être élucidé (**Figure 2.6**). La régulation de l'expression basale du gène *Npr1* est gouvernée par 3 sites SP-1 (-62, -72, -292), en conjonction avec une boîte CCAAT inversée, présente dans la région proximale du promoteur. La mutation des sites SP-1 entraîne une réduction de plus de 90% de l'activité du promoteur. L'expression du gène NPRA est régulée négativement par son ligand. Ce mécanisme semble GMPc dépendant puisque l'ANP, comme le 8-bromo-GMPc (un analogue du GMPc perméable aux cellules) provoque une réduction des niveaux d'ARNm de NPRA, qui corrèle avec une diminution dose dépendante de l'activité du promoteur. Un élément de réponse au GMPc a par la suite été identifié dans la région -1372 à -1354. L'Ang II inhibe aussi l'expression du gène de NPRA. Cette inhibition par l'angiotensine impliquerait l'élément de réponse à l'AMPc (AMPc-RE) en position -932 et le facteur de transcription CREB. L'ET-1 et le facteur de croissance TGF- β 1 semblent faire également diminuer l'activité du promoteur. La vitamine D et les glucocorticoïdes quant à eux semblent faire augmenter les taux d'ARNm de NPRA. Enfin, une augmentation de la tonicité extracellulaire active l'expression du gène *Npr1*, par un mécanisme impliquant la p38 MAPK et la NO synthase endothéliale (eNOS) (Gardner, Chen et al. 2007).

1.1.2. Structure et fonction des différents domaines

a. Le domaine extracellulaire

Le domaine extracellulaire du NPRA est le site de liaison de l'ANP et du BNP. L'ordre des affinités des peptides natriurétiques pour le NPRA est le suivant : ANP>BNP>>CNP. Le domaine extracellulaire du NPRA contient trois ponts disulfures intrachaine entre les résidus Cys-60/Cys-86, Cys-164/Cys-215 et Cys-423/Cys432, mais aucun pont disulfure interchaîne, comme c'est le cas pour le NPRC (Miyagi and Misono 2000). Il est également glycosylé sur plusieurs résidus asparagines. La glycosylation est de type complexe et à haute teneur en mannose. Elle semble également varier selon le type cellulaire dans lequel le NPRA est exprimé. Ainsi, le séquençage de l'extrémité N-terminale du NPRA humain, exprimé dans les cellules CHO (Chinese Hamster Ovary), a montré que le NPRA est glycosylé sur les résidus Asn-2 et Asn-13 (Bennett, Bennett et al. 1991). Le domaine extracellulaire soluble du NPRA de rat exprimé dans les cellules COS est quant à lui glycosylé sur

les résidus Asn-13, Asn-180, Asn-306, Asn-347 et Asn-395 (Miyagi, Zhang et al. 2000). Le rôle de la glycosylation dans l'habileté du NPRA à générer du GMPc a été étudié en profondeur, pourtant il reste encore controversé. L'analyse sur gel SDS-PAGE du NPRA exprimé en cellule montre une grande hétérogénéité de taille, qui correspond à des formes plus ou moins glycosylées du récepteur. Or, certains investigateurs ont démontré, par liaison covalente chimique ligand/récepteur, que seule la forme pleinement glycosylée du NPRA était capable de lier l'ANP, suggérant ainsi que la glycosylation jouait un rôle dans la liaison du ligand (Lowe and Fendly 1992). D'autres ont au contraire démontré que la glycosylation n'est pas nécessaire à la liaison de l'ANP. En effet, la déglycosylation complète du NPRA par une endoglycosidase n'a pas d'effet sur sa capacité à lier l'ANP, ni sur son activité (Miyagi, Zhang et al. 2000). Il semblerait donc que la glycosylation du domaine extracellulaire n'ait pas de rôle direct sur la liaison de l'ANP. Elle pourrait par contre être impliquée dans le repliement adéquat de l'ECD lors de la synthèse du NPRA et dans la stabilisation de sa structure. Elle pourrait aussi jouer un rôle dans le transport du NPRA vers la membrane, comme c'est le cas pour la plupart des glycoprotéines (van den Akker 2001).

Le domaine extracellulaire du NPRA de rat, en absence de ligand, a été cristallisé pour la première fois par Van Den Akker et ses collaborateurs en 2000. De façon surprenante, l'ECD de NPRA montre une homologie de structure avec les protéines de liaison périplasmique bactériennes. Chaque monomère d'ECD est constitué de 2 lobes de conformation similaire, contenant chacun un feuillet β parallèle entouré d'hélices α . Les 2 lobes sont connectés entre eux par une région charnière. Un ion chlore est profondément enfoui dans le lobe distal de chaque monomère. Son rôle n'a pas encore été déterminé, mais il semblerait qu'il soit requis pour la liaison de l'ANP. Cependant, son affinité est telle, qu'il est toujours lié dans les conditions physiologiques. Il semblerait donc qu'il soit plus important pour la structure de l'ECD que pour l'allostérie (Misono 2000). Dans le cristal, l'ECD est retrouvé sous forme de dimère. Le NPRA pleine longueur est également retrouvé à la surface des cellules sous forme d'homodimère préassocié, en absence de ligand (Meloche, Ong et al. 1987; Chinkers and Wilson 1992). Deux formes de dimère ont été observées lors de la cristallisation. Le premier dimère avait une forme en A, avec

une interface de dimérisation située entre les lobes distaux, et le deuxième dimère avait une forme en V, avec une interface de dimérisation située au niveau des lobes proximaux (**Figure 2.7**). Il avait alors été proposé que le dimère en V, pouvant accommoder 2 molécules d'ANP, correspondait à la conformation naturelle du récepteur.

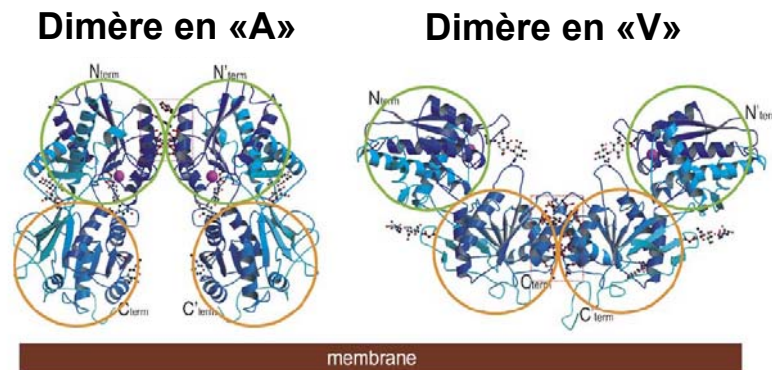


Figure 2.7 : Structure cristalline de l'ECD de NPRA sans son ligand. Chaque ECD est constitué de 2 lobes, un lobe distal (cercles verts) et un lobe proximal (cercles orange). Les premières études de cristallisation en absence de ligand ont montré que le dimère d'ECD pouvait prendre 2 conformations différentes : un dimère en «A» avec une interface de dimérisation au niveau distal et un dimère en «V» avec une interface de dimérisation au niveau proximal. Modifié de (Misono, Ogawa et al. 2005).

Cependant, au même moment la structure cristalline du NPRC, en présence et en absence du ligand CNP révélait que le NPRC présentait une structure dimérique en A, et avait une stœchiométrie de liaison du ligand de 1:2 (He, Chow et al. 2001). La stœchiométrie de liaison de l'ANP au NPRA a longtemps été débattue. Un groupe démontrait, en comparant le nombre de sites de liaison à l'ANP, obtenu en courbe de saturation, et la quantité de récepteurs évaluée par radioimmunoessai, que la stœchiométrie de liaison était de 1:2 (Rondeau, McNicoll et al. 1995). Par ailleurs, un autre groupe démontrait par chromatographie d'exclusion stérique HPLC, que la stœchiométrie était plutôt de 2:2 (Misono, Sivasubramanian et al. 1999). Afin de déterminer laquelle des conformations en V ou en A de l'ECD de NPRA correspondait à la conformation naturelle du récepteur, De Léan et ses collaborateurs, ont muté un résidu tryptophane, situé dans l'interface de dimérisation distale du

NPRA, en cystéine. Le mutant W74C formait des dimères covalents de façon spontanée, ce qui semblait confirmer la structure dimérique en A du NPRA. De plus, ce mutant dimérique covalent était bloqué dans un état inactif et incapable de lier l'ANP. Cependant la capacité à lier l'ANP et l'activation du récepteur était retrouvée en espaçant un peu la distance entre les deux résidus W74 à l'aide de petits agents alkylants bifonctionnels ; suggérant que l'interface de dimérisation distale s'ouvre quelque peu suite à la liaison de l'ANP (De Lean, McNicoll et al. 2003). La conformation en A du NPRA pouvant difficilement accommoder 2 molécules d'ANP, ces résultats semblaient également confirmer une stoechiométrie de liaison de 1 :2. La structure en A et la présence de l'interface dimérique au niveau distale, ont été confirmées par d'autres études de mutagenèse dirigée. Ainsi la mutation des résidus F96 et H99, situés dans l'interface distale inhibe la dimérisation du récepteur, alors que la mutation de résidus de l'interface proximale, Y196 et L225, n'a pas d'effet (Qiu, Ogawa et al. 2004).

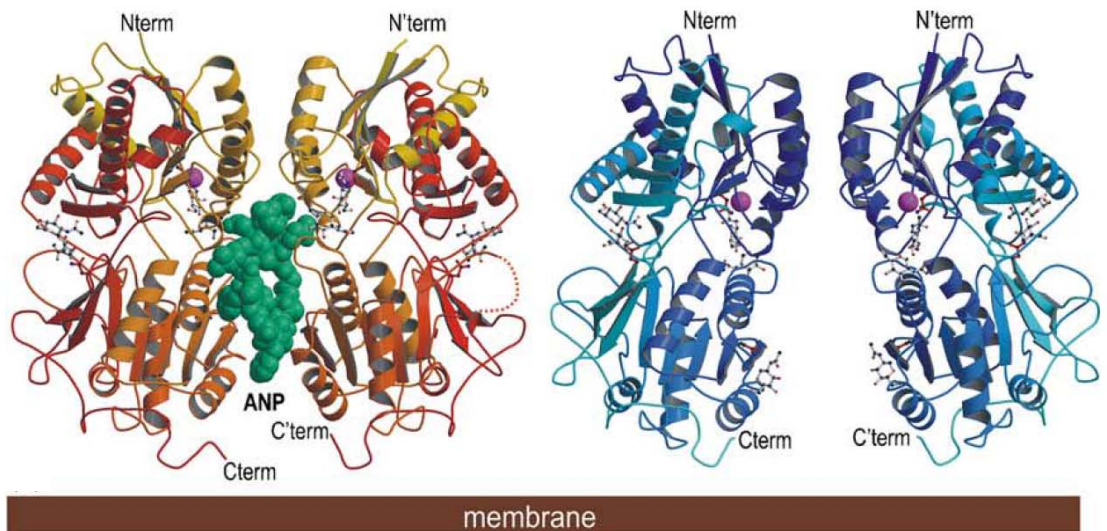


Figure 2.8 : Cristal de l'ECD de NPRA complexé (à gauche) ou non (à droite) à l'ANP. D'après (Misono, Ogawa et al. 2005).

La détermination de la structure cristalline de l'ECD de NPRA de rat, en absence et en présence d'ANP, a confirmé définitivement, la conformation en A et la stoechiométrie de liaison 1:2 du NPRA (Ogawa, Qiu et al. 2004) (**Figure 2.8**). Puisque l'ANP n'a pas de symétrie interne, la liaison de l'ANP au NPRA est

asymétrique. Certaines régions d'interaction de l'ANP avec le NPRA avaient déjà été déterminées grâce à une technique de photomarquage par affinité. Cette étude avait révélé que l'extrémité N-terminale de l'ANP interagissait avec la région Met173-Phe188 du NPRA alors que l'extrémité C-terminale interagissait avec la région Asp191-Arg198. Ainsi, il avait été suggéré que les 2 extrémités du peptide étaient en contact avec les mêmes régions du NPRA, mais sur des sous unités différentes (McNicoll, Gagnon et al. 1996). Ces résultats avaient par la suite été confirmés par mutagenèse dirigée (van den Akker, Zhang et al. 2000). Les études de cristallographie n'ont pas pu fournir une cartographie complète du site de liaison de l'ANP, car l'ANP utilisé lors de la cristallisation était une forme tronquée d'un acide aminé en C-terminal et de toute l'extrémité exocyclique N-terminale (ANP 7-27). Trois sites d'interactions majeurs ont quand même été identifiés : (1) le résidu Arg14 de l'ANP forme des ponts hydrogène avec les résidus Asp62, Arg95 et Asp119 du NPRA, (2) le résidu Phe8 de l'ANP a des contacts aromatiques avec les résidus Tyr154, Phe 165 et Tyr172 et (3) l'extrémité exocyclique C-terminale est en contact avec la région Gln186-Phe188 (Misono, Ogawa et al. 2005). Dans le cristal, l'extrémité exocyclique C-terminale de l'ANP tronqué semble occuper la position de l'extrémité N-terminale de l'ANP pleine longueur, comme le suggèrent les études de photomarquages réalisées avec le peptide pleine longueur (McNicoll, Gagnon et al. 1996). Les points de contact entre le BNP et le NPRA ont également été déterminés grâce à des expériences de photomarquage par affinité (Jossart, Coupal et al. 2005). L'extrémité N-terminale du BNP interagit avec la région Asp177-Val183 du NPRA. Le résidu Phe26 du BNP interagit avec la région de l'His195 et l'extrémité C terminale du peptide entre en contact avec la région de la Met173. Cette étude a aussi démontré que la Leu18 et l'extrémité N-terminale du BNP interagissent chacune avec un monomère différent du récepteur.

Pour comprendre le changement de conformation de l'ECD induit par la liaison de l'ANP, les auteurs ont comparé la structure du complexe lié à l'ANP à la structure de l'ECD seul (Misono, Ogawa et al. 2005) (**Figure 2.9**). Après liaison de l'ANP, les 2 monomères de NPRA subissent un mouvement de torsion. En vue de face, la liaison de l'ANP induit un mouvement de bascule (centré sur le point O, **Figure 2.9**) qui referme les lobes proximaux autour de l'ANP et rapproche d'environ

18 Å les extrémités C-terminales. Il ouvre aussi partiellement l'interface de dimérisation, causant un éloignement des résidus W74 et confirmant les résultats obtenus avec le mutant W74C (**Figure 2.9**, encadré en pointillés). En vue de côté, ce mouvement est accompagné par une rotation anti-horaire (centré sur le point O) de chaque monomère. Dans la région juxtamembranaire, qui connecte le lobe proximal de l'ECD au domaine transmembranaire, ce mouvement de torsion entraîne une translation d'environ 10 Å dans des directions opposées. La liaison de l'ANP aurait alors pour conséquence globale un changement de l'orientation relative des domaines juxtamembranaires, qui correspondrait à une rotation anti-horaire de 24° (**Figure 2.10**). Cette rotation des domaines juxtamembranaires serait responsable de la transduction du signal vers le domaine intracellulaire.

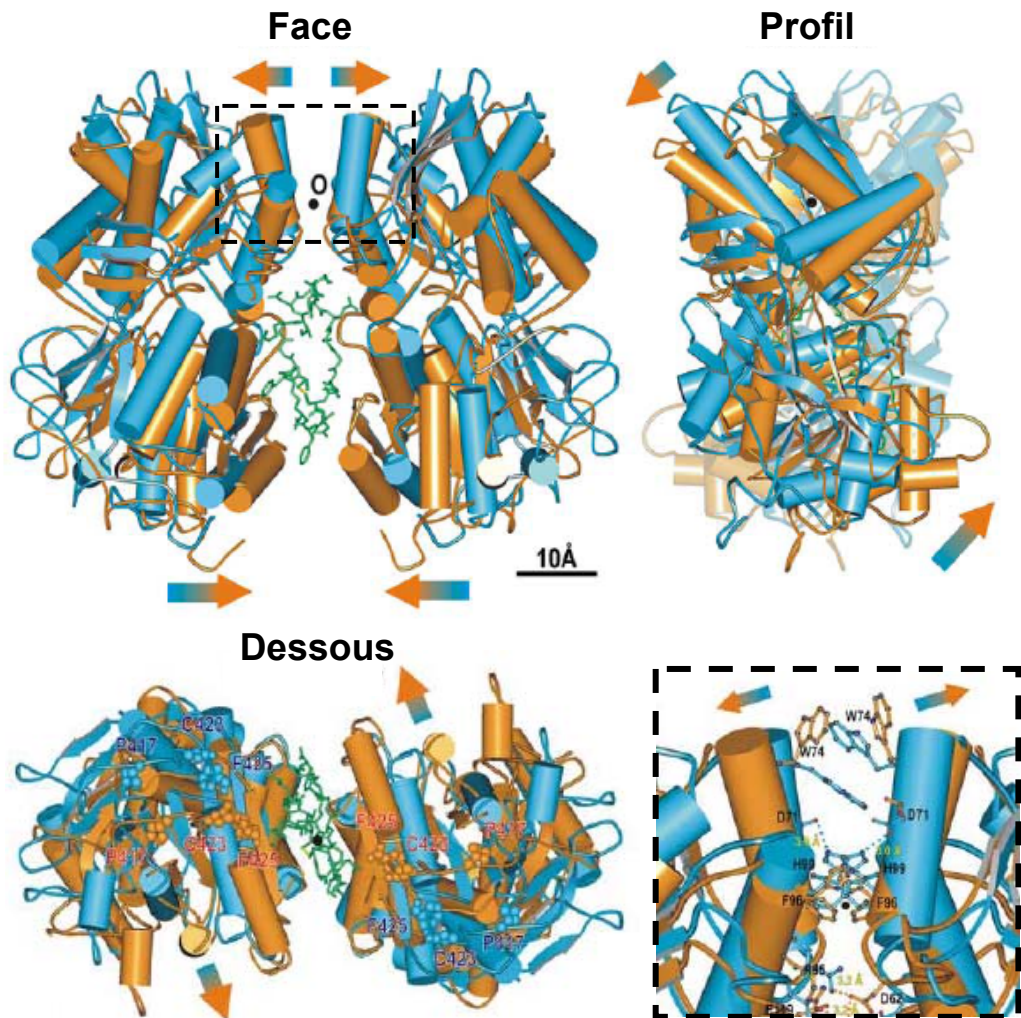


Figure 2.9 : Changement de conformation de l'ECD induit par l'ANP, vue de face, de profil et de dessous. La structure de l'ECD complexé avec ANP (orange) est superposée sur la structure en absence de ligand (bleu). L'image encadrée en pointillé représente une vue agrandie de l'interface de dimérisation des ECD, où l'on peut voir le déplacement des résidus W74 induit par l'ANP. Modifié de (Misono, Ogawa et al. 2005).

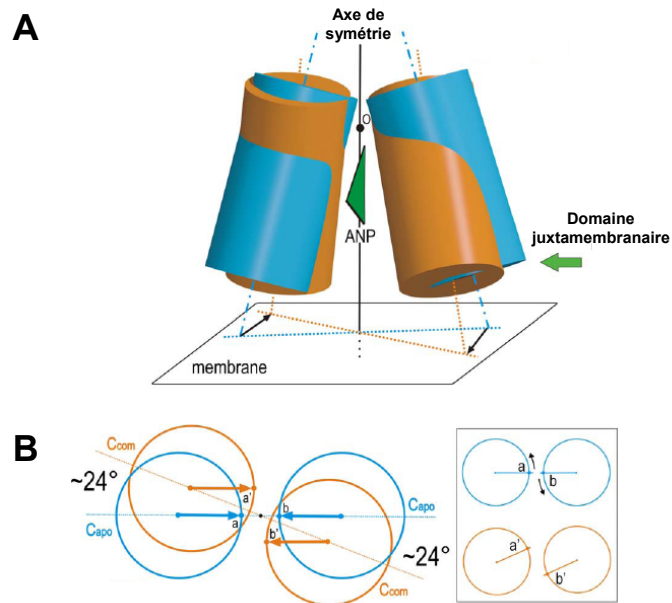


Figure 2.10. : Mécanisme de rotation des domaines extracellulaires du NPRA induit par l'ANP. **A**, illustration schématique du mouvement des ECD après liaison de l'ANP. Chaque ECD est représenté par un cylindre, le dimère sans ANP apparaît en bleu et le dimère complexé à l'ANP en orange. À la liaison de l'ANP (triangle vert), les ECDs subissent un mouvement de rotation (flèches) centré sur le point pivot O. **B**, les domaines juxtamembranaires (indiqués par une flèche verte dans A) sont représentés approximativement par des cercles. La liaison de l'ANP induit une translation des domaines juxtamembranaires d'un angle de 24° relativement au point O, avec peu de changement dans la distance inter-domaine (à gauche). Les flèches illustrent la translocation parallèle des 2 cercles de la conformation sans ANP à la conformation complexée. Ce mouvement induit un changement dans l'orientation relative des domaines juxtamembranaires qui est équivalent à une rotation de chaque domaine de 24° dans le sens anti-horaire. Modifié de (Misono, Ogawa et al. 2005).

L'importance du domaine juxtamembranaire dans la transduction du signal induit par l'ANP avait déjà été suggérée auparavant. Ainsi, il a été rapporté que l'activation du NPRA par l'ANP augmente la sensibilité du domaine juxtamembranaire aux protéases (Huo, Abe et al. 1999). De plus, la mutation C423S qui défait une boucle intrachaîne fermée par un pont disulfure mène à une activation constitutive et à une dimérisation covalente du récepteur par la Cys432 laissée libre (Labrecque, Mc Nicoll et al. 1999). Cette activation a plus tard été attribuée au changement de conformation induit par destruction de la boucle, plutôt qu'au processus de dimérisation covalente. En effet, la double mutation C423S/C432S donne également une activité constitutive bien que le récepteur ne dimérise pas de façon covalente (Huo, Abe et al. 1999). Cependant, la formation d'un pont disulfure dans le cas du C423S, indique quand même une proximité des domaines juxtamembranaires dans le dimère de NPRA. De plus, la mutation D435C, exposant une cystéine libre 3 résidus en aval de la Cys432, produit un dimère covalent induit par l'ANP (Labrecque, Deschenes et al. 2001). Tous ces résultats suggèrent qu'un changement de conformation, comme une translation ou une rotation des sous-unités, a lieu suite à la liaison de l'ANP. Les données cristallographiques sont cependant en désaccord avec les résultats obtenus en mutagenèse dirigée. Dans le cristal du NPRA complexé avec l'ANP, les résidus D435 de chaque monomère sont éloignés et dirigés dans des sens opposés, alors que les études de dimérisation covalente montrent qu'ils sont à proximité dans la conformation active du récepteur. Ces contradictions pourraient être expliquées par le fait que la conformation adéquate du domaine juxtamembranaire dépend probablement de sa proximité de la membrane et des contraintes imposées par les domaines transmembranaire et intracellulaire. D'autres études, sur le récepteur pleine longueur, sont nécessaires pour déterminer le changement de conformation impliqué dans la transduction du signal induit par l'ANP.

b. Le domaine d'homologie aux kinases

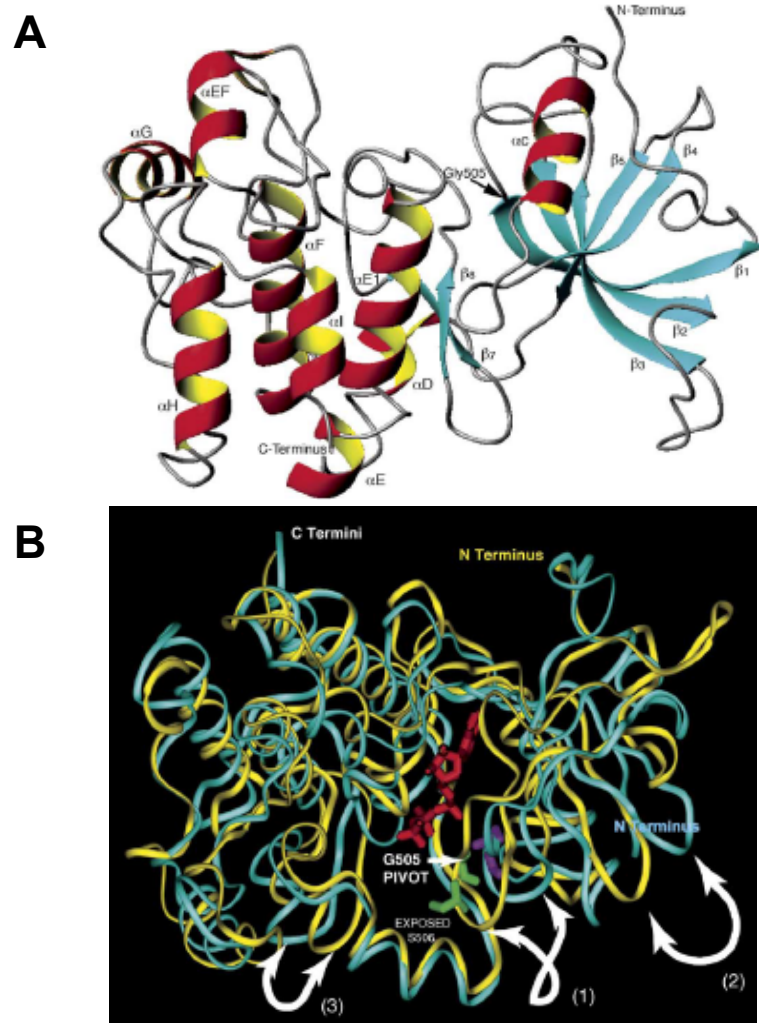


Figure 2.11 : Modèle structural du domaine KHD de NPRA. A, les hélices α apparaissent en rouge et les feuillets β en bleu. B, changements de conformation induits par la liaison de l'ATP. Superposition des structures complexée (en jaune) ou non (en bleu) à l'ATP (en rouge). Les flèches indiquent les mouvements majeurs observés après liaison de l'ATP. D'après (Duda, Venkataraman et al. 2005).

Le domaine d'homologie aux kinases (KHD), présente une homologie significative aux protéines kinases connues. Il n'a cependant pas d'activité catalytique. En effet, au lieu d'avoir la séquence His-Arg-Asp-Leu requise pour le phosphotransfert chez les protéines kinases, le KHD contient la séquence His-Gly-Asn-Leu. La structure du KHD a été modélisée par homologie, à partir des structures connues du domaine tyrosine kinase du récepteur de l'insuline et de la kinase des

cellules hématopoïétiques (HCK) (Duda, Yadav et al. 2000). Le KHD aurait une structure en 2 lobes typiques des kinases avec un petit lobe N-terminal formé d'un feuillet β antiparallèle à 4 brins et d'une hélice α et un lobe C-terminal plus gros composé d'hélices α et de 2 brins β . Dans ce modèle, l'interface entre les 2 lobes formerait le site de liaison de l'ATP (**Figure 2.11**). Des changements de conformations du KHD induit par la liaison de l'ATP ont été proposés à partir de ce modèle. Ces prédictions restent à être confirmées par des structures expérimentales (Duda, Venkataraman et al. 2005).

Le KHD semble fonctionner comme un élément régulateur négatif puisque sa délétion par mutagenèse génère un récepteur constitutivement actif, qui ne répond plus ni à l'ANP ni à l'ATP (Chinkers and Garbers 1989; Schulz, Singh et al. 1989). Ce rôle de régulateur négatif du KHD a également été observé lors d'expériences de protéolyse. En effet, la protéolyse limitée du domaine cytoplasmique de NPRA augmente l'activité guanylate cyclase (Chen, Song et al. 2001).

La présence d'ATP semble requise dans l'activation du NPRA par l'ANP. De plus, cet effet d'ATP est perdu pour les mutants du NPRA dont le KHD a été supprimé, suggérant qu'une des fonctions du KHD est de lier l'ATP (Chinkers and Garbers 1989; Chinkers, Singh et al. 1991). L'utilisation d'analogues non-hydrolysables de l'ATP a confirmé que le rôle activateur de l'ATP n'impliquait pas de conversion catalytique de l'ATP en ADP ou en substrat pour la phosphorylation (Chinkers, Singh et al. 1991; Larose, McNicoll et al. 1991). Une étude a également démontré que le NPRA purifié à homogénéité est toujours sensible à l'ATP, ce qui indique que cette activation ne nécessite pas l'intervention d'une autre protéine. La liaison spécifique de l'ATP au KHD a été démontrée de façon directe grâce à l'utilisation d'un analogue photoactivable de l'ATP (Joubert, Jossart et al. 2005). De plus, la liaison de cet analogue est favorisée par un pré-traitement du récepteur à l'ANP, suggérant que la liaison de l'ANP favorise la liaison de l'ATP au KHD. L'analogue photoactivable inhibe également la liaison de l'ANP, tout comme l'ATP. Il a donc été suggéré que la liaison de l'ANP à l'ECD initiait un changement de conformation du KHD permettant la liaison de l'ATP et la levée de la répression de l'activité guanylate cyclase. De plus, la liaison de l'ATP aurait pour autre effet

majeur d'augmenter la vitesse de dissociation de l'ANP. Une séquence riche en glycine du KHD, ressemblant à la séquence consensus de liaison de l'ATP dans la plupart des protéines kinases, a été proposée comme site de liaison de l'ATP. Certaines mutations dans cette région semblaient en effet diminuer la réponse du NPRA à l'ANP (Goracznik, Duda et al. 1992). Cependant, une étude consécutive a suggéré que la diminution de l'activité associée à ces mutations était due à une déphosphorylation du récepteur, et non à une réduction de la liaison de l'ATP (Potter and Hunter 1998). En fait, la mutation des glycines du motif en alanine n'a pas d'effet sur l'activité du NPRA induite par l'ANP, ce qui suggère fortement que l'ATP ne se lie pas à ce motif (Koller, Lipari et al. 1993).



Figure 2.12 : Sites de phosphorylation dans le KHD de NPRA.

Le KHD du NPRA présente également 6 sites de phosphorylations, identifiés grâce à une combinaison de méthodes : marquage métabolique, analyse d'acides aminés phosphorylés, cartographie de phosphopeptides et mutagenèse dirigée. À l'état de base, le NPRA est phosphorylé sur 4 sérines (Ser497, Ser502, Ser506 et Ser510) et 2 thréonines (Thr500 et Thr513) (Potter and Hunter 1999) (**Figure 2.12**). L'exposition du NPRA à une dose saturante d'ANP est suivie par une réduction du niveau de phosphorylation du récepteur concomitante à une diminution de la production de GMPc (Potter and Garbers 1992). Le remplacement de n'importe lequel de ces résidus par une alanine produit le même phénomène (Potter and Hunter 1999). La diminution de l'activité guanylate cyclase la plus drastique est obtenue par la substitution de la Ser497. La mutation de 5 des 6 sites de phosphorylation par une alanine inhibe complètement l'activité du NPRA, alors que leur remplacement par un glutamate, qui mime la charge négative du groupement phosphate, restaure la réponse du NPRA à l'ANP (Potter and Hunter 1999). Ce phénomène de désensibilisation à l'ANP est également observé quand on force la déphosphorylation enzymatique du récepteur avec la phosphatase 2A (Potter and Garbers 1992). Il a été proposé que la

déphosphorylation du KHD entraînerait une diminution de l'affinité de l'ANP pour l'ECD, facilitant ainsi sa relâche (Potter and Hunter 2001). La mutation de résidus non phosphorylés, dans la région de phosphorylation du KHD, induit également une diminution de l'activité du NPRA suggérant que la structure de cette région est importante pour l'activation maximale du récepteur (Potter and Hunter 1999). Le KHD a donc 2 fonctions régulatrices de l'activité du NPRA, une portée par son site de liaison à l'ATP et l'autre par ses sites de phosphorylations. Il n'a encore jamais été démontré si et comment ces 2 fonctions sont liées.

c. Le domaine de dimérisation

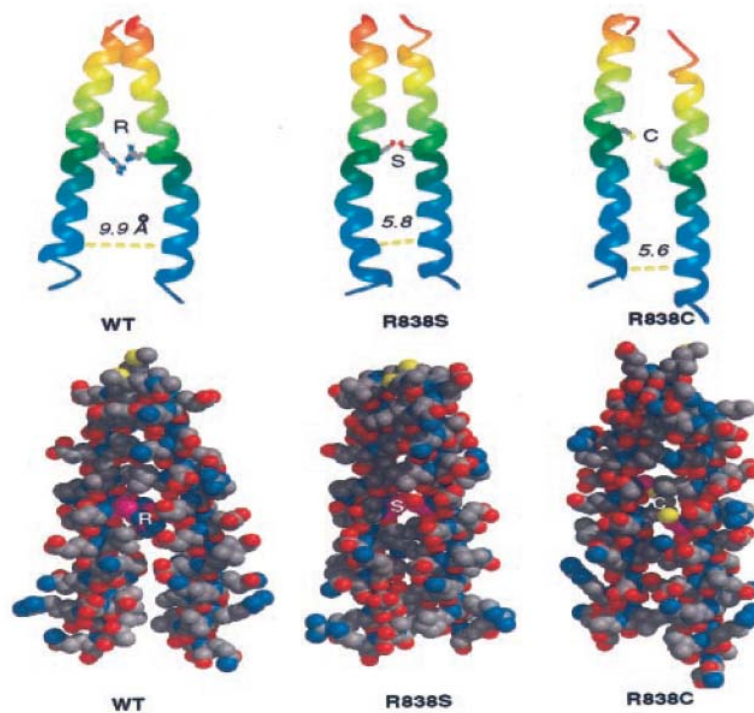


Figure 2.13 : Modèle de la structure en hélice enroulée du domaine de dimérisation de GC-E : interactions ioniques impliquées dans la régulation de l'activité guanylate cyclase. Les structures sont colorées en rouge pour l'extrémité N-terminale et en bleu pour l'extrémité C-terminale. Dans le domaine de dimérisation WT les résidus Arg⁸³⁸, impliqués dans un petit réseau de ponts salins, maintiennent à distance les régions C-terminale des 2 hélices α , empêchant la dimérisation et l'activation du domaine guanylate cyclase. La substitution des résidus Arg par une Ser ou une Cys déstabilise le réseau de ponts salins, les 2 hélices restent alors solidement enroulées, maintenant le domaine guanylate cyclase dans sa forme dimérique constitutivement active.

D'après (Ramamurthy, Tucker et al. 2001).

La région entre le KHD et le domaine guanylate cyclase pourrait former une structure en hélices enroulées, qui serait en partie responsable de l'homodimérisation du récepteur (Chinkers and Wilson 1992). Une élégante étude basée sur la technologie double-hybride et la délétion par mutagenèse, a démontré que ce domaine était nécessaire pour la dimérisation d'une forme soluble du domaine intracellulaire de NPRA (Wilson and Chinkers 1995). De plus, ce domaine de dimérisation semble nécessaire au fonctionnement normal de plusieurs GCm. Ainsi la mutation L827R dans le domaine de dimérisation du NPRA a un effet préjudiciable sur l'activité. D'autre part, la mutation de l'Arg838 dans le domaine de dimérisation de la GC-E est liée à une maladie dégénérative de la rétine. Cette mutation causerait une activation constitutive de GC-E. En effet, une étude de modélisation moléculaire a montré que l'Arg838 est impliquée dans un phénomène de répulsion électrostatique qui maintient les hélices à distance. La mutation de l'Arg838 éliminerait ce phénomène de répulsion entraînant un rapprochement des hélices et une activation constitutive du récepteur (Ramamurthy, Tucker et al. 2001) (**Figure 2.13**). Ces résultats laissent suggérer, que le domaine de dimérisation joue un rôle dans la transduction du signal d'activation du KHD vers le domaine guanylate cyclase. La liaison de l'ANP pourrait induire une rotation ou un déplacement latéral des hélices du domaine de dimérisation, brisant le phénomène de répulsion et permettant un rapprochement des hélices. Ce rapprochement des hélices entraînerait alors un rapprochement des domaines guanylates cyclases qui se trouveraient dans une conformation adéquate à la catalyse enzymatique (Ramamurthy, Tucker et al. 2001).

d. Le domaine guanylate cyclase

Le domaine guanylate cyclase (GC) du NPRA est responsable de la catalyse du GTP en GMPc et pyrophosphate. Il doit être sous forme dimérique pour être actif (Ramamurthy, Tucker et al. 2001). Sa structure a été modélisée par homologie, à partir du domaine C2 catalytique de l'adénylate cyclase, qui a été cristallisé comme un homodimère (Zhang, Liu et al. 1997). L'adénylate cyclase est normalement formée de 2 domaines différents C1 et C2, qui s'assemblent pour former un domaine catalytique asymétrique. Dans ce modèle, les 2 sous unités s'associent en tête à queue pour former 2 sites de liaison pour le GTP, les sous unités participant conjointement à la formation de chaque site (Liu, Ruoho et al. 1997) (**Figure 2.14**). L'existence de 2

sites catalytiques fonctionnels a été confirmée par mutagenèse dirigée. Ainsi, une construction du domaine GC de NPRA soluble, dont un des 2 sites catalytiques potentiels a été inactivé montre la même activité qu'une construction soluble WT (Joubert, McNicoll et al. 2007). Ces résultats suggèrent également que les 2 sites catalytiques ne fonctionnent pas en même temps, mais plutôt en alternance. En présence de Mg^{2+} , une coopérativité positive est observée, c'est-à-dire que la liaison du GTP sur un site catalytique favorise la liaison d'une molécule de GTP sur l'autre site.

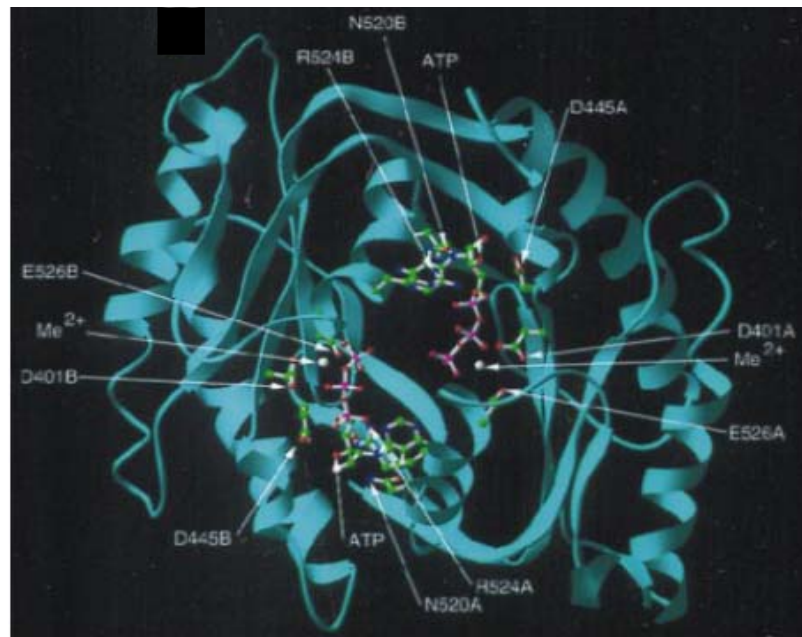


Figure 2.14 : Modèle structural du domaine guanylate cyclase de NPRA. D'après (Liu, Ruoho et al. 1997).

1.2. Le récepteur B des peptides natriurétiques

1.2.1. Expression

Le gène codant pour le NPRB humain (*Npr2*) est localisé sur le chromosome 9p21-12. Comme le gène du NPRA, il est composé de 22 exons et 21 introns (Lowe, Klisak et al. 1990; Rehemudula, Nakayama et al. 1999).

L'ARNm codant pour le NPRB est retrouvé dans de nombreux tissus comme le cerveau, les reins, les glandes surrénales, les poumons et l'utérus (**Tableau 2.1**). C'est le récepteur des peptides natriurétiques le plus exprimé dans le cerveau. Il est également retrouvé dans les fibroblastes, les os et le muscle lisse vasculaire (Potter, Abbey-Hosch et al. 2006; Potter, Yoder et al. 2009).

Comme pour le NPRA, la transcription basale du NPRB est gouvernée par une série de sites régulateurs SP-1 situés entre -118 et -83 sur le promoteur du gène (Gardner, Chen et al. 2007). L'expression du NPRB est également régulée par son ligand, par les niveaux intracellulaires d'AMPc, par la privation d'eau, par le TGF- β 1, par la dexaméthasone et par le statut en sodium du rein (Garg and Pandey 2005). L'expression du NPRB est également régulée par épissage alternatif (Hirsch, Skutta et al. 2003; Tamura and Garbers 2003). Trois isoformes de NPRB ont été identifiées, NPRB1 étant le récepteur pleine longueur répondant de façon maximale au CNP. L'isoforme NPRB2 contient une délétion de 25 acides aminés dans le KHD et NPRB3 contient un ECD partiel incapable de lier le ligand. Les niveaux d'expression relatifs de ces 3 isoformes varient selon les tissus. Les 2 isoformes alternatives du NPRB agissent comme des dominants négatifs en bloquant la formation d'homodimère actif de NPRB1. Elles pourraient jouer un rôle important dans la régulation tissu-spécifique du récepteur.

1.2.2. Structure

Le NPRB présente la même topologie générale que le NPRA (**Figure 2.5**). L'ordre des affinités des peptides natriurétiques pour le NPRB est le suivant : CNP \gg ANP \geq BNP (Bennett, Bennett et al. 1991; Koller, Lowe et al. 1991; Suga, Nakao et al. 1992). La présence de ponts disulfures dans l'ECD de NPRB n'a pas été confirmée chimiquement, mais des études de mutagenèse suggèrent la présence de ponts disulfures entre les résidus Cys53-Cys79, Cys205-Cys314 et Cys417-Cys426 (Langenickel, Buttgerit et al. 2004). Comme pour NPRA, l'ECD de NPRB est glycosylé. Les sites de glycosylation n'ont pas été déterminés chimiquement, mais des études de mutagenèse dirigée ont montré que 5 des 7 asparagines extracellulaires étaient glycosylées (Fenrick, McNicoll et al. 1996; Fenrick, Bouchard et al. 1997). La

mutation de l'Asn24 en acide aspartique inhibe la liaison du peptide de 90 %. Ce phénomène serait dû à un mauvais repliement de l'ECD lors de sa synthèse ou à un problème de transport du NPRB vers la membrane. La structure cristalline de l'ECD de NPRB n'a pas encore été résolue, mais un modèle structural du complexe NPRB/CNP a été obtenu à partir des cristaux de NPRA et NPRC en complexe avec leur ligand respectif (He, Dukkupati et al. 2006). Comme attendu, puisqu'ils sont homologues en séquence, les ECD de NPRA et NPRB auraient des structures similaires d'après ce modèle.

Le KHD du NPRB joue le même rôle de répresseur de l'activité guanylate cyclase que le KHD du NPRA. Sa délétion entraîne une activation constitutive du récepteur (Koller, de Sauvage et al. 1992). L'ATP est également un activateur allostérique du NPRB. Les KHD du NPRA et du NPRB sont de plus interchangeables, suggérant qu'ils ont le même rôle.



Figure 2. 15 : Sites de phosphorylation dans le KHD de NPRB

Le KHD de NPRB est phosphorylé sur 5 résidus, trois sérines (Ser518, Ser523 et Ser 526) et 2 thréonines (Thr513 et Thr516) (**Figure 2.15**). Quatre de ces sites sont identiques à ceux retrouvés dans le NPRA. Comme le NPRA, le NPRB est phosphorylé à l'état de base et son niveau de phosphorylation diminue après exposition prolongée au CNP. Cette diminution du contenu en phosphate est également corrélée avec une diminution de la production de GMPc, comme pour le NPRA. La mutation de n'importe quel site de phosphorylation par une alanine induit d'ailleurs une diminution de l'activité induite par le CNP (Potter and Hunter 1998).

1.3. Le récepteur C des peptides natriurétiques

1.3.1. Expression

Le gène codant pour le NPRC humain (*NPR3*) est situé sur le chromosome 5p14p13. Il couvre plus de 65 Kb et contient 8 exons et 7 introns (Lowe, Klisak et al. 1990; Rahmutula, Nakayama et al. 2002).

NPRC est le récepteur des peptides natriurétiques le plus largement et le plus abondamment exprimé. Par exemple, il constitue environ 94% du total des sites de liaison à l'ANP dans les cellules endothéliales (Leitman, Andresen et al. 1986). Le NPRC et/ou son ARNm sont entre autres exprimés dans les surrénales, le cœur, le cerveau, les reins et le muscle lisse vasculaire (**Tableau 2.1**).

Le promoteur du gène du NPRC fait 2,3 Kb et contient de nombreux éléments régulateurs potentiels : une boîte TATA, une boîte CAAT, un élément de réponse à l'AMPc, les sites AP-1, AP-2 et SP-1, et deux éléments de réponse aux forces de cisaillement. L'expression du NPRC est inhibée par ses ligands, par le GMPc, par certaines hormones (Ang II, ET-1 et AVP), par certains facteurs de croissance (FGF, PDGF et EGF), par un apport en sel, par les bloqueurs β -adrénergiques et dans certaines conditions pathophysiologiques comme l'hypertrophie cardiaque. Au contraire, l'expression du NPRC est augmentée par TGF- β 1, la vitamine D et en cas d'IC chronique (Anand-Srivastava 2005; Garg and Pandey 2005).

1.3.2. Structure

L'ECD de NPRC présente 30% d'homologie de séquence en acides aminés avec le NPRB, mais il ne contient qu'un petit domaine intracellulaire de 37 acides aminés, dépourvu d'activité guanylate cyclase (Fuller, Porter et al. 1988). L'ordre des affinités des peptides natriurétiques pour le NPRC est le suivant : ANP \geq CNP > BNP (Bennett, Bennett et al. 1991; Suga, Nakao et al. 1992). Cette différence d'affinité entre les peptides pourrait contribuer à la plus longue demi-vie du BNP comparée à l'ANP ou au CNP. L'ECD du NPRC possède 2 paires de ponts disulfures intrachânes entre Cys63-Cys91 et Cys168-Cys216, qui sont conservés dans le NPRB et le NPRC. De plus, un pont disulfure interchaîne a été identifié dans le NPRC bovin

au niveau de la Cys469, alors que le NPRC humain comporte 2 ponts disulfures interchaînes, au niveau des Cys428 et Cys431 (Itakura, Iwashina et al. 1994; Stults, O'Connell et al. 1994). Le NPRC, contrairement au NPRA et au NPRB est donc un homodimère covalent. L'ECD de NPRC est également glycosylé sur les résidus Asn41, Asn248 et Asn349.

Les structures cristallines du NPRC seul ou lié au CNP ont indiqué une stœchiométrie ligand : récepteur de 1:2 avec une interface de dimérisation distale (forme en «A») (He, Chow et al. 2001). La liaison du CNP induit une fermeture de 20 Å des domaines proximaux du dimère (**Figure 2.16**). L'ECD de NPRC a également été cristallisé en présence d'ANP et de BNP et montre une structure similaire à celle du complexe NPRC/CNP (He, Dukkupati et al. 2006).

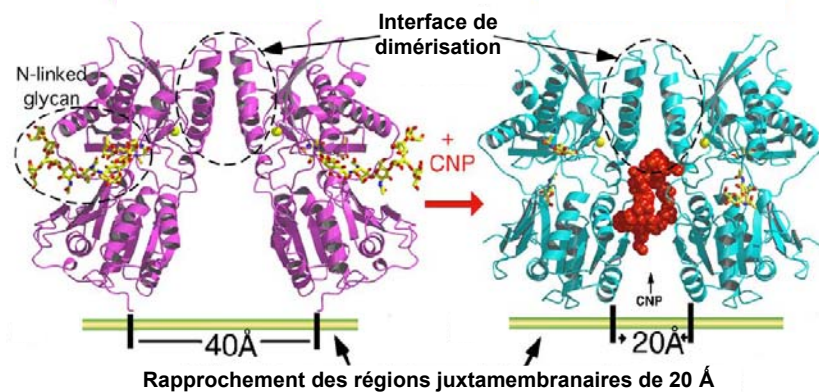


Figure 2.16 : Structures cristallines du NPRC non lié (à gauche) et en complexe avec le CNP (en rouge, à droite). Modifié de (He, Dukkupati et al. 2005).

Le domaine intracellulaire du NPRC serait phosphorylé sur certains résidus sérine suite à la liaison des peptides natriurétiques (Levin 1993; Pedro, Fenrick et al. 1998; Silberbach and Roberts 2001). Il contient également 4 régions partageant des similarités avec la séquence activatrice de la protéine G hétérotrimérique G_i , caractérisée par 2 acides aminés basiques en N-terminal et une séquence BBXXB en C-terminal où B représente un résidu basique et X un résidu non basique (Pagano and Anand-Srivastava 2001). Une séquence de 17 acides aminés, située au milieu du domaine intracellulaire, a été identifiée comme une séquence activatrice fonctionnelle

de la protéine Gi. Dans cette étude, il a été démontré que cette séquence était impliquée dans l'activation de G α 1 et G α 2, qui inhibent l'adénylate cyclase et activent la phospholipase C (PLC) (Zhou and Murthy 2003). Le rôle de cette séquence a été confirmé par mutagenèse dirigée. Les récepteurs mutés dans cette séquence perdent leur habileté à inhiber l'adénylate cyclase et à activer la PLC. Plusieurs observations avaient auparavant suggéré que le rôle du NPRC n'était pas seulement de retirer les peptides natriurétiques de la circulation, mais qu'il avait aussi des fonctions de signalisation. Il avait d'abord été démontré que l'ANP était capable d'inhiber l'adénylate cyclase dans les cardiomyocytes, de manière dose dépendante. L'ANP était également capable d'inhiber les effets stimulateurs des activateurs de l'adénylate cyclase (Anand-Srivastava and Cantin 1986). Des études plus détaillées du mécanisme par lequel l'ANP pouvait inhiber l'adénylate cyclase suggéraient l'implication de la protéine Gi. Le rôle de la protéine Gi a été confirmé par l'utilisation de la toxine pertussique, qui atténue fortement l'inhibition de l'adénylate cyclase induite par l'ANP (Anand-Srivastava, Srivastava et al. 1987). L'étude du rôle du NPRC dans l'inhibition de l'adénylate cyclase induite par l'ANP a été rendu possible grâce à l'utilisation de l'agoniste sélectif au NPRC, C-ANP (Maack, Suzuki et al. 1987). C-ANP est un ANP sans queue C-terminale et présentant une délétion au niveau de la boucle de 17 acides aminés. Le C-ANP mime l'inhibition de l'adénylate cyclase induite par l'ANP, sans avoir d'effet sur les niveaux de GMPc, confirmant que cette inhibition ne passe pas par le NPRC et une augmentation de GMPc. De plus, l'effet du C-ANP est inhibé par la toxine pertussique, confirmant le rôle de la protéine Gi (Anand-Srivastava, Sairam et al. 1990). L'inhibition de l'adénylate cyclase par l'ANP peut également être bloquée par un anticorps dirigé contre le domaine intracellulaire du NPRC (Anand-Srivastava, Sehl et al. 1996). De même, des fragments peptidiques du domaine intracellulaire miment l'inhibition induite par l'ANP (Pagano and Anand-Srivastava 2001). Toutes ces études suggèrent donc que les peptides natriurétiques, par leur liaison au NPRC, et par l'intermédiaire de la protéine Gi, sont capables d'inhiber l'adénylate cyclase. Le NPRC a également été impliqué dans l'activation de la PLC par l'ANP, cependant, il n'a pas été déterminé si son action sur la PLC était directe. En effet, l'activation de la PLC peut être induite par une diminution de la concentration d'AMPc qui est une conséquence de l'inhibition de l'adénylate cyclase.

1.4. Désensibilisation du NPRA et du NPRB

1.5.1 Désensibilisation homologue

Avec l'identification de sites spécifiques de phosphorylation, il est devenu clair que des changements dans le statut de phosphorylation du NPRA et du NPRB modulent directement leur activité. Ainsi, à l'état de base, NPRA et NPRB sont pleinement phosphorylés et une exposition à leur ligand respectif entraîne une déphosphorylation dépendante du temps qui est corrélée avec une perte d'activité induite par le ligand (désensibilisation homologue). Des expériences de cartographie de phosphopeptides tryptiques ont été réalisées pour déterminer quels sites de phosphorylation étaient déphosphorylés après exposition des récepteurs à leur ligand (Potter and Garbers 1994; Potter 1998). Bien que l'exposition des cellules exprimant NPRA ou NPRB à leur ligand menait à une déphosphorylation significative des récepteurs, les phosphopeptides obtenus avec les récepteurs traités ou non avec leur ligand étaient qualitativement similaires. Ainsi, la déphosphorylation ne peut pas être attribuée à la perte d'un phosphopeptide spécifique malgré une diminution claire du contenu en phosphate du récepteur. Une des explications pour cette contradiction apparente serait que l'exposition au ligand entraîne la déphosphorylation complète d'une sous-population de récepteurs, alors que le reste des récepteurs n'est pas déphosphorylé. Une autre possibilité serait qu'un site spécifique soit déphosphorylé en réponse à la liaison du ligand, mais que le phosphopeptide contenant ce site soit perdu pendant le processus de purification. Ceci expliquerait pourquoi ce phosphopeptide n'apparaît pas dans les analyses avec NPRA ou NPRB contrôle ou désensibilisé. L'augmentation de la concentration en GMPc n'est pas impliquée dans la désensibilisation homologue des récepteurs aux peptides natriurétiques. En effet, l'exposition du NPRA à des analogues du GMPc n'affecte pas son activité (Potter and Garbers 1994).

1.5.2 Désensibilisation hétérologue

On appelle désensibilisation hétérologue, tout processus, autre qu'une exposition prolongée au ligand, qui réduit l'activité du récepteur. La désensibilisation hétérologue est donc complètement indépendante de la liaison des peptides natriurétiques. En général, les hormones ou les facteurs de croissance qui stimulent la

vasoconstriction, la croissance cellulaire ou la prolifération antagonisent l'action des peptides natriurétiques par désensibilisation hétérologue. Par exemple, l'Ang II, l'AVP, l'acide lysophosphatidique, la shingosine-1-phosphate, le facteur de croissance dérivé des plaquettes (PDGF), le facteur de croissance des fibroblastes (FGF) et l'ET-1 sont des facteurs qui inhibent NPRA et/ou NPRB (Potter, Abbey-Hosch et al. 2006). Ces agents se lient à des tyrosines kinases ou des récepteurs à 7 passages transmembranaires qui activent la PLC, qui convertit le phosphatidylinositol 1,4-bisphosphate en diacylglycerol et inositol 1,4,5-triphosphate (IP3). Le diacylglycerol active alors la PKC et l'IP3 se lie sur des récepteurs du réticulum sarcoplasmique ou endoplasmique pour augmenter les concentrations intracellulaires de calcium.

Initialement, la PKC a été impliquée dans le processus de désensibilisation hétérologue, car le traitement de cellules exprimant NPRA ou NPRB avec du PMA, un activateur pharmacologique de la PKC, diminue de façon marquée l'activité guanylate cyclase induite par les peptides natriurétiques (Potter and Garbers 1994; Potter and Hunter 2000). Cette diminution de l'activité guanylate cyclase a ensuite été corrélée avec la déphosphorylation du récepteur et il a été démontré qu'un inhibiteur de la PKC bloquait la désensibilisation du NPRA induite par l'Ang II. (Haneda, Kikkawa et al. 1991; Potter and Garbers 1994). De même, un inhibiteur de la PKC bloque la désensibilisation du NPRB induite par l'ET-1 (Tokudome, Horio et al. 2004). L'activation de la PKC entraînerait la déphosphorylation d'un seul ou d'une partie des sites de phosphorylation. Des analyses de phosphopeptides tryptiques réalisées sur le NPRB ont montré que la Ser523 était déphosphorylée et que la phosphorylation de la Ser528 était augmentée en réponse à l'activation de la PKC. La mutation de la Ser523 en glutamate prévient l'inhibition du NPRB, indiquant que sa déphosphorylation est requise pour la désensibilisation PKC-dépendante du NPRB (Potter and Hunter 2000). Le NPRA est également sélectivement déphosphorylé suite à l'activation de la PKC, mais les sites de phosphorylation impliqués n'ont pas été identifiés (Potter and Garbers 1994).

Il existe aussi des évidences de l'existence d'une voie de désensibilisation du NPRB indépendante de la PKC. L'incubation des cellules de muscle lisse vasculaire

A10, qui expriment le NPRB de façon endogène, avec de l'AVP entraîne une diminution de l'activité guanylate cyclase. Cet effet est indépendant de la PKC puisque ni un inhibiteur, ni la régulation négative de la PKC ne sont capables d'inhiber cette désensibilisation. Cette observation suggère que la deuxième voie de signalisation de la PLC, la voie de l'IP3 et du calcium, pourrait être impliquée. En effet, l'AVP augmente les concentrations de calcium dans ces cellules. De plus, l'ionomycine, un ionophore de calcium, mime les effets de l'AVP, et un chélateur de calcium perméable aux cellules bloque la désensibilisation AVP-dépendante (Abbey and Potter 2002). Ces résultats indiquent donc que l'augmentation de la concentration en calcium, et non la PKC, est requise pour la désensibilisation du NPRB AVP-dépendante. Une désensibilisation indépendante de la PKC a aussi été observée avec l'acide lysophosphatidique et le sphingosine-1-phosphate (Abbey and Potter 2003; Abbey-Hosch, Cody et al. 2004)

1.5.3 Kinases et phosphatases des récepteurs aux peptides natriurétiques

Bien qu'il soit maintenant clair que la désensibilisation du NPRA et du NPRB est corrélée avec la déphosphorylation du récepteur, le mécanisme de déphosphorylation reste relativement inexploré. Théoriquement, la déphosphorylation d'une protéine est le résultat d'une réduction de la phosphorylation, d'une augmentation de la déphosphorylation ou des 2 processus conjugués. La réduction de la phosphorylation peut être la conséquence d'une diminution de l'activité kinase. Elle peut aussi résulter d'un changement de conformation de la cible de la kinase, qui devient un substrat moins efficace pour la kinase. De façon similaire, l'augmentation de la déphosphorylation peut être une conséquence de l'augmentation de l'activité phosphatase ou de changements de conformation qui font de la cible un meilleur substrat pour la phosphatase. Dans ce sens, une étude élégante effectuée sur le NPRA exprimé dans des cellules HEK293 a démontré que la désensibilisation homologue du récepteur était essentiellement régulée par une diminution de l'activité kinase sans augmentation significative du taux de déphosphorylation du NPRA (Joubert, Labrecque et al. 2001).

Peu de choses sont connues à propos des kinases et des phosphatases qui régulent l'activité des récepteurs aux peptides natriurétiques. Il y a quelques années, il a été démontré, par la méthode de double-hybride chez la levure, que la protéine phosphatase 5 (PP5) s'associait avec le KHD du NPRA (Chinkers 1994). Cependant, cette association n'a jamais été rapportée chez les mammifères. Plus récemment, il a été rapporté que le NPRA était déphosphorylé par 2 protéines phosphatases distinctes. La première phosphatase était inhibée par la microcystine, mais n'était pas affectée par le magnésium ou le chélateur de métaux divalents EDTA. La 2^{ème} au contraire, était insensible à la microcystine, mais requérait la présence de magnésium ou de manganèse pour son activité. Puisque les effets de la microcystine et de l'EDTA étaient additifs et que la microcystine ne bloquait pas la désensibilisation magnésium-dépendante, il a été conclu que 2 phosphatases aux propriétés uniques étaient responsables de la déphosphorylation du NPRA (Bryan and Potter 2002). La phosphatase sensible à la microcystine avait déjà été décrite auparavant (Foster and Garbers 1998). Les phosphatases sensibles à la microcystine qui pourraient être candidates sont : PP1, PP2A, PP4, PP5 et PP6 (Sheppeck, Gauss et al. 1997). Les phosphatases PP2C et PP7 sont les seules sérine/thréonine phosphatases connues qui requièrent du magnésium pour leur activité et qui ne sont pas sensibles à la microcystine. Un criblage double-hybride chez la levure, a montré que la protéine kinase I sensible au GMPc (PKGI) interagissait avec le NPRA. Les investigateurs concluaient que la PKGI phosphorylait et activait le NPRA parce qu'une co-transfection de PKGI avec NPRA augmentait l'activité guanylate cyclase induite par l'ANP (Airhart, Yang et al. 2003). Cependant, il avait été démontré auparavant que l'exposition du NPRA à des homologues du GMPc ou l'augmentation des concentrations de GMPc dans la cellule n'avait pas d'effet sur l'activité du récepteur (Potter and Garbers 1994; Fortin and De Lean 2006). Une autre étude sur l'implication de PKGI dans la phosphorylation du NPRA a conclu que la PKGI n'avait pas d'effet sur l'activité du NPRA, et que si l'association entre NPRA et PKGI existe, c'est seulement pour augmenter la sensibilité et la spécificité de la signalisation du NPRA, pas pour augmenter l'état de phosphorylation du récepteur (Bryan, Smirnov et al. 2006). Enfin, la protéine phosphatase calcineurine, sensible au calcium, pourrait être impliquée dans la désensibilisation hétérologue du NPRA. En

effet, les inhibiteurs de calcineurine bloquent la désensibilisation de NPRA calcium-dépendante (Fortin and De Lean 2006).

1.5. Mécanisme d'activation du NPRA

Les études réalisées jusqu'à ce jour ont permis de dresser un modèle d'activation et de désensibilisation du NPRA (**Figure 2.17**). À l'état de base, le KHD est phosphorylé sur 6 résidus (4 sérines et 2 thréonines, les phosphates sont représentés par des sphères jaunes) et agit comme répresseur de l'activité guanylate cyclase. La liaison de l'ANP au domaine extracellulaire induit un changement de conformation au niveau des domaines juxtamembranaires, transmis au domaine intracellulaire à travers la membrane plasmique. La répression imposée par le KHD sur le domaine guanylate cyclase est alors levée et l'activité guanylate cyclase augmente d'environ 10 fois (état d'activation intermédiaire; les niveaux d'activation de la guanylate cyclase sont notés entre parenthèses). Ce changement conformationnel permet également la liaison de l'ATP au KHD, qui induit alors un 2^{ième} changement de conformation, rendant la guanylate cyclase pleinement active (niveau d'activité 100 fois supérieur au niveau de base). La liaison de l'ATP a aussi pour conséquence d'augmenter la vitesse de dissociation de l'ANP. Une exposition prolongée au ligand stimule la déphosphorylation du KHD : le NPRA est alors dans un état désensibilisé très peu actif (2,5 fois le niveau de base) qui ne répond plus au ligand. La déphosphorylation du récepteur se produit suite à une diminution de l'activité kinase. La dissociation de l'ANP et de l'ATP ainsi que la rephosphorylation du KHD permettent ensuite le retour du NPRA à son état de base.

Le mécanisme d'activation du NPRB a été moins étudié, mais les résultats obtenus jusqu'à maintenant laissent croire que son mécanisme d'activation serait similaire à celui du NPRA. En effet, l'effet allostérique de l'ATP et le mécanisme de désensibilisation par déphosphorylation ont aussi été démontrés pour le NPRB. La grande homologie de séquence entre les 2 récepteurs le laissait déjà suggérer.

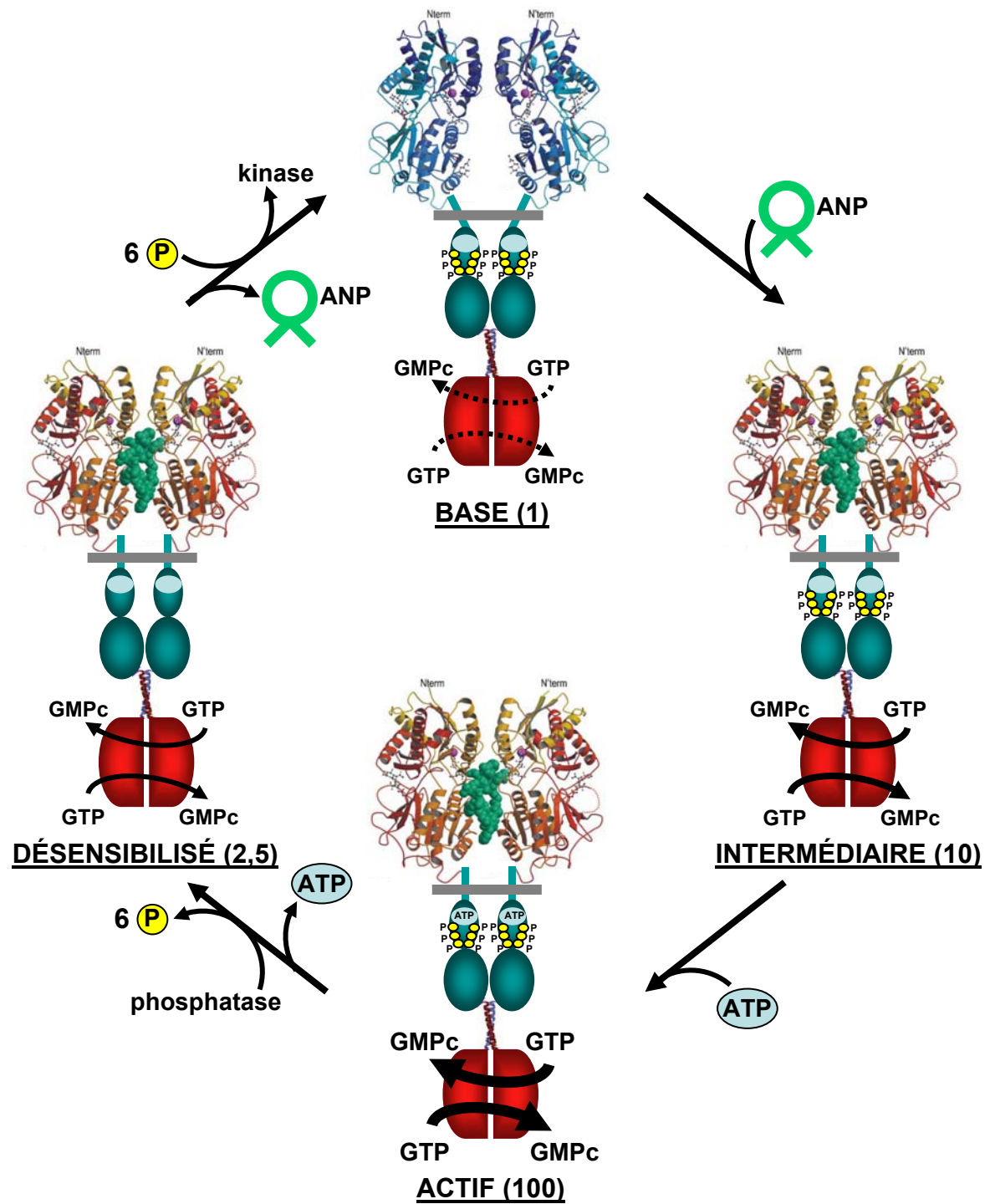


Figure 2.17 : Modèle hypothétique d'activation et de désensibilisation du NPRA.

1.6. Internalisation des récepteurs aux peptides natriurétiques

L'internalisation du récepteur et la dégradation subséquente du ligand est un des moyens de mettre fin aux signaux extracellulaires médiés par les récepteurs

membranaires. Dans le cas des récepteurs aux peptides natriurétiques, il y a une controverse concernant l'internalisation de NPRA et NPRB, alors que l'internalisation et le recyclage du NPRC à la membrane sont très largement acceptés.

Pandey et ses collaborateurs ont rapporté que le NPRA, surexprimé dans plusieurs lignées cellulaires, était internalisé après stimulation à l'ANP. Cette internalisation était suivie d'une dégradation de la majorité du récepteur avec une faible proportion recyclée à la membrane (Pandey 2005). Au contraire, Maack et ses collaborateurs, en utilisant des cellules primaires de rein ou des transfectants stables de NPRA dans les cellules CHO, n'ont observé ni endocytose ni dégradation de l'ANP dans les lysosomes (Koh, Nussenzveig et al. 1992; Vieira, Gao et al. 2001). De même, Jewett et ses collaborateurs, ont montré que les cellules HEK293 exprimant le NPRA, lient moins l'ANP avec le temps, mais que ce phénomène était dû à une diminution de l'affinité du NPRA pour l'ANP et non à une diminution de la quantité de récepteurs à la surface de la cellule (Jewett, Koller et al. 1993). Finalement, Fan et ses collaborateurs, n'ont pas réussi à observer d'internalisation ou de recyclage du NPRA et n'ont pas retrouvé de produit de dégradation de l'ANP dans le milieu de culture de cellule HEK293 exprimant le NPRA (Fan, Bryan et al. 2005). Une seule étude a été réalisée pour étudier l'internalisation du NPRB. Aucune évidence d'internalisation ou de recyclage n'a été observée (Fan, Bryan et al. 2005). Il est à noter que l'internalisation du NPRA n'a été observée qu'en cas de surexpression à des niveaux jusqu'à 100 fois supérieurs au niveau d'expression physiologique. Dans ces conditions, il est possible que le NPRA soit internalisé de façon non-spécifique, puis dégradé dans les lysosomes.

Comme de nombreux récepteurs transmembranaires pour les nutriments, comme la transferrine ou les récepteurs des lipoprotéines de faible densité (LDL), l'internalisation du NPRC est constitutive. En d'autres mots, elle est indépendante de la liaison du ligand (Nussenzveig, Lewicki et al. 1990). L'internalisation du NPRC est inhibée par un traitement au sucrose hypertonique, qui cause le désassemblage de la clathrine, suggérant que le mécanisme d'endocytose est médié par des puits tapissés de clathrine (Cohen, Koh et al. 1996). L'hydrolyse du ¹²⁵I-ANP est également inhibée par un traitement des cellules au NH₄Cl ou à la chloroquine,

suggérant que le ligand lié au NPRC subit une hydrolyse lysosomale suivie par le recyclage du récepteur à la membrane (Nussenzveig, Lewicki et al. 1990; Fan, Bryan et al. 2005).

1.7. Protéines d'interactions

De façon surprenante, très peu de protéines d'interaction aux récepteurs des peptides natriurétiques ont été identifiées. La protéine phosphatase PP5 et la PKGI ont été suggérées comme candidates potentielles grâce à des études double-hybride chez la levure (Chapitre 2.A.1.5.3) (Chinkers 1994; Airhart, Yang et al. 2003). L'interaction du NPRA avec la PP5 reste cependant à être démontrée dans les cellules de mammifères. La colocalisation de NPRA et PKGI à la membrane a été démontrée dans les cellules HEK293 et les cardiomyocytes. PKGI est transloquée à la membrane suite à l'activation du NPRA par l'ANP. Par contre, l'interaction directe entre NPRA et PKGI n'a pas pu être confirmée dans ces cellules (Airhart, Yang et al. 2003; Bryan, Smirnov et al. 2006).

Le NPRA exprimé dans les cellules HEK293 interagit avec les protéines HSP70 et HSP90, des chaperonnes moléculaires qui sont requises pour le repliement adéquat des protéines et/ou leur transport. Il a été suggéré qu'HSP90 se liait au KHD de NPRA puisque la délétion du KHD ou du domaine intracellulaire inhibe l'interaction (Kumar, Grammatikakis et al. 2001).

De façon intrigante, la protéine kinase PAK1, qui est un effecteur de la petite GTPase Rac, interagirait de façon directe avec le NPRA. Cette interaction a été démontrée par co-immunoprécipitation à partir de cellules MEF (fibroblastes embryonnaires de souris) qui expriment de façon endogène le NPRA et PAK1. Cette étude a démontré que Rac, par l'intermédiaire de PAK1, activait le NPRA et la production de GMPc, d'une manière indépendante du ligand. Apparemment, PAK1 activerait le NPRA par liaison directe sur le domaine guanylate cyclase en induisant un changement de conformation. Cette nouvelle voie de signalisation serait impliquée dans la migration des fibroblastes induite par le PDGF (Guo, Tan et al. 2007).

1.8. Agonistes et antagonistes spécifiques

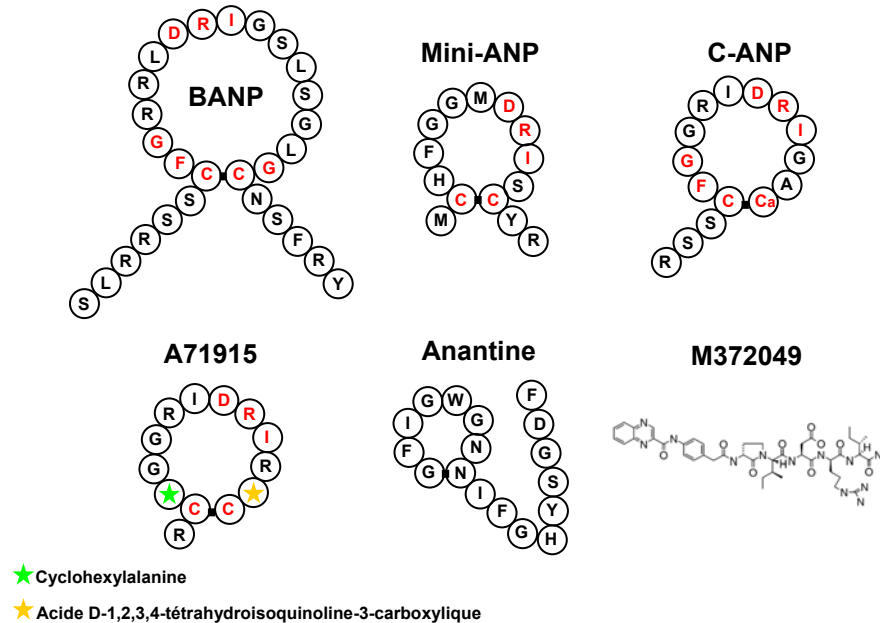


Figure 2.18 : Agonistes et antagonistes synthétiques des récepteurs aux peptides natriurétiques.

Depuis la découverte des peptides natriurétiques et de leurs récepteurs, de gros efforts ont été faits pour mettre au point des peptides agonistes présentant une meilleure affinité, une meilleure sélectivité, ou une puissance plus élevée que les peptides natriurétiques naturels. Certains ont été utiles pour étudier les effets physiologiques médiés par chaque récepteur. Des variants de l'ANP ayant plus d'affinité pour le NPRA que pour le NPRC ont été identifiés par la technique de « phage-display ». Un variant, qui montrait une affinité de 1000 à 10000 fois plus forte pour le NPRA que pour le NPRC a été utilisé pour démontrer que le NPRA, et non le NPRC, était requis dans l'inhibition ANP-dépendante de la synthèse d'aldostérone dans les cellules glomérulaires humaines (Cunningham, Lowe et al. 1994; Olson, Lowe et al. 1996). Un autre variant avec une affinité 200 fois supérieure pour NPRA que pour NPRC a montré de meilleurs effets rénaux que l'ANP naturel à la même concentration lorsque perfusé chez le rat. Ce phénomène était probablement dû au fait que le variant était moins dégradé par la voie d'internalisation du NPRC (Jin, Li et al. 1996). Le peptide chimérique BANP (pBNP1) est formé de la structure en boucle du BNP de porc (pBNP) et des extrémités exocycliques de l'ANP de rat (rANP) (**Figure 2.18**). Il a plus d'affinité pour le NPRA que le rANP et le pBNP (4 et

5 fois plus, respectivement). Il a également plus d'affinité pour le NPRA que pour le NPRC. De plus, il est 24 fois plus puissant que le rANP à inhiber la production d'aldostérone induite par l'Ang II dans les cellules adrénocorticales, ce qui fait de lui un superagoniste (Mimeault, Fournier et al. 1993; Bodart, Rainey et al. 1996). Le C-ANP est une forme tronquée du rANP, qui a perdu les 3 premiers acides aminés N-terminaux, les 5 derniers acides aminés de la structure en boucle, et est dépourvu d'extrémité exocyclique C-terminale (**Figure 2.18**). Le C-ANP est un agoniste spécifique du NPRC. Il a été identifié par criblage alors qu'il compétitionnait pour les sites de liaison des peptides natriurétiques naturels, mais était dépourvu d'action agoniste ou antagoniste pour la production de GMPc dans les cellules du muscle lisse vasculaire et les cellules endothéliales (Maack, Suzuki et al. 1987). Il a beaucoup servi pour définir les effets des peptides natriurétiques médiés par le NPRC (Anand-Srivastava 2005). Une minimisation de l'ANP a également été réalisée. Le mini-ANP ne possède que 15 acides aminés, contre 28 pour l'ANP ; il présente aussi une structure en boucle, mais plus petite, et garde une haute affinité pour le NPRA (Li, Tom et al. 1995) (**Figure 2.18**).

Il existe plusieurs antagonistes des récepteurs aux peptides natriurétiques. L'antagoniste HS-142-1 est celui qui a été le mieux étudié et le plus utilisé. HS-142-1 est un métabolite secondaire d'*Aureobasidium spp.* Ce polysaccharide a été découvert durant une recherche de ligands microbiens de NPRA (Morishita, Sano et al. 1991). C'est un antagoniste allotypique (allostérique) de NPRA et NPRB, mais n'a pas d'action sur le NPRC. Il agit en accélérant la dissociation du ligand naturel de son récepteur (Poirier, Labrecque et al. 2002). L'anantine est un peptide cyclique de *Streptomyces coeruleus* (**Figure 2.18**). C'est un antagoniste compétitif du NPRA (Weber, Fischli et al. 1991). C'est le premier antagoniste des récepteurs aux peptides natriurétiques à avoir été décrit, pourtant il n'a été que très peu utilisé. L'antagoniste A71915 a été découvert par les laboratoires Abotts, lors d'un criblage d'analogues structuraux de l'ANP pour leur capacité à inhiber la production de GMPc induite par l'ANP (von Geldern, Budzik et al. 1990) (**Figure 2.18**). C'est un antagoniste compétitif puissant du NPRA avec seulement 22 fois moins d'affinité que l'ANP (Delporte, Winand et al. 1992). Il a cependant des propriétés d'agoniste partiel à forte concentration (von Geldern, Budzik et al. 1990). Son mécanisme d'action n'est pas

encore connu et son effet sur le NPRB non plus. A ce jour, il n'existe pas d'antagoniste sélectif capable de bloquer complètement l'activité guanylate cyclase du NPRA ou du NPRB. Une étude basée sur la technique du « phage display » a cependant permis d'obtenir un antagoniste du NPRB 35 fois plus sélectif pour NPRB que pour NPRA (Deschenes, Dupere et al. 2005). Enfin, l'antagoniste M3720491, a été mis au point par Astrazeneca grâce à une stratégie d'homologie par modélisation moléculaire, dans le but d'empêcher la liaison des peptides natriurétiques au récepteur de clairance NPRC et ainsi augmenter leur durée d'action (Veale, Alford et al. 2000). Le M372049 est un antagoniste compétitif qui mime les interactions indispensables à la liaison au NPRC (**Figure 2.18**). Il est sélectif pour le NPRC.

2. La guanylate cyclase C

La guanylate cyclase C (GC-C) contient un domaine extracellulaire avec une similarité en séquence limitée avec NPRA et NPRB, mais partage la même topologie générale. Elle est densément exprimée dans la bordure en brosse apicale des cellules de l'épithélium intestinal, mais aussi détectée dans d'autres tissus épithéliaux (rein et foie). La GC-C est le récepteur de 2 peptides intestinaux, guanyline et uroguanyline. Elle lie aussi les entérotoxines résistantes à la chaleur (ST) produites par de nombreuses bactéries et responsables de diarrhées sécrétoires (Vaandrager 2002). La délétion du gène de la GC-C chez la souris lui confère d'ailleurs une résistance à ces entérotoxines (Schulz, Lopez et al. 1997). Tout comme NPRA et NPRB, la GC-C est glycosylée et activée de façon allostérique par l'ATP (Schulz, Green et al. 1990). Elle ne possède cependant pas de site de phosphorylation Ser/Thr au niveau du KHD, mais un site de phosphorylation a été identifié près de l'extrémité C-terminale (Wada, Hasegawa et al. 1996). Le rôle majeur de la GC-C est de réguler le transport d'eau et d'électrolytes dans l'intestin (**Figure 2.19**). En effet, l'activation de la GC-C entraîne une production de GMPc. Le GMPc va alors activer la PKGII, qui à son tour va stimuler le canal régulateur de la conductance transmembranaire de la fibrose kystique (CFTR). L'ouverture du canal provoque alors la sortie de chlore et de bicarbonate vers le lumen. L'absorption de sodium est également inhibée par blocage d'un échangeur Na/H au niveau apical. L'eau qui suit le mouvement des électrolytes est également sécrétée dans le lumen. Les entérotoxines lient et activent la GC-C de façon prolongée et sont 10 fois plus puissantes que les peptides endogènes. Elles

induisent donc une sortie massive d'eau et d'électrolytes, causant des diarrhées sécrétoires (Lucas, Pitari et al. 2000; Vaandrager 2002).

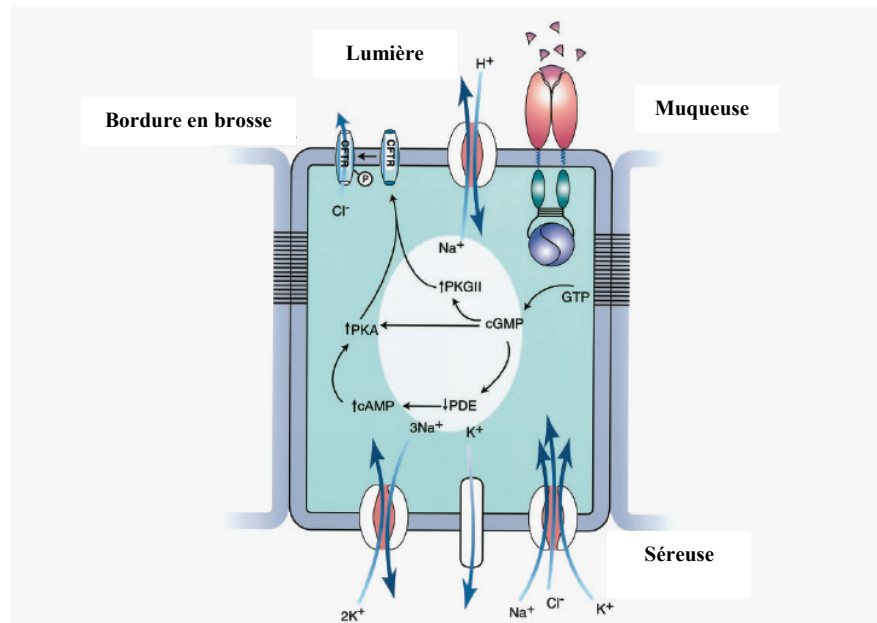


Figure 2.19 : Régulation de la sécrétion intestinale par la guanylate cyclase GC-C. L'entérotoxine bactérienne ST, la guanyline et l'uroguanyline lient et activent la GC-C exprimée sur la bordure en brosse des cellules de la muqueuse intestinale du duodénum jusqu'au rectum. La production et l'accumulation de GMPc qui s'en suit active la protéine kinase sensible de GMPc PKGII elle-même localisée à la membrane. De plus, le GMPc peut aussi activer la protéine kinase A (PKA), directement ou en inhibant une phosphodiesterase (PDE) spécifique à l'AMPc ce qui induit une augmentation de la concentration en AMPc. La phosphorylation du régulateur de la conductance transmembranaire de la fibrose kystique (CFTR), un canal à chlore, par la PKGII ou la PKA entraîne son ouverture prolongée, permettant au chlore de sortir de façon massive vers la lumière intestinale. D'autres canaux ioniques et transporteurs de la cellule rétablissent ensuite l'électroneutralité de la cellule. Ce sont ces conductances ioniques qui régulent le transport d'eau et d'électrolytes vers la lumière intestinale. Modifié de (Lucas, Pitari et al. 2000).

3. La guanylate cyclase D

L'expression de la guanylate cyclase D (GC-D) est restreinte à une petite population de neurones du neuroépithélium olfactif chez la souris (Juilfs, Fulle et al. 1997). Elle jouerait un rôle dans la transduction olfactive ou la détection de

phéromone, en activant un canal ionique sensible au GMPc (CNGA3) et en augmentant les concentrations de calcium intracellulaire (**Figure 2.20**). La GC-D a d'abord été considérée comme un récepteur orphelin, mais il a récemment été démontré que la GC-D reconnaît la guanyline et l'uroguanyline. La guanyline et l'uroguanyline sont capables de stimuler la production de GMPc par la GC-D, entraînant ainsi une accumulation de calcium à l'intérieur de la cellule (Leinders-Zufall, Cockerham et al. 2007). Les auteurs ont proposé que ces peptides intestinaux par l'intermédiaire de GC-D pourraient être impliqués dans la détection d'informations relatives au statut en sel et en eau de l'organisme au niveau du système nerveux. La GC-D pourrait également être activée au niveau intracellulaire par la neurocalcine qui lie et est activée par le calcium. GC-D pourrait n'être qu'un pseudogène chez l'humain (Kuhn 2009).

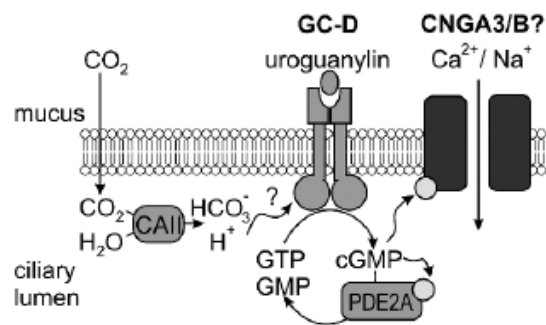


Figure 2.20 : Transduction olfactive dans les cils des neurones olfactifs : rôle de la GC-D. Le GMPc produit par la GC-D active un canal ionique sensible aux nucléotides cycliques (CNG) induisant un influx de Ca^{2+} et de Na^+ et une dépolarisation de la membrane. GC-D est activé par l'(uro)guanyline, probablement par liaison directe. De plus, l'activité de la GC-D est stimulée par la carbohydase II (CAII) qui transforme le CO_2 et H_2O en HCO_3^- et H^+ . L'hydrolyse du GMPc est effectuée par la phosphodiesterase 2A (PDE2A). D'après Biel 2009.

4. Les guanylates cyclases E et F

Le GMPc joue un rôle central dans la réponse à la lumière des photorécepteurs des cônes et des bâtonnets de la rétine. Les cellules de la rétine contiennent 2 guanylates cyclases, GC-E et GC-F. Elles n'ont pas de ligand connu et leur domaine extracellulaire n'est pas utile pour leur activation. En effet, la

production de GMPc par GC-E et GC-F est régulée en intracellulaire, par 2 protéines de liaison du calcium, GCAP-1 et 2 (Palczewski, Sokal et al. 2004). Les GCAP possèdent 3 sites de liaison de haute affinité au calcium (domaines EF-hand). Des études biochimiques ont suggéré que les GCAP se liaient au KHD des GC-E et F de façon constitutive. En absence de calcium, les GCAP stimulent l'activité guanylate cyclase, et elles l'inhibent en présence de calcium. Ceci permet à la synthèse de GMPc d'être régulée par le calcium intracellulaire (Dizhoor and Hurley 1999). À la lumière, la rhodopsine photoactivée stimule la phosphodiesterase 6 (PDE6) qui hydrolyse le GMPc, entraînant la fermeture du canal à cation sensible au GMPc (CNG) de la membrane plasmique des photorécepteurs de la rétine. La fermeture du canal cause une diminution des concentrations intracellulaire en calcium, ce qui stimule la resynthèse de GMPc par les GC-E et F (Yang, Foster et al. 1995). Ces GC rétiniennes sont donc non seulement importantes pour maintenir les niveaux de base de GMPc dans le noir, mais elles jouent également un rôle critique pour la restauration des niveaux de GMPc et la réouverture du canal CNG, accélérant la phase de récupération des photorécepteurs après l'excitation visuelle. (**Figure 2.21**). L'expression de GC-F est confinée aux bâtonnets de la rétine. La GC-E est exprimée dans les cônes et les bâtonnets, mais aussi dans la glande pinéale, le bulbe olfactif, le nerf cochléaire et l'organe de Corti (Seebacher, Beitz et al. 1999; Duda and Koch 2002). Son rôle dans ces tissus n'est cependant pas connu. La délétion du gène de GC-E chez la souris entraîne une dégénérescence ciblée des cônes. Celle du gène de GC-F n'a pas d'effet sur la phototransduction. La délétion des 2 gènes quant à elle entraîne une dégénérescence des cônes et des bâtonnets et une cécité complète (Baehr, Karan et al. 2007). La mutation du gène humain de GC-E a aussi été reliée à une dystrophie congénitale des bâtonnets et des cônes de la rétine, causant la cécité dès la naissance (Kelsell, Gregory-Evans et al. 1998). Ceci suggère que les GC rétiniennes n'ont pas qu'un rôle dans la phototransduction, mais aussi dans la viabilité des photorécepteurs.

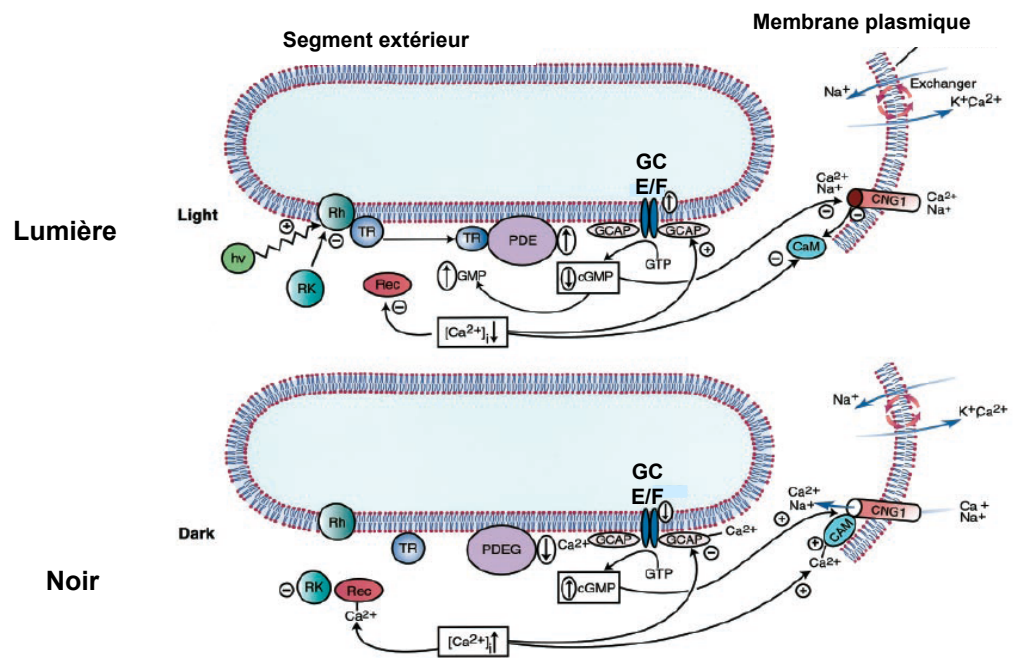


Figure 2.21 : Phototransduction dans les bâtonnets de la rétine : rôle des GC-E et F. La lumière (hv) active la rhodopsine (Rh) et la transducine (TR). Celle-ci active alors PDE6, qui hydrolyse le GMPC en GMP. La diminution de la concentration de GMPC induit la fermeture du CNG1, qui entraîne une hyperpolarisation de la membrane alors traduite en impulsions nerveuses. De plus, la fermeture du canal CNG1 réduit l'influx de Ca²⁺ alors que son efflux par l'échangeur cationique persiste, ce qui entraîne une diminution de la concentration en Ca²⁺. L'interaction du Ca²⁺ avec la protéine GCAP diminue donc, elle peut alors activer les GC-E et F, permettant ainsi un réapprovisionnement en GMPC. L'interaction du Ca²⁺ avec la calmoduline (CaM) diminue également, entraînant sa dissociation avec le canal CNG1, ce qui réduit la capacité du GMPC à ouvrir le canal. Enfin, l'interaction du Ca²⁺ avec la recoverine (Rec) diminue aussi, l'empêchant d'inhiber la rhodopsine kinase (RK) qui phosphoryle et inactive la Rh. Dans le noir, la TR et la PDE6 sont inactives. Le GMPC s'accumule, maintenant le canal CNG1 dans une conformation ouverte et les photorécepteurs dans un état dépolarisé. De plus, le Ca²⁺ qui s'accumule se lie aux GCAP, ce qui inhibe les GC-E et F. Il se lie également à la CaM qui s'associe alors au CNG1 et augmente la capacité du GMPC à maintenir ce canal à l'état ouvert. Enfin, le Ca²⁺ lie la Rec, qui inhibe alors la RK, potentialisant ainsi l'activation de la Rh. Modifié de (Lucas, Pitari et al. 2000).

5. La guanylate cyclase G

La guanylate cyclase G (GC-G) est le dernier membre de la famille des guanylates cyclases membranaires. La GC-G est un récepteur orphelin, qui a une large distribution tissulaire chez le rat, qui inclut les poumons, l'intestin et le muscle squelettique (Schulz, Wedel et al. 1998). Chez la souris, la GC-G est présente dans les spermatozoïdes, où elle module apparemment les influx et efflux de calcium et par ce mécanisme joue un rôle dans la motilité (Huang, Wei et al. 2006). Elle est également exprimée dans le rein chez la souris, mais son rôle physiologique n'est pas connu. Comme l'expression de la GC-G dans l'épithélium tubulaire est augmentée après ischémie reperfusion chez la souris, il a été proposé que la GC-G pouvait avoir un rôle en condition pathologique, contribuant à la dégradation des tubules et à l'insuffisance rénale, en induisant l'apoptose et l'inflammation (Lin, Cheng et al. 2008). GC-G pourrait n'être qu'un pseudogène chez l'humain (Kuhn 2009).

CHAPITRE 3 : Les effets physiologiques des peptides natriurétiques.

Bien que les observations faites chez la souris ne puissent pas être directement extrapolées aux humains, la technologie du ciblage de gène chez la souris a fourni de précieuses informations concernant la physiologie moléculaire et les fonctions biologiques diverses des GCM et de leurs ligands (**Tableau 3.1**). Elle a aussi permis de pointer du doigt les implications potentielles de dysfonctions spécifiques dans ce système dans des maladies humaines.

Altération génétique	Phénotypes	Références
Délétion de l'ANP	Hypertension artérielle, hypertension pulmonaire	(John, Veress et al. 1996)
Surexpression de l'ANP	Hypotension artérielle	(Steinhilber, Cochrane et al. 1990; Barbee, Perry et al. 1994)
Délétion du BNP	Fibrose cardiaque	(Tamura, Ogawa et al. 2000)
Surexpression du BNP	Hypotension artérielle, surcroissance osseuse	(Ogawa, Itoh et al. 1994; Suda, Ogawa et al. 1998)
Délétion du CNP	Ossification endochondrale altérée, nanisme, mort prématurée	(Chusho, Tamura et al. 2001)
Délétion de la guanyline	Prolifération de l'épithélium du colon, élargissement des cryptes	(Steinbrecher, Wowk et al. 2002)
Délétion de l'uromyline	Augmentation de la pression sanguine, perturbation de la réponse natriurétique à la charge en NaCl entérale	(Lorenz, Nieman et al. 2003)
Délétion du NPRA	Hypertension artérielle, hypervolémie, hypertrophie cardiaque, fibrose, augmentation du remodelage cardiaque après un infarctus du myocarde	(Lopez, Wong et al. 1995; Oliver, Fox et al. 1997; Skryabin, Holtwick et al. 2004; Nakanishi, Saito et al. 2005)
Surexpression du NPRA	Hypotension artérielle	(Oliver, John et al. 1998)
Délétion du NPRA dans le muscle lisse	Normotension artérielle, réaction hypertensive à une augmentation aiguë du volume vasculaire	(Holtwick, Gotthardt et al. 2002)
Délétion de NPRA dans l'endothélium	Hypervolémie légère, hypertension	(Sabrane, Kruse et al. 2005)
Délétion du NPRA dans les cardiomyocytes	Hypotension artérielle, hypertrophie cardiaque, perturbation de la relaxation diastolique	(Holtwick, van Eickels et al. 2003)

Délétion de NPRB	Nanisme, attaques convulsives, infertilité, mauvais guidage des axones sensitifs, accumulation de tissu adipeux	(Tamura, Doolittle et al. 2004; Schmidt, Stonkute et al. 2007)
Surexpression de NPRB ΔICD	Hypertrophie cardiaque concentrique, normotension, augmentation de l'activité des nerfs sympathiques	(Langenickel, Buttgeret et al. 2006)
Délétion de NPRC	Hypotension, habileté réduite à concentrer l'urine, diurèse légère, diminution du volume vasculaire, surcroissance osseuse	(Matsukawa, Grzesik et al. 1999)
Délétion de GC-C	Résistance à la ST, allongement des cryptes du colon	(Schulz, Lopez et al. 1997; Li, Lin et al. 2007)
Délétion de GC-D	Abolition de la réponse calcique de l'épithélium olfactif à la stimulation par (uro)guanyline	(Leinders-Zufall, Cockerham et al. 2007)
Délétion de GC-E	Dystrophie sélective des cônes de la rétine	(Yang, Robinson et al. 1999)
Délétion de GC-F	Pas de phénotype	(Baehr, Karan et al. 2007)
Délétion de GC-E +F	Dystrophie des cônes et des bâtonnets de la rétine	(Baehr, Karan et al. 2007)
Délétion de GC-G	Protection contre les dommages ischémiques rénaux	(Lin, Cheng et al. 2008)
Délétion de PKGI	Dysfonctions vasculaire, intestinale et érectile	(Pfeifer, Klatt et al. 1998)
Délétion de PKGII	Nanisme, défaut sécrétoire intestinal	(Pfeifer, Aszodi et al. 1996)

Tableau 3.1 : Altérations des gènes codant pour les guanylates cyclases membranaires, leurs ligands et certains éléments de leurs voies de signalisation, dans des modèles de souris.

A. Les effecteurs du GMPc

Les effets des peptides natriurétiques passent majoritairement par la production de GMPc. Les effets du GMPc sont médiés par 3 classes de protéines : les canaux ioniques sensibles au GMPc (CNG), les protéines kinases dépendantes du GMPc (PKG de type I α et I β , cytoplasmiques ou de type II, associée à la membrane plasmique) et les phosphodiésterases (PDE) (**Figure 3.1**).

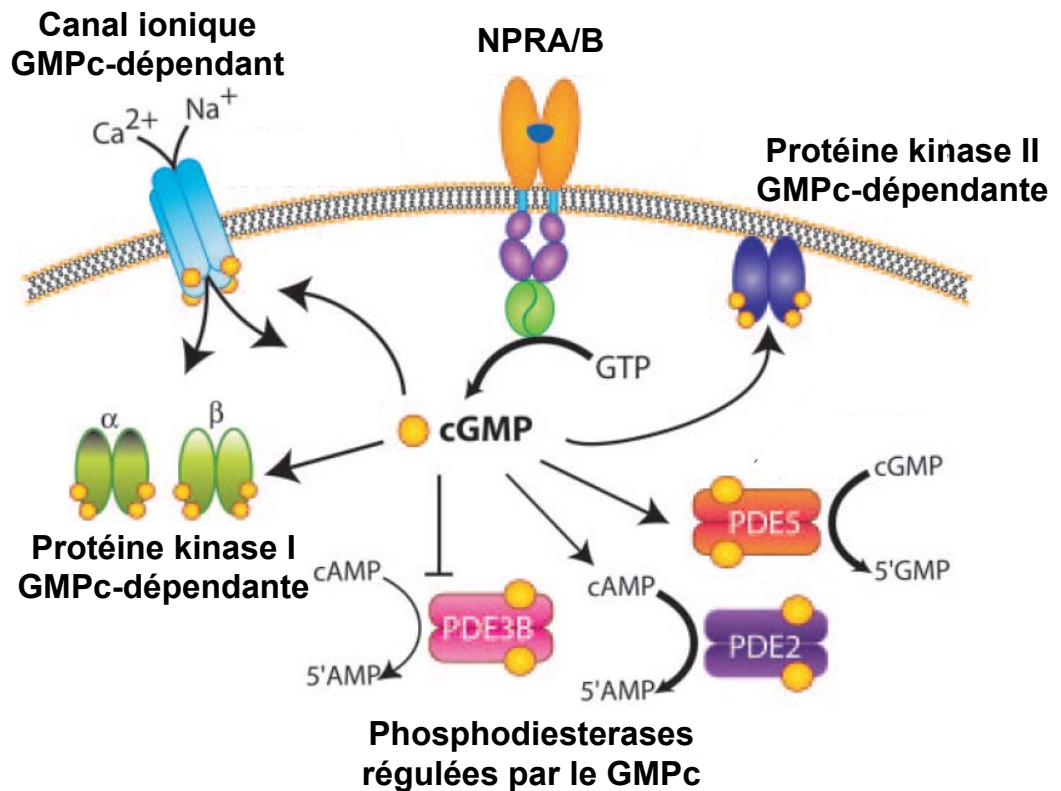


Figure 3.1 : Les effecteurs du GMPc. Modifié de (Potter, Abbey-Hosch et al. 2006).

1. Les protéines kinases sensibles au GMPc

Les protéines kinases sensibles au GMPc (PKG) sont les principaux médiateurs intracellulaires de la signalisation du GMPc. Il existe 2 gènes codants pour des PKG chez les mammifères. Le premier code pour 2 isoformes α et β de PKGI. Le deuxième code pour la PKGII. Les PKG sont des homodimères, composés d'un domaine régulateur en N-terminal et d'un domaine catalytique en C-terminal. Le domaine régulateur contient un domaine pseudosubstrat autoinhibiteur chargé d'inhiber l'activité catalytique à l'état de base et 2 sites de liaison au GMPc qui interagissent de façon allostérique. Le domaine catalytique contient un site de liaison pour le MgATP et pour le substrat à phosphoryler. L'occupation des sites de liaison par le GMPc entraîne un changement de conformation drastique qui rend le site catalytique accessible ; les PKG peuvent alors phosphoryler leurs protéines cibles. Elles possèdent également des sites d'autophosphorylation en N-terminal. L'autophosphorylation augmente leur activité spontanée. La région N-terminale

comprend également un domaine de dimérisation en hélice de leucines responsable de leur homodimérisation (**Figure 3.2**) (Hofmann 2005).

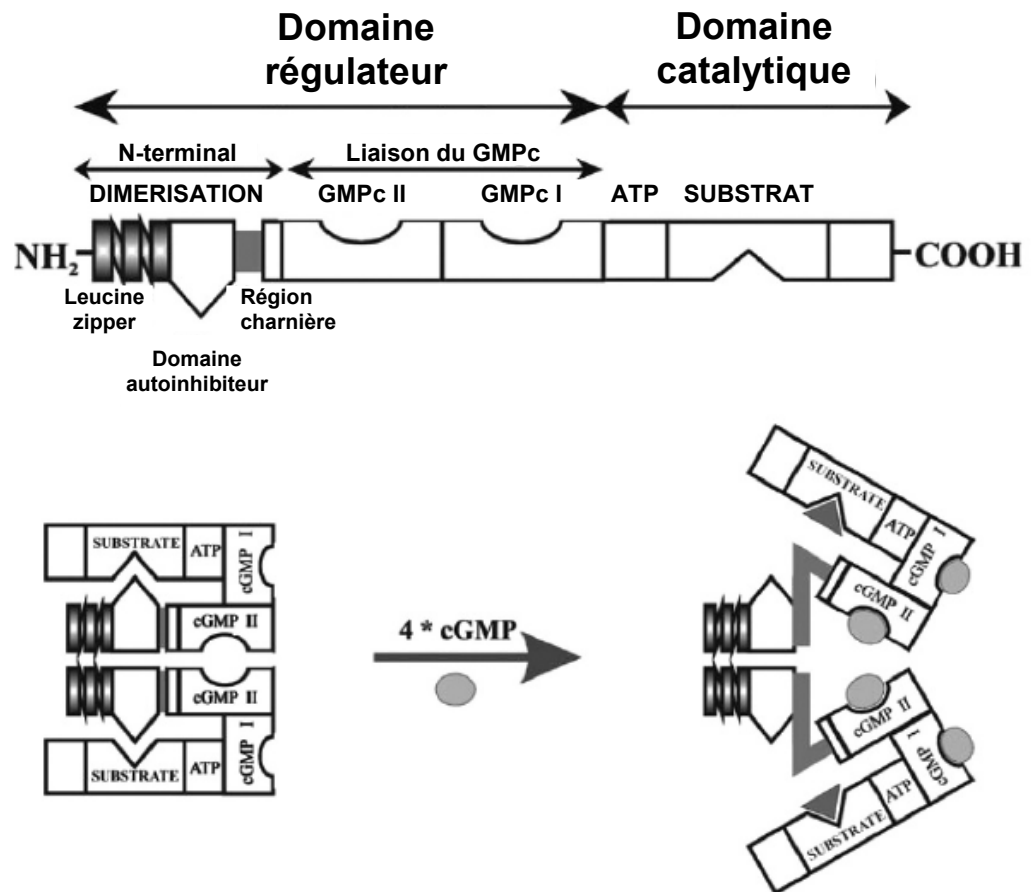


Figure 3.2 : Structure des protéines kinase GMPc-dépendantes. Modifié de (Hofmann, Bernhard et al. 2009).

La PKGI est retrouvée à de hautes concentrations dans tous les muscles lisses, les plaquettes et le rein. De plus faibles quantités sont aussi retrouvées dans le muscle cardiaque, l'endothélium vasculaire et les chondrocytes. Les 2 isoformes de PKGI sont retrouvées dans les mêmes tissus, mais PKGI α se retrouve surtout dans le système vasculaire, les reins et la surrénale. La PKGI β est la seule forme retrouvée dans l'utérus. PKGI α et β sont des enzymes solubles. L'isoforme β montre moins d'affinité pour le GMPc que l'isoforme α et une plus faible coopérativité (Pfeifer, Ruth et al. 1999). La PKGII n'est pas exprimée dans le système cardiovasculaire, mais est retrouvée dans le cerveau, l'intestin, les poumons, les reins et les chondrocytes. Contrairement à PKGI, elle est ancrée à la membrane par

myristoylation d'un résidu glycine à l'extrémité N-terminale. La PKGII a très peu d'affinité pour le GMPc et montre une faible coopérativité. À l'exception de certains chondrocytes, les 2 types de PKG ne sont jamais retrouvés dans le même type cellulaire (Pfeifer, Aszodi et al. 1996).

2. Les phosphodiesterases

Les phosphodiesterases (PDE) sont des enzymes chargées de dégrader les nucléotides cycliques en nucléotides 5'-phosphate inactif. Il existe 11 familles de PDE chez les mammifères et chaque famille contient une ou plusieurs isoformes. Les PDE sont classées selon leur substrat. Ainsi, les PDE 1, 2, 3, 10 et 11 dégradent à la fois le GMPc et l'AMPc. Les PDE 4, 7 et 8 sont spécifiques à l'AMPc et les PDE 5, 6 et 9 au GMPc (Lucas, Pitari et al. 2000) (**Tableau 3.1**). Les PDE sont exprimées dans toutes les cellules et dans la plupart des compartiments subcellulaires. Typiquement, un type de cellule particulier contient plusieurs familles de PDE aussi bien que plusieurs isoformes de la même famille (Francis, Corbin et al. 2009). Les PDE sont des enzymes homodimériques composées de domaines de régulation hétérologues en N-terminal et d'un domaine catalytique conservé en C-terminal. L'activité des PDE peut être régulée par phosphorylation, par interaction avec d'autres protéines, comme la calmoduline, ou par les nucléotides cycliques eux-mêmes (**Tableau 3.1**). En effet, certaines PDE (PDE 2, 5, 6, 10 et 11) comprennent un domaine de régulation GAF qui contient des sites allostériques de liaison des nucléotides cycliques. Par exemple, le GMPc peut stimuler ou inhiber l'hydrolyse de l'AMPc par PDE2 et PDE3, respectivement. Réciproquement, l'AMPc peut se lier à la PDE10 et inhiber l'hydrolyse du GMPc (Kleppisch 2009). Le GMPc régule donc les PDE selon 3 mécanismes : (1) en augmentant leur activité par action de masse (PDE5, 6 et 9), (2) en altérant les niveaux d'hydrolyse de l'AMPc par compétition pour le site actif (PDE1, 2 et 3) et (3) en régulant l'activité enzymatique par liaison directe à des sites allostériques spécifiques (PDE2, 5, 6, 10 et 11). L'activité des PDE est cruciale pour la signalisation cellulaire puisque le métabolisme des nucléotides cycliques module leurs concentrations cellulaires et affecte les réponses physiologiques subséquentes.

Sous-famille (Isoformes)	Spécificité de substrat	Mécanisme régulateur	Domaine GAF
PDE1 (A,B,C)	GMPc/AMPc	Stimulation par Ca ²⁺ /Calmoduline	
PDE2 (A)	AMPc/GMPc	Stimulation par GMPc	+
PDE3 (A,B)	AMPc/GMPc	Inhibition par GMPc Stimulation par phosphorylation par PKB/Akt et PKA	
PDE4 (A,B,C,D)	AMPc	Phosphorylation par ERK	
PDE5 (A)	GMPc	Stimulation par GMPc par phosphorylation par PKG	+
PDE6 (A,B,C)	GMPc		+
PDE7 (A,B)	AMPc		
PDE8 (A,B)	AMPc		
PDE9 (A)	GMPc		
PDE10 (A)	GMPc/AMPc	Inhibition par AMPc Phosphorylation par PKA altère la distribution subcellulaire	+
PDE11 (A)	AMPc/GMPc		+

Tableau 3.2 : Propriétés structurales, biochimiques et fonctionnelles des phosphodiésterases de mammifères. Modifié de (Kleppisch 2009).

3. Les canaux ioniques sensibles au GMPc

Les canaux ioniques sensibles au GMPc (CNG) font partie de la famille des canaux non sélectifs aux cations (Na⁺, K⁺ et Ca²⁺) qui sont régulés par les nucléotides cycliques. Cette famille est composée de 6 membres chez les mammifères, classés en sous-unité A (CNGA1-4) et B (GNGB1 et 3). Les sous-unités A et B partagent la même topologie générale caractérisée par 6 domaines transmembranaires, une boucle P (pore) entre les segments transmembranaires 5 et 6, et 2 extrémités N et C-terminales cytosoliques. L'extrémité C-terminale contient le site de liaison aux nucléotides cycliques. Les canaux CNG sont tétramériques, avec les 4 sous-unités disposées autour du pore central. Le pore est bordé par la boucle P et le 6^{ème} segment de chaque sous-unité. Les CNG peuvent être formés de différents isotypes. La composition des CNG fait varier leurs propriétés biophysique et pharmacologique (affinités aux nucléotides cycliques, propriétés de perméation) (Biel and Michalakakis 2009). Tous les canaux sont activés par le GMPc et l'AMPc, mais certains isotypes sont plus sensibles à l'un ou à l'autre. Les CNG ont surtout été caractérisés dans les photorécepteurs de la rétine. On les retrouve aussi dans les neurones olfactifs, les

reins, les poumons, le cerveau, les glandes surrénales et l'intestin (Lucas, Pitari et al. 2000)

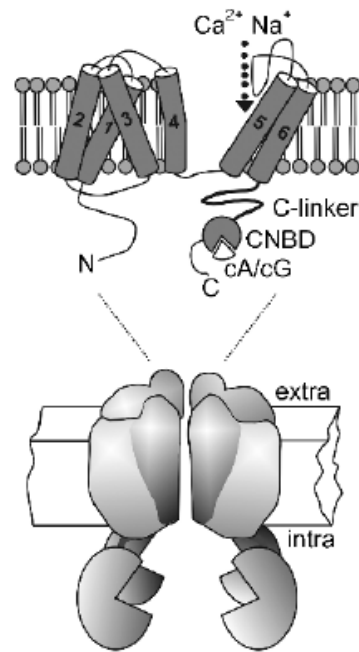


Figure 3.3 : Les canaux ioniques sensibles aux nucléotides cycliques (CNG).

Topologie générale des sous unités des canaux ioniques à 6 passages transmembranaires (en haut) et modèle du complexe tétramérique formant le canal CNG (en bas). CNBD : Domaine de liaison aux nucléotides cycliques. Modifié de (Biel and Michalakis 2009).

B. Fonctions physiologiques régulées par le NPRA

La fonction la mieux connue et la plus étudiée du système ANP/BNP/NPRA est la régulation de la pression sanguine. Ce rôle physiologique a été clairement démontré chez les souris dont le gène de l'ANP ou du NPRA a été éliminé, et qui ont des pressions sanguines de 20-40 mm de mercure plus élevées que les souris contrôle. Inversement, les pressions sanguines des souris surexprimant l'ANP, le BNP ou le NPRA sont considérablement diminuées (**Tableau 2.1**). La diminution de la pression sanguine dépendante du NPRA est obtenue grâce à une augmentation de la diurèse et de la natriurèse, une vasorelaxation, une augmentation de la perméabilité endothéliale et un antagonisme du système rénine-angiotensine. Le système ANP/BNP/NPRA a également un rôle plus local dans l'inhibition de l'hypertrophie et de la fibrose cardiaques. Enfin, ce système n'est pas seulement confiné à des rôles

cardiovasculaires, puisqu'il serait également impliqué dans la régulation de la lipolyse (**Figure 3.4**).

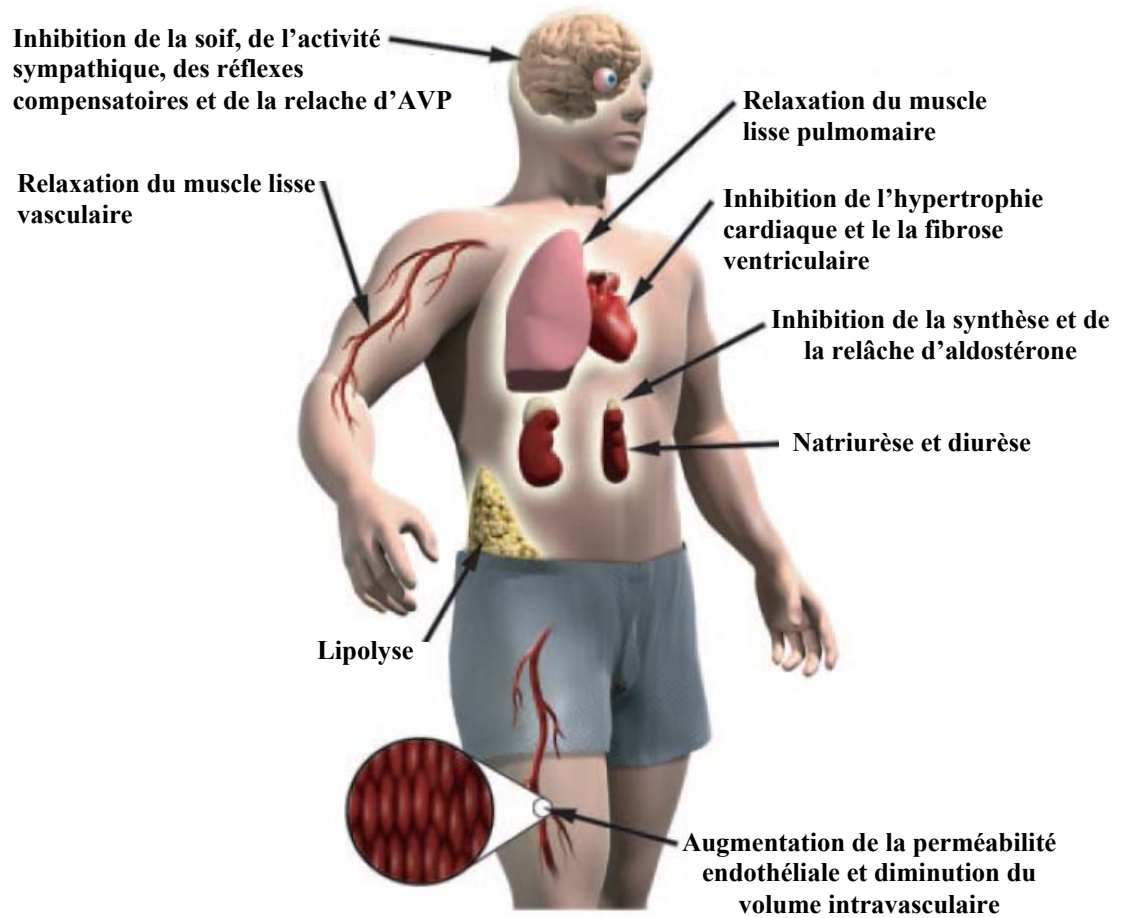


Figure 3.4 : Processus physiologiques régulés par le système ANP/BNP/NPRA. Modifié de (McGrath, de Bold et al. 2005; Potter, Abbey-Hosch et al. 2006).

1. Régulation de la natriurèse et de la diurèse

Dans le rein, l'ANP augmente le taux de filtration glomérulaire, inhibe la réabsorption d'eau et de sodium et réduit la sécrétion de rénine, favorisant ainsi, la diurèse et la natriurèse (**Figure 3.5**). La diurèse et la natriurèse induite par l'ANP sont médiées exclusivement par le NPRA, car ses effets sont perdus complètement chez la souris dont le gène de NPRA a été éliminé (Kishimoto, Dubois et al. 1996). L'ANP augmente le taux de filtration glomérulaire en augmentant la pression dans les capillaires du glomérule par une dilatation de l'artériole afférente et une constriction de l'artériole efférente coordonnées (Marin-Grez, Fleming et al. 1986). En plus de ces effets hydrauliques, ANP inhibe la réabsorption de sodium et d'eau dans tout le

néphron. Dans les tubules proximaux, l'ANP inhibe le transport d'eau et de sodium stimulé par l'Ang II (Harris, Thomas et al. 1987). Dans les tubules collecteurs, il réduit l'adsorption de sodium en inhibant un canal à cation sensible à l'amiloride (Light, Corbin et al. 1990). Enfin, l'ANP réduit la sécrétion de rénine par un processus impliquant la PKGII (Gambaryan, Wagner et al. 1998). Tous les effets de l'ANP sur le rein sont des processus dépendants du GMPc.

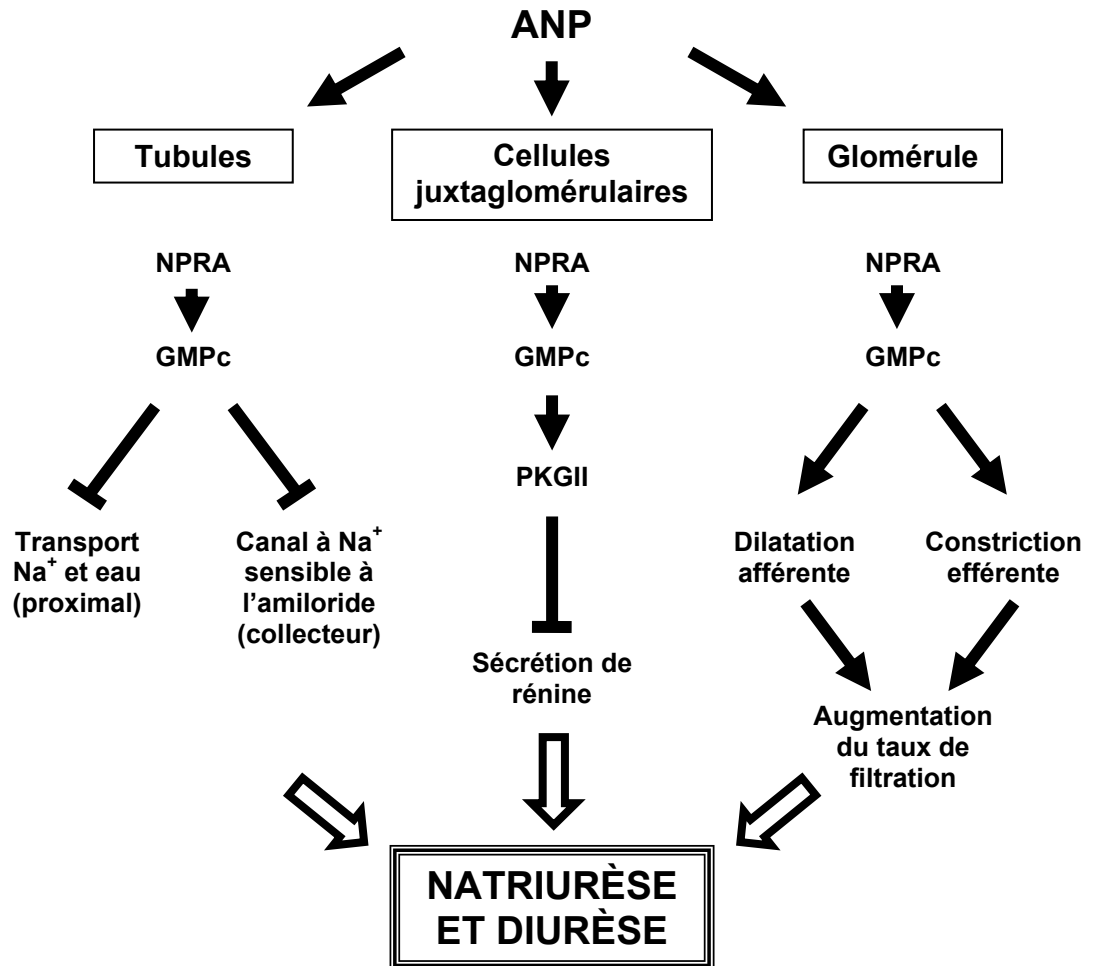


Figure 3.5 : Effets de l'ANP sur le rein. Modifié de (Potter, Abbey-Hosch et al. 2006).

2. Régulation du tonus vasculaire

La vasorelaxation induite par l'ANP ou le BNP passe par le NPRA puisque cet effet est éliminé chez les souris dont le gène du NPRA a été inactivé (Lopez, Garbers et al. 1997). Le processus de vasorelaxation induite par l'ANP a été bien

étudié (**Figure 3.6**). Il implique l'activation de PKGI par le GMPc. En effet, les souris dont le gène de PKGI a été inactivé ne présentent plus de vasodilatation induite par l'ANP (Pfeifer, Klatt et al. 1998). La PKGI stimule la relaxation des cellules du muscle lisse vasculaire en diminuant les niveaux de calcium intracellulaire et en diminuant la sensibilité au calcium du système contractile. L'ANP induit une production de GMPc en stimulant le NPRA. Le GMPc active alors la PKGI qui phosphoryle à son tour diverses protéines cibles. Pour diminuer les concentrations en calcium intracellulaire, la PKGI agit sur plusieurs canaux calciques. PKGI phosphoryle directement et inhibe le récepteur à l'IP₃ (IP₃R1) et le substrat associé au récepteur à l'IP₃ (IRAG), bloquant ainsi la relâche du calcium stocké dans le réticulum sarcoplasmique (Komalavilas and Lincoln 1996; Schlossmann, Ammendola et al. 2000). Elle stimule également la calcium/ATPase de la membrane plasmique, favorisant ainsi la sortie de calcium hors de la cellule. Elle phosphoryle le phospholamban qui active la calcium/ATPase du réticulum sarcoplasmique (SERCA), entraînant alors la séquestration du calcium dans le réticulum sarcoplasmique (Cornwell, Pryzwansky et al. 1991). Cependant, les souris n'exprimant pas le phospholamban montrent une vasodilatation normale en réponse au GMPc, suggérant que ce processus n'est pas requis dans la vasodilatation induite par l'ANP (Lalli, Shimizu et al. 1999). Enfin, elle phosphoryle et active le canal potassique calcium-dépendant (BK_{Ca}), favorisant la sortie de potassium et induisant une hyperpolarisation de la cellule. Cette hyperpolarisation inhibe à son tour l'entrée de calcium à travers le canal calcique voltage dépendant. La PKGI pourrait également inhiber ce canal par phosphorylation directe ou indirecte (Swayze and Braun 2001). La PKGI diminue aussi la sensibilité au calcium du système contractile en phosphorylant et en activant la phosphatase de la chaîne légère de la myosine (MLCP). Cette dernière diminue la phosphorylation de la chaîne légère de la myosine, augmentant ainsi le taux de calcium nécessaire à la contraction (Nakamura, Ichikawa et al. 1999).

Le gène du NPRA a été sélectivement inactivé dans les cellules du muscle lisse vasculaire chez la souris, grâce à la technologie Cre/Lox. Les souris transgéniques ainsi obtenues ne montrent pas de réduction aiguë de la pression sanguine en réponse à l'injection d'un bolus d'ANP, contrairement aux souris de type

sauvages. Cependant, la pression sanguine basale de ces animaux est la même que celle des souris contrôle, indiquant que la vasorelaxation dépendante du NPRA est importante dans la régulation aiguë, mais non chronique, de la pression sanguine (**Tableau 3.1**) (Holtwick, Gotthardt et al. 2002). De plus, les souris dont le gène de la PKGI a été inactivé sont normotensives, ce qui suggère que le phénotype hypertensif des animaux dont le gène de l'ANP ou du NPRA a été inactivé, résulte d'un mécanisme indépendant de PKGI (Schlossmann, Feil et al. 2005).

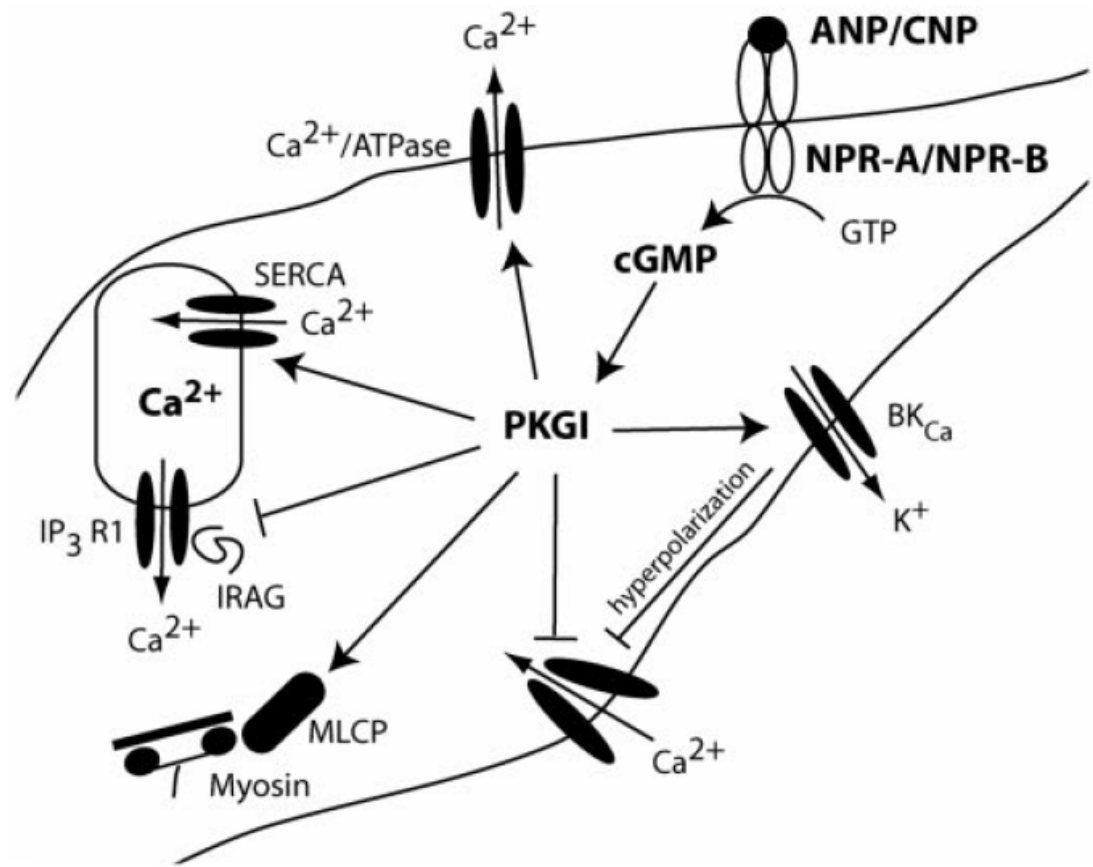


Figure 3.6 : Relaxation du muscle vasculaire lisse dépendante des peptides natriurétiques. D'après (Potter, Abbey-Hosch et al. 2006).

3. Régulation de la perméabilité endothéliale et du volume intravasculaire

Dans l'article original de De Bold et ses collaborateurs décrivant la découverte de l'ANP, il était démontré que l'injection d'extraits d'oreillette augmentait les taux d'hématocrite (de Bold, Borenstein et al. 1981). Des études

subséquentes ont indiqué que la diminution du volume vasculaire induite par l'ANP ne requérait pas les effets natriurétique et diurétique de l'ANP, puisqu'elle se produit avant la miction et qu'elle a lieu aussi chez les animaux néphrectomisés (Almeida, Suzuki et al. 1986; Fluckiger, Waeber et al. 1986; Richards, Tonolo et al. 1988). Des expériences additionnelles ont montré que l'ANP augmentait la conductivité hydraulique des capillaires et la perméabilité de l'endothélium aux macromolécules comme l'albumine (Huxley, Tucker et al. 1987; McKay and Huxley 1995). Cependant, les résultats obtenus en cellule étaient contradictoires; certaines publications suggérant que le GMPc augmentait la perméabilité et d'autres où il diminuait la perméabilité (Westendorp, Draijer et al. 1994; He, Zeng et al. 1998). Compatible avec le fait que l'ANP augmente la perméabilité cellulaire, les souris dont le gène du NPRA a été sélectivement inactivé dans l'endothélium vasculaire sont légèrement hypertendues (10-15 mm de mercure) et présentent une augmentation du volume vasculaire de 11-13 % (**Tableau 2.1**) (Sabrane, Kruse et al. 2005). Ceci suggère que le NPRA de l'endothélium compte pour 1 tiers des effets hypotensifs totaux de l'ANP puisque les animaux dont le gène du NPRA a été inactivé totalement sont sévèrement hypertendus (30-40 mm de mercure) et présentent une augmentation volumique de 30 %. Contrairement au NPRA du muscle lisse vasculaire, impliqué dans la vasorelaxation induite par l'ANP (Chapitre 3.B.2), le NPRA de l'endothélium vasculaire, joue un rôle important dans la régulation chronique de la pression sanguine. Les souris de type sauvage montrent une extravasation d'albumine radiomarquée, de la circulation vers les tissus, dépendante à l'ANP alors que les animaux déficients en NPRA endothéliale n'en montrent aucune. De plus, l'ANP augmente les niveaux d'hématocrite chez les animaux de type sauvage, mais pas chez les animaux déficients en NPRA, indiquant que l'habileté de l'ANP à augmenter les niveaux d'hématocrite requière absolument le NPRA endothélial (Sabrane, Kruse et al. 2005). Des études de microscopie vitale chez la souris, permettant d'observer le tissu sous-cutané, ont également démontré que l'ANP augmentait l'extravasation microvasculaire d'albumine fluorescente. Cet effet était aussi inhibé totalement chez les souris déficientes en NPRA endothéliale (Kuhn 2009). Ensemble, ces données suggèrent que l'ANP régule le volume intravasculaire et la pression sanguine en augmentant la perméabilité microvasculaire. Cette modulation de la perméabilité

endothéliale via NPRA pourrait être une des actions physiologiques les plus importantes de l'ANP. Le mécanisme de ce phénomène reste cependant inconnu.

4. Régulation du système rénine-aldostérone

L'ANP régule la pression sanguine en partie par inhibition du système rénine-angiotensine II-aldostérone (RAAS) (**Figure 3.5**). La rénine est une protéase sécrétée par les cellules juxtaglomérulaires rénales, où elle est stockée dans des granules de sécrétion. La rénine est sécrétée en réponse à une diminution de la pression sanguine ou à une diminution de la concentration en sodium dans la lumière du tubule distal. La rénine clive l'angiotensinogène en angiotensine I. Cette dernière est par la suite convertie en Ang II par l'enzyme de conversion de l'angiotensine (ACE) au niveau de l'endothélium vasculaire pulmonaire. L'Ang II stimule alors la vasoconstriction et la relâche d'aldostérone, l'hormone majeure de régulation de la réabsorption de sodium dans les tubules collecteurs corticaux du rein (Potter, Abbey-Hosch et al. 2006). De hautes doses d'ANP ne réduisent pas les niveaux de rénine chez l'humain, sûrement à cause des réponses compensatoires associées avec la diminution de la pression artérielle. Cependant, des doses physiologiques d'ANP suppriment à la fois la production de rénine et d'aldostérone (Richards, McDonald et al. 1988). Chez le chien, une perfusion intrarénale d'ANP inhibe le taux de sécrétion de rénine (Gambaryan, Wagner et al. 1998). L'inhibition de la sécrétion de rénine AMPc-dépendante par l'ANP implique l'activation de PKGII. En effet, les souris dont le gène de la PKGII, mais pas de la PKGI, a été inactivé présentent une expression plus élevée de la rénine que les animaux contrôle et sont résistantes à l'inhibition de la sécrétion de rénine dépendante du GMPc (Wagner, Pfeifer et al. 1998). À la naissance, les souris dont le gène du NPRA a été inactivé, ont des taux de rénine et d'Ang II élevés, ce qui est compatible avec les effets antagonistes de l'ANP et du NPRA sur le système RAAS. Cependant, chez ces souris à l'âge adulte, les niveaux de rénine dans le rein et dans la circulation diminuent, tandis que l'activité de la rénine et les niveaux d'aldostérone dans les surrénales restent élevés, suggérant que la diminution des niveaux de rénine est la conséquence d'un mécanisme compensatoire à l'augmentation de la pression sanguine (Shi, Nguyen et al. 2001).

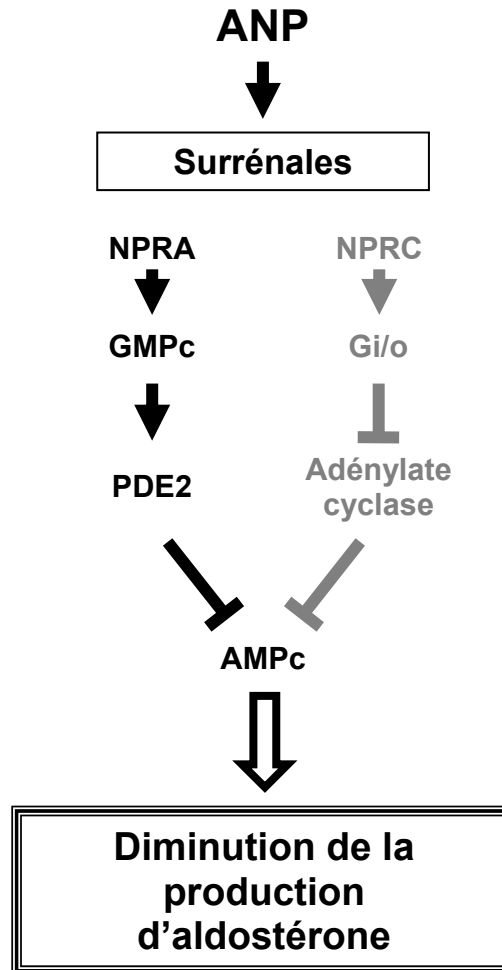


Figure 3.7 : Effet de l'ANP sur la production d'aldostérone par les glandes surrénales. La diminution de la sécrétion d'aldostérone ANP-dépendante requiert une diminution de la concentration en AMPc. 2 mécanismes ont été proposés pour expliquer cet effet. Le premier, implique l'activation du NPRA, la production de GMPc et l'activation de la phosphodiesterase de type 2 (PDE2), qui hydrolyse l'AMPc (en noir). Alors que le deuxième implique une inhibition NPRC-dépendante de l'adénylate cyclase par la protéine G hétérotrimérique sensible à la toxine pertussique (Gi/o, en gris). Ce 2^{ème} mécanisme reste controversé. Modifié de (Potter, Abbey-Hosch et al. 2006).

En plus d'inhiber directement la sécrétion de rénine, l'ANP inhibe directement la production d'aldostérone par les glandes surrénales (**Figure 3.7**). Dans la zona glomerulosa des surrénales, l'ANP inhibe la production d'aldostérone induite

par la corticotropine (ACTH), par l'Ang II et même la production basale d'aldostérone (Chartier, Schiffrin et al. 1984; De Lean, Racz et al. 1984; Kudo and Baird 1984; Maack, Marion et al. 1984). L'implication du GMPc dans l'inhibition de la production d'aldostérone ANP-dépendante est controversée. Dans certaines études, l'effet de l'ANP est mimé par un analogue du GMPc perméable à la membrane cellulaire (Barrett and Isales 1988). Dans d'autres, les analogues du GMPc n'ont aucun effet. Des expériences additionnelles ont indiqué que l'habileté de l'ANP à réduire les niveaux d'aldostérone peut être mimée avec un ligand spécifique au NPRC et bloqué par la toxine pertussique qui inhibe la protéine G hétérotrimérique Gi/Go (Ganguly, Chiou et al. 1989). Cependant, d'autres études effectuées avec un peptide ayant 1000 fois plus d'affinité pour le NPRA que pour le NPRC suggèrent que le NPRA est responsable de la réduction des niveaux d'aldostérone induite par l'ANP (Olson, Lowe et al. 1996). De manière compatible avec ces résultats, les souris dont le gène du NPRA a été inactivé ont des niveaux d'aldostérone plasmatique environ 2 fois plus élevés que les souris contrôle (Shi, Nguyen et al. 2001). Ce mécanisme de réduction des niveaux d'aldostérone impliquerait PDE2, une PDE activée par le GMPc hautement exprimé dans la glomerulosa des glandes surrénales. L'activation de PDE2 par le GMPc augmenterait la dégradation de l'AMPc, qui est un déterminant intracellulaire majeur de la synthèse d'aldostérone (MacFarland, Zelus et al. 1991).

5. Régulation de l'hypertrophie cardiaque et la fibrose

L'ANP et le BNP ont tous les 2 des effets locaux sur le cœur. Des souris dont le gène du NPRA ou de l'ANP a été inactivé présentent des cœurs hypertrophiés, alors que les animaux surexprimant l'ANP ont des cœurs plus petits (**Tableau 2.1**). Initialement, la cause de l'hypertrophie observée chez les animaux génétiquement modifiés n'était pas claire. En effet, elle pouvait être due à une exposition prolongée à une hypertension systémique ou à une perte de l'effet inhibiteur local sur la croissance cardiaque. Il semblerait que les deux processus entraînent une hypertrophie cardiaque. Les premières preuves supportant un effet local ont été obtenues avec des souris dont le gène du NPRA était inactivé et qui avaient été

traitées dès leur naissance avec des antihypertenseurs. Ces animaux étaient normotensifs, mais présentaient quand même une hypertrophie cardiaque (Knowles, Esposito et al. 2001). Dans une autre étude, la réactivation sélective du gène du NPRA dans le coeur des souris déficientes en NPRA a réduit la taille des cardiomyocytes sans affecter l'hypertension (Kishimoto, Rossi et al. 2001). Inversement, l'inactivation sélective du gène du NPRA dans les cardiomyocytes, grâce à la technique Cre/Lox, donne des souris ayant une pression sanguine diminuée, mais une légère hypertrophie cardiaque avec élévation de l'expression des gènes marqueurs de l'hypertrophie (**Tableau 3.1**). De plus, ces souris répondent à une surcharge de pression ou à une administration systémique d'Ang II par une hypertrophie et une fibrose cardiaques exacerbées (Holtwick, van Eickels et al. 2003; Kilic, Bubikat et al. 2007). La réduction de la pression sanguine chez ces animaux semble due à des concentrations cardiaque et plasmatique élevées d'ANP et de BNP, qui suggèrent l'existence d'un système rétroactif local et NPRA-dépendant régulant la synthèse et/ou la sécrétion des peptides natriurétiques. Dans une autre étude, le NPRA cardiaque a été inhibé par l'expression d'un dominant négatif chez des animaux transgéniques. Ce modèle animal montrait également une accentuation modeste de la réponse hypertrophique à la surcharge de pression, avec une augmentation dramatique de la réponse fibrotique (Patel, Valencik et al. 2005).

Le BNP, quant à lui, inhibe la prolifération des fibroblastes cardiaques en culture (Cao and Gardner 1995). Cette observation a par la suite été validée *in vivo*, puisque les souris dont le gène du BNP a été inactivé présentent une fibrose ventriculaire sensible à la pression sanguine (**Tableau 3.1**). Le mécanisme impliqué dans la régulation des fibroblastes BNP-dépendante est controversé. Un groupe a affirmé que ce modèle transgénique suggère que le BNP atténue la fibrose dépendante de l'angiotensine en inhibant l'activité MAPK (Takahashi, Saito et al. 2003). Un autre groupe suggère plutôt que le BNP inhibe le processus fibrotique dépendant de TGF- β en activant la voie des MAPK (Kapoun, Liang et al. 2004). D'autres études suggèrent que la fibrose cardiaque implique des métalloprotéases de la matrice (MMP), car ANP et BNP régulent les niveaux de MMP (Tsuruda, Boerrigter et al. 2002; Wang, Oparil et al. 2003; Kapoun, Liang et al. 2004). Les souris dont le gène du NPRA a été inactivé montrent une expression et une activité

plus élevées de MMP-2 et MMP-9. De plus, l'augmentation de l'activité est corrélée avec l'augmentation de l'expression du facteur nucléaire κ B (NF- κ B) (Vellaichamy, Khurana et al. 2005; Vellaichamy, Sommana et al. 2005). Plusieurs publications indiquent que le système ANP/BNP/NPRA inhibe également le remodelage cardiaque induit par la pression sanguine (Knowles, Esposito et al. 2001; Holtwick, van Eickels et al. 2003; Tsuneyoshi, Nishina et al. 2004).

De façon intrigante, bien que les voies de signalisation de l'ANP et du BNP passent par le même récepteur, NPRA, les souris déficientes pour l'un ou l'autre des peptides présentent des phénotypes différents. Ainsi les souris déficientes en BNP, ne présentent pas d'hypertension ou d'hypertrophie cardiaque, mais sont sensibles à la fibrose cardiaque. Ces études d'inactivation de gènes suggèrent que l'ANP et le BNP ont des rôles physiologiques distincts. En conditions physiologiques, les concentrations de BNP dans la circulation plasmatique périphérique sont plus faibles que les concentrations d'ANP. De plus, l'affinité du BNP pour le NPRA est 8 fois plus faible que l'ANP (Bennett, Bennett et al. 1991). De même, la puissance de vasorelaxation du BNP est beaucoup moindre (van der Zander, Houben et al. 1999). Donc, il est possible que le BNP, qui est constitutivement exprimé dans les cardiomyocytes des ventricules, agisse en majorité comme facteur antifibrotique paracrine au niveau du cœur.

6. Régulation du métabolisme des lipides

De nombreuses études ont montré un lien entre obésité et hypertension. Cependant, les effets des peptides natriurétiques sur le tissu adipeux commencent tout juste à être étudiés. Jusqu'à récemment, on pensait que la lipolyse dans les adipocytes humains était médiée exclusivement par une voie de signalisation AMPc- et PKA-dépendante, sous le contrôle des catécholamines et de l'insuline. Pourtant, il avait déjà été démontré que les tissus adipeux d'origine animale ou humaine, de type et de localisation différents exprimaient de hauts niveaux de récepteurs aux peptides natriurétiques. En effet, NPRA et NPRC sont souvent coexprimés dans les tissus adipeux (Sarzani, Paci et al. 1993; Sarzani, Dessi-Fulgheri et al. 1996). Le tissu adipeux est d'ailleurs le second tissu où le NPRC est le plus exprimé (Sarzani, Dessi-

Fulgheri et al. 1996). Les premières études portant sur l'effet de l'ANP sur la lipolyse ont été effectuées chez le rat et la souris. Par contre, aucune n'a pu mettre en évidence une lipolyse induite par l'ANP (Okamura, Kelly et al. 1988; Jeandel, Okamura et al. 1989). Plus tard, cette lipolyse dépendante de l'ANP fut démontrée dans des adipocytes humains en culture et *in vivo* par perfusion d'ANP par microdialyse *in situ* (Sengenès, Berlan et al. 2000). Il fut déterminé par la suite que la lipolyse stimulée par l'ANP était spécifique aux primates, sans doute parce que les primates ont un ratio NPRA/NPRC plus élevé dans ce tissu (Sengenès, Zakaroff-Girard et al. 2002).

Le mécanisme de stimulation de la lipolyse par l'ANP a été bien étudié. Il est mimé par l'analogue du GMPc 8-bromo-GMPc et est indépendant de PDE3B, l'enzyme principale de dégradation de l'AMPc dans l'adipocyte. Ceci suggère que la lipolyse dépendante de l'ANP implique le GMPc, mais pas l'AMPc comme c'est le cas pour la lipolyse induite par l'épinéphrine. La PKGI serait le principal effecteur du GMPc dans la lipolyse induite par l'ANP. En effet, l'inhibition pharmacologique de la PKGI diminue la lipolyse induite par l'ANP dans les préadipocytes humains. La PKGI stimule la phosphorylation de la lipase hormono-sensible (HSL), l'enzyme principale d'hydrolyse des triglycérides en acides gras libres dans les adipocytes. Une augmentation de la phosphorylation de la périlipine, une protéine associée aux gouttelettes lipidiques, a également été observée en réponse à l'ANP (**Figure 3.8**) (Lafontan, Moro et al. 2008).

La lipolyse induite par l'ANP ou le BNP jouerait un grand rôle dans la mobilisation des lipides pendant un effort physique. Jusqu'à maintenant, on pensait que la mobilisation de lipide induite par l'exercice dépendait principalement de l'activation du système nerveux sympathique et de l'action des catécholamines. Cependant, des études effectuées sur un jeune homme sain ont démontré que des antagonistes β -adrénergiques n'empêchaient pas la mobilisation de lipide induite par l'exercice. Une corrélation entre les concentrations extracellulaires de glycérol (un indicateur de la lipolyse) et les niveaux plasmatiques d'ANP a également été observée. De plus, il est connu que l'exercice physique fait augmenter les niveaux plasmatiques d'ANP et de BNP (Moro, Crampes et al. 2004). Des résultats semblables ont été obtenus sur des sujets obèses, des 2 sexes (Moro, Pillard et al.

2007; Pillard, Moro et al. 2007). De récentes publications ont examiné le rôle métabolique de la lipolyse dépendante de l'ANP pour établir un lien potentiel entre obésité et hypertension. Il a été démontré chez les femmes obèses qu'une diète faible en calorie augmentait la lipolyse induite par l'ANP. Cette augmentation de la lipolyse serait due à une diminution de l'expression du NPRC, qui faciliterait l'interaction de l'ANP avec le NPRA. La diminution considérable de l'expression du NPRC lors d'un jeûne avait déjà été démontrée chez le rat auparavant (Sarzani, Paci et al. 1995). Il a également été démontré que le ratio d'expression entre NPRA et NPRC dans le tissu adipeux était diminué chez les patients obèses hypertendus, suggérant une augmentation de la clairance ou une diminution de l'activité des peptides natriurétiques dans ce tissu (Dessi-Fulgheri, Sarzani et al. 1997). Les niveaux d'ANP et de BNP plasmatiques sont également réduits chez les patients obèses (Wang, Larson et al. 2004). L'obésité *per se* est un facteur de risque majeur pour le développement de l'hypertension et les maladies liées à l'hypertension. La survenue d'une modification de la distribution des récepteurs aux peptides natriurétiques dans le tissu adipeux ou d'une modification de la réponse aux peptides natriurétiques chez les patients obèses a été proposée par certains, mais questionnée par d'autres (Das, Drazner et al. 2005). D'autres études sont nécessaires pour clarifier le mécanisme qui mène à la modification de la voie de signalisation des peptides natriurétiques dans les adipocytes des patients obèses.

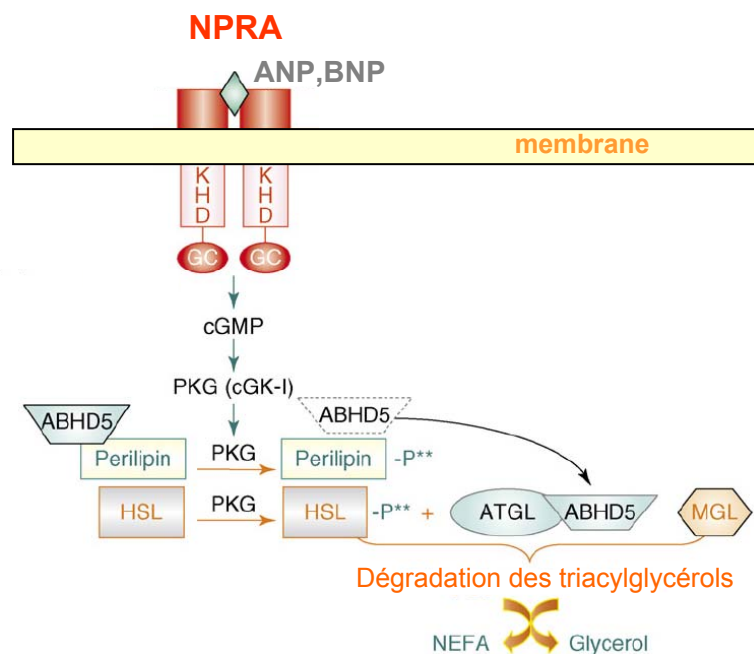


Figure 3.8 : Stimulation de la lipolyse par les peptides natriurétiques dans les adipocytes humains. L'activation du NPRA par l'ANP ou le BNP induit la production de GMPc, qui active à son tour la protéine kinase G de type I (PKGI, cGK-I). Cette dernière phosphoryle alors la périlipine et la lipase hormono-sensible (HSL). À l'état de base, cette lipase est dispersée dans le cytoplasme alors que la périlipine enveloppe les gouttelettes lipidiques et lie l'ABDH5 (α/β -hydrolase domain-containing protein 5), un co-activateur clé de la lipase des triglycérides adipeux (ATGL). À l'état actif, la phosphorylation de la périlipine induit une altération physique des gouttelettes lipidiques, qui facilite l'action de la lipase hormono-sensible sur l'hydrolyse des triacylglycérols. La phosphorylation de la périlipine induit aussi la relâche de l'ABDH5, qui peut ainsi activer la lipase des triglycérides adipeux (ATGL). L'activation de cette lipase, de la lipase hormono-sensible et de la lipase des monoglycérides (MGL) est nécessaire à l'hydrolyse complète des triacylglycérols en acides gras non-estérifiés (NEFA) et glycérol. Modifié de (Lafontan 2008).

7. Autres effets physiologiques régulés par le NPRA

ANP et BNP sont tous 2 hautement exprimés dans les poumons. L'ANP stimule la dilatation des voies pulmonaires et des vaisseaux sanguins. La perfusion ou l'inhalation d'ANP stimule également la bronchodilatation chez les sujets sains ou asthmatiques (Hamad, Clayton et al. 2003). Les niveaux d'ANP et de BNP sont élevés chez les patients présentant une hypertension pulmonaire et sont indicateurs d'une augmentation de la pression dans le ventricule droit (Ishii, Nomura et al. 2000; Yap, Mukerjee et al. 2004). Les souris surexprimant l'ANP sont résistantes à l'hypertension induite par l'hypoxie, alors que les souris déficientes en ANP présentent une augmentation de l'hypertension pulmonaire en réponse à une hypoxie chronique (**Tableau 3.1**) (Klinger, Petit et al. 1993; Klinger, Warburton et al. 1999).

NPRA régule également certains effets neurologiques des peptides natriurétiques. Tous les peptides natriurétiques et leurs récepteurs sont exprimés dans le cerveau. De manière compatible avec son effet de réduction du volume vasculaire, l'ANP injecté dans l'hypothalamus inhibe la sensation de soif induite par une déshydratation ou une exposition à l'Ang II (Antunes-Rodrigues, McCann et al. 1985). Une perfusion intracérébroventriculaire d'ANP supprime également l'appétit pour le sel et inhibe le relâche de l'hormone antidiurétique AVP (Itoh, Nakao et al. 1986; Samson, Aguila et al. 1987). De plus, l'ANP inhibe l'activité sympathique dans le cerveau. Plus spécifiquement, il inhibe l'activité du nerf rénal et du nerf splanchnique. Il inhibe aussi la réponse des barorécepteurs artériels (Potter, Abbey-Hosch et al. 2006).

Enfin, le NPRA a été impliqué dans certains effets immunologiques des peptides natriurétiques. Les peptides natriurétiques et leurs récepteurs sont retrouvés dans de nombreuses cellules immunitaires. Cependant, le rôle des peptides natriurétiques dans le système immunitaire n'a pas été très étudié. Certaines études suggèrent un rôle pour l'ANP dans la réponse allergène de l'asthme et dans les dommages post-ischémiques. Le rôle des peptides natriurétiques dans la réponse immunitaire a été surtout étudié dans les macrophages et les cellules dendritiques. L'ANP exercerait un effet anti-inflammatoire en réduisant la production de cytokines pro-inflammatoires (TNF- α et IL-12) et en stimulant la production d'IL-10, une cytokine anti-inflammatoire (Kierner, Hartung et al. 2000; Morita, Ukyo et al. 2003). L'ANP réduit aussi la production de médiateurs pro-inflammatoire en inhibant la NO-synthase inductible (iNOS) (Vollmar 2005). Cependant, l'ANP augmente également la migration des neutrophiles *in vitro* (Elferink and De Koster 1995). Les souris déficientes en NPRA montrent une diminution de l'infiltration des neutrophiles dans les tissus cardiaques après une blessure tissulaire comparée aux souris contrôles. Ce phénomène serait dû à une diminution de l'activation du facteur de transcription NF- κ B (Izumi, Saito et al. 2001). Une infiltration excessive de neutrophile après une ischémie peut mener à endommager encore plus les tissus. Le blocage de la voie de signalisation de l'ANP après l'ischémie pourrait donc avoir un effet cardioprotecteur. Les souris déficientes en NPRA présentent aussi une diminution d'accumulation d'éosinophiles dans les poumons après une réaction allergique induite par

l'ovalbumine, suggérant que l'ANP pourrait jouer un rôle dans l'asthme (Mohapatra, Lockey et al. 2004).

C. Les fonctions physiologiques régulées par le NPRB

1. Fonctions cardiovasculaires

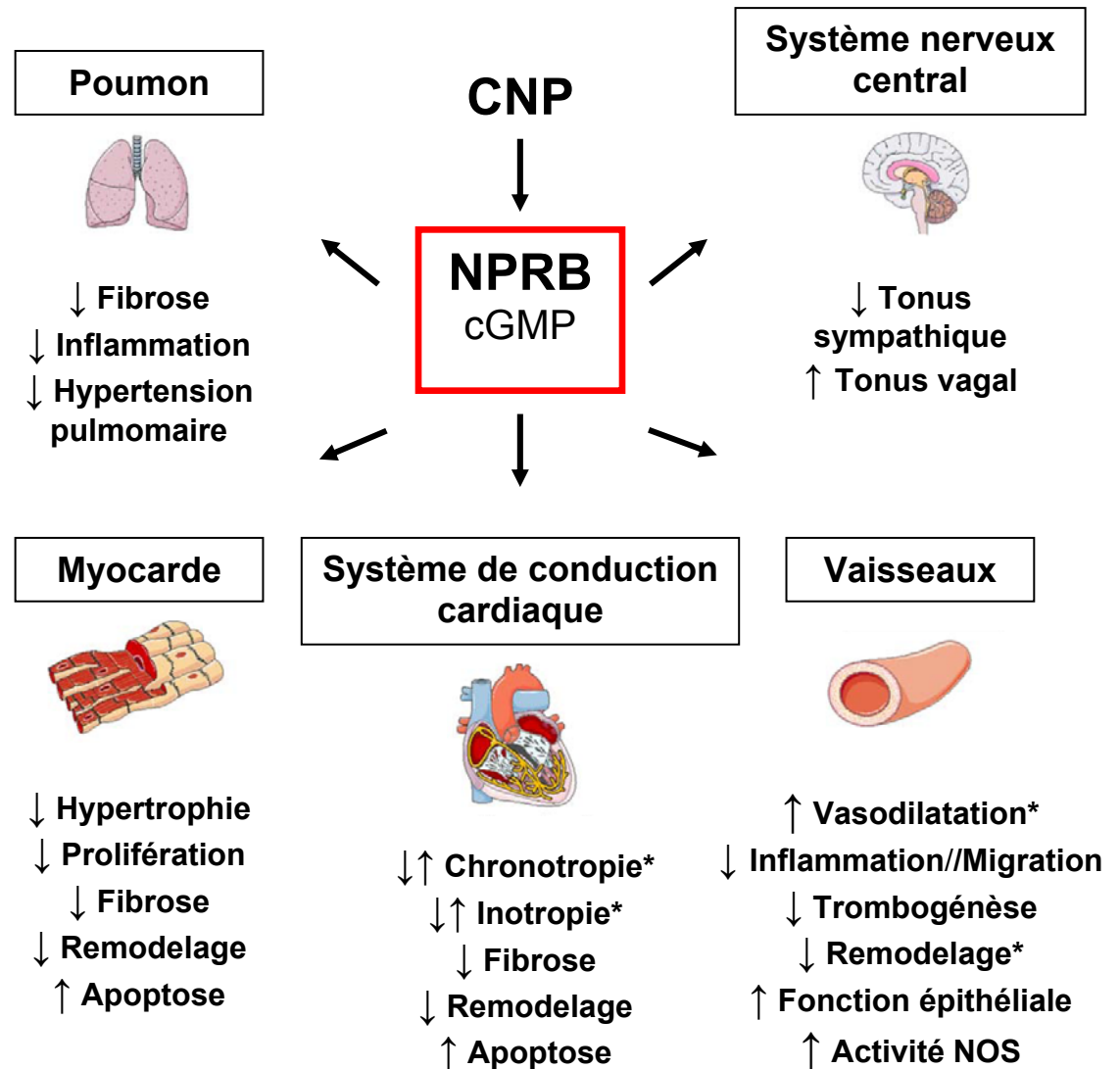


Figure 3.9 : Fonctions cardiovasculaires du système CNP/NPRB. Les effets faisant matière à controverse dans la littérature sont marqués par un astérisque. Modifié de (Pagel-Langenickel, Buttgerit et al. 2007)

Alors que le rôle du NPRB dans la régulation de l'hypertrophie cardiaque et de la pression sanguine a été très bien caractérisé, moins de données sont disponibles pour fournir un aperçu de la fonction de la voie de signalisation du NPRB dans le

système cardiovasculaire. Jusqu'à récemment, il n'existait ni de modèle génétique, ni d'inhibiteur spécifique au NPRB permettant la discrimination entre les voies de signalisation du NPRA et du NPRB. Puisque le CNP possède une spécificité relative pour le NPRB, certains effets du CNP ont été attribués à la stimulation du NPRB. Malgré certaines données controversées, des études récentes suggèrent un rôle pour le système CNP/NPRB dans la régulation de la croissance cardiaque, le remodelage vasculaire et l'activité du système nerveux autonome (**Figure 3.9**).

1.1 Effets sur le tonus vasculaire

NPRB est très abondant dans les cellules endothéliales vasculaires et les cellules du muscle lisse, suggérant son rôle dans la régulation du tonus vasculaire et de la pression sanguine (Hutchinson, Trindade et al. 1997). L'injection intraveineuse de CNP chez le chien entraîne d'ailleurs une diminution de la pression sanguine. Le CNP, contrairement à l'ANP et au BNP, n'a pourtant aucun effet diurétique ou natriurétique, ce qui indique que son effet sur la pression sanguine passe directement par une régulation du tonus vasculaire et non par une réduction du volume sanguin (Clavell, Stingo et al. 1993). Le CNP induit une relaxation dose dépendante des artères coronaires porcines précontractées qui est médiée par le GMPc (Wei, Hu et al. 1994). Cette vasodilatation est indépendante de l'endothélium et accompagnée par une hyperpolarisation des membranes des cellules du muscle lisse. De plus, elle implique l'activation des canaux potassiques voltage dépendants et sensibles au calcium (BK_{Ca}). Le CNP serait donc le très recherché « facteur hyperpolarisant dérivé de l'endothélium » (Otsuka, Tanaka et al. 2002). Ce phénomène d'hyperpolarisation a été confirmé chez l'humain (Honing, Smits et al. 2001). Dans les microvaisseaux rénaux de rat, CNP est capable d'induire une relaxation alors que le C-ANP, spécifique au NPRC n'a pas d'effet vasculaire (Endlich and Steinhausen 1997). Cependant, plusieurs études suggèrent que les propriétés vasodilatatrices artérielles de CNP sont au moins partiellement médiées par le NPRC (Scotland, Ahluwalia et al. 2005). Ainsi, le rôle précis du NPRB dans la régulation du tonus vasculaire artériel n'est pas entièrement clair. Par contre, le NPRB est responsable de l'effet venodilatateur du CNP. De plus, quand on le compare à l'ANP, le CNP est plus puissant pour dilater les veines pulmonaires, mais moins puissant à dilater les artères

pulmonaires. Les effets différentiels de l'ANP et du CNP sur les artères et les veines reflètent apparemment l'expression différentielle du NPRA et du NPRB dans ces tissus (Tolsa, Gao et al. 2002). Bien que le système CNP/NPRB ait des propriétés vasodilatatrices, ni les souris dont le gène du NPRB a été inactivé, ni les souris dont le gène du CNP a été inactivé, ne présentent de phénotype hypertensif (**Tableau 3.1**). NPRB ne semble donc pas jouer un rôle significatif dans la régulation à long terme de la pression sanguine.

1.2 Effets sur le remodelage vasculaire

Des études *in vitro* ont montré que le CNP avait des effets anti-prolifératif et anti-hypertrophique sur plusieurs types cellulaires, incluant les cellules du muscle lisse vasculaire et les fibroblastes cardiaques (Hutchinson, Trindade et al. 1997; Horio, Tokudome et al. 2003). Le CNP a des effets anti-prolifératifs 10 fois plus puissants que l'ANP sur les cellules du muscle lisse vasculaire (Furuya, Yoshida et al. 1991). Il est aussi le plus puissant des peptides natriurétiques à inhiber la migration des cellules du muscle lisse après stimulation au PDGF (Ikeda, Kohno et al. 1997). Ces effets sont accompagnés d'une augmentation de la concentration en GMPc intracellulaire et sont mimés par un analogue du GMPc, suggérant un mécanisme dépendant du NPRB. Ces effets anti-prolifératif et anti-migratoire pourraient jouer un rôle dans le remodelage vasculaire. Le CNP réduit d'ailleurs la formation de neointima et de thrombose dans différents modèles de blessures vasculaire (Qian, Haruno et al. 2002; Kuhn, Pelisek et al. 2005). Quand le CNP est administré localement, il prévient la prolifération de l'intima et la dysfonction endothéliale chez les lapins (Barber, Gaspari et al. 2005). Le CNP atténuerait aussi l'infiltration de monocytes et de macrophages, réduirait le contenu en collagène et diminuerait la prolifération cellulaire dans les lésions fibrotiques pulmonaires (Murakami, Nagaya et al. 2004). CNP est également capable de supprimer l'activation basale et induite par l'inflammation des leucocytes, d'inhiber l'interaction entre plaquettes et leucocytes, d'empêcher l'agrégation plaquettaire induite par la thrombine dans le sang humain, et de réduire l'expression endothéliale de la P-sélectine, un important régulateur du recrutement des leucocytes dans les tissus (Scotland, Cohen et al. 2005). Donc, le CNP, par ses propriétés anti-proliférative,

anti-inflammatoire et vasoactive, et son absence d'effets secondaires sur l'hémodynamique systémique, pourrait avoir un potentiel thérapeutique dans le traitement des maladies impliquant un remodelage vasculaire pathologique, comme l'hypertension pulmonaire primaire. Il a également été démontré que le CNP et le NPRB étaient surexprimés au site de la blessure vasculaire (Brown, Chen et al. 1997). L'expression du NPRB augmente aussi avec la progression des lésions athérosclérotiques des artères coronaires humaines. Le CNP étant également surexprimé par les cellules endothéliales, les cellules musculaires lisses et les macrophages au niveau de ces lésions, NPRB pourrait être impliqué dans le processus de remodelage vasculaire et dans le développement de l'athérosclérose (Casco, Veinot et al. 2002).

1.3 Effets sur l'hypertrophie et le remodelage cardiaques

La présence d'une surcharge cardiaque chronique, comme retrouvée dans les cas d'hypertension artérielle ou après un infarctus du myocarde, entraîne un remodelage pathologique du cœur caractérisé par une prolifération des fibroblastes suivie d'une fibrose, une perte de cardiomyocytes par apoptose et nécrose, et une dysfonction cardiaque. Ces effets sont médiés par une activation du système RAAS, par l'ET-1 et par une augmentation de l'activation sympathique. Les peptides natriurétiques jouent un grand rôle dans le contrebalancement des effets hypertrophiques de l'Ang II, de l'ET-1, de l'AVP et de l'aldostérone dans la croissance cardiaque hypertrophique. Alors que le rôle du NPRB a été analysé dans plusieurs études *in vitro* et dans des modèles animaux, peu de données sont disponibles sur le rôle potentiel du système CNP/NPRB dans la régulation de la croissance cardiaque et de l'hypertrophie. Il a été démontré que CNP était capable de réduire la synthèse de protéine basale ou stimulée par l'ET-1 dans les cardiomyocytes. Il diminue également l'expression des gènes associés à l'hypertrophie et l'activité des facteurs de transcription MEF2 et GATA4 (Tokudome, Horio et al. 2004). Inversement, les propriétés anti-hypertrophiques du CNP sont atténuées par l'ET-1 par un mécanisme impliquant la PKC (Horio, Tokudome et al. 2003). Dans les cardiomyocytes isolés, la stimulation du NPRB par le CNP est aussi puissante que l'ANP ou le BNP dans l'inhibition de l'hypertrophie induite par l'Ang

II. Ce processus est médié par le GMPc, puisqu'il est bloqué par un inhibiteur des récepteurs aux peptides natriurétiques, HS-142-1 ou par un inhibiteur de la PKG (Rosenkranz, Woods et al. 2003). De plus, un ligand spécifique du NPRC ne mime pas l'effet du CNP dans ces cellules. Comme observé dans la vasculature, le système CNP/NPRB joue un rôle autocrine/paracrine dans le cœur, où les cellules endothéliales et les fibroblastes sécrètent du CNP qui va agir sur le NPRB des cardiomyocytes, des fibroblastes et des cellules musculaires lisses vasculaires (D'Souza, Davis et al. 2004). La production de CNP par les fibroblastes est induite par le TNF- β 1, le BFGF et l'ET-1 et le CNP est capable de supprimer l'hypertrophie et la synthèse d'ADN dans les fibroblastes, par un processus GMPc-dépendant (Horio, Tokudome et al. 2003). En plus de ses propriétés anti-hypertrophiques, NPRB aurait également des propriétés pro-apoptotiques dans les cardiomyocytes. La stimulation de l'apoptose dans ces cellules est dépendante du GMPc (Han, Fixler et al. 2003). Bien que le NPRB dans le cœur soit localisé majoritairement dans la population non-myocytaire, les rats exprimant un dominant négatif de NPRB développent une hypertrophie significative attribuée à une augmentation de la taille des cardiomyocytes (Doyle, Upshaw-Earley et al. 2002; Langenickel, Buttgerit et al. 2006). De part ces effets anti-hypertrophiques et anti-prolifératifs, le CNP pourrait avoir un potentiel clinique dans le contexte du remodelage cardiaque. L'administration de CNP à des rats ayant subi un infarctus du myocarde expérimental, empêche d'ailleurs l'hypertrophie ventriculaire gauche et préserve la contractilité et la relaxation ventriculaire. Ce phénomène est dû à l'effet conjugué du CNP sur les cardiomyocytes et sur les fibroblastes (Soeki, Kishimoto et al. 2005). De plus, l'expression du CNP dans le ventricule gauche est augmentée suite à une ligature coronarienne, suggérant un rôle paracrine compensatoire du système CNP/NPRB dans ces conditions pathophysiologiques. Des souris transgéniques surexprimant le CNP spécifiquement dans les cardiomyocytes et soumises à une ischémie/reperfusion ou à un infarctus du myocarde, présentent moins de nécrose, de dégénérescence musculaire, d'inflammation et de dégradation de la fonction cardiaque que les souris contrôle. De plus, elles ne développent pas d'hypertrophie cardiaque suite à l'infarctus du myocarde, comme les souris contrôle (Wang, de Waard et al. 2007). Il a également été démontré que le myocarde était le site de

production du CNP dans l'IC (Kalra, Clague et al. 2003), ce qui renforce l'idée du rôle cardioprotecteur du CNP en conditions pathologiques .

1.4 Effets sur le système nerveux autonome

Le CNP est le peptide natriurétique majeur dans le système nerveux central, où le NPRB est aussi largement exprimé. Ceci suggère un rôle du système CNP/NPRB dans le contrôle central de l'homéostasie cardiovasculaire (Imura, Nakao et al. 1992). Plusieurs études suggèrent l'implication du NPRB dans la régulation centrale de l'activité des nerfs autonomes. L'injection cérébroventriculaire de CNP active par exemple le nerf vague (Sabbatini, Rodriguez et al. 2005). Le CNP aurait également des effets locaux sur la neurotransmission vagale cardiaque. Ainsi, le CNP augmente la force contractile du myocarde et la fréquence sinusale, de manière GMPc dépendante, dans des préparations perfusées d'oreillette droite et de ventricule gauche (Hirose, Furukawa et al. 1998). Les souris exprimant un dominant négatif du NPRB présentent une fréquence cardiaque élevée en parallèle avec une augmentation de l'activité des nerfs sympathiques, suggérant encore une fois un rôle du système CNP/NPRB dans l'inhibition du système nerveux autonome (Langenickel, Buttgerit et al. 2006).

2. Régulation de la croissance osseuse

L'effet physiologique le plus évident du CNP, par l'intermédiaire de NPRB, est de stimuler la croissance osseuse endochondrale. Il régule plusieurs types de cellules osseuses, mais sa cible majeure semble être le chondrocyte. CNP et NPRB sont prédominants dans l'os, comparés aux autres membres de la famille de peptides natriurétiques (Chusho, Tamura et al. 2001). L'ossification endochondrale est responsable du développement de la majorité des os. Durant ce processus, les chondrocytes subissent une série de changements phénotypiques bien orchestrés (**Figure 3.10**). Dans la zone de latence, les chondrocytes immatures accélèrent leur rythme de division pour devenir des chondrocytes prolifératifs. Après plusieurs divisions, ces cellules interrompent leur cycle cellulaire et commencent leur différenciation terminale en chondrocytes hypertrophiques. Finalement, la zone hypertrophique de la plaque de croissance se minéralise, est envahie de vaisseaux

sanguins, est graduellement résorbée et remplacée par du tissu osseux. Les chondrocytes sécrètent également des molécules de matrice extracellulaire, comme le collagène II et l'aggrecan, indispensables pour la formation de la plaque de croissance et la minéralisation subséquente (Teixeira, Agoston et al. 2008).

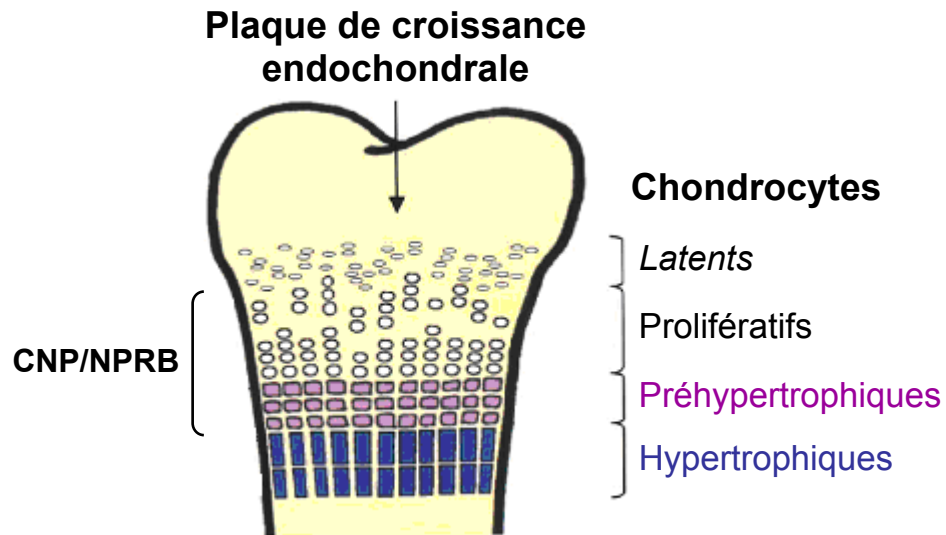


Figure 3.10 : Représentation schématique de l'ossification endochondrale. Les différents stades de différenciation des chondrocytes sont notés. CNP et NPRB sont exprimés dans les chondrocytes prolifératifs et préhypertrophiques. Modifié de (Bartels, Bukulmez et al. 2004).

Le rôle du CNP dans la croissance osseuse est étudié depuis une 15aine d'années. Il avait d'abord été observé que la vitamine D, qui stimule l'expression du CNP, stimule l'activité de désorption de l'os d'un modèle d'ostéoclaste de souris, de manière GMPc dépendante (Holliday, Dean et al. 1995). Dans les ostéoblastes, CNP augmente l'expression des marqueurs de différenciation, comme la phosphatase alcaline, et augmente la minéralisation des nodules (Hagiwara, Inoue et al. 1996). Dans les chondrocytes, CNP augmente les concentrations en GMPc et induit l'ossification endochondrale dans des cultures de tibia de souris (Hagiwara, Sakaguchi et al. 1994; Yasoda, Ogawa et al. 1998). L'importance du CNP et du NPRB dans l'ossification endochondrale n'a été pleinement reconnue qu'après l'inactivation de leur gène chez la souris (Chusho, Tamura et al. 2001; Tamura, Doolittle et al. 2004) (**Tableau 3.1**). Le phénotype le plus frappant de ces souris était

un nanisme sévère. La surexpression de CNP chez les souris entraîne par ailleurs une surcroissance squelettique résultant d'un agrandissement de la plaque de croissance et d'une accélération du rythme d'ossification endochondral (Suda, Ogawa et al. 1998) (**Tableau 3.1**). Le phénotype de nanisme peut être renversé par une surexpression de CNP dans les chondrocytes spécifiquement chez les souris dont le gène du CNP a été inactivé. Ceci suggère que le CNP stimule la croissance osseuse par un effet direct sur les chondrocytes de la plaque de croissance. Les souris qui n'expriment plus le CNP ou le NPRB ont une zone proliférative et une zone hypertrophique très réduites (**Figure 3.10**) (Chusho, Tamura et al. 2001; Yasoda, Komatsu et al. 2004). Il a d'ailleurs été démontré que le traitement de cultures d'os par le CNP entraînait une élongation des zones hypertrophiques due à une augmentation du nombre et de la taille des chondrocytes hypertrophiques (Mericq, Uyeda et al. 2000). Finalement, le CNP fait augmenter la production de matrice extracellulaire et l'expression des gènes impliqués dans la synthèse du protéoglycane. Il supprime aussi l'expression des enzymes impliquées dans la dégradation de la matrice cellulaire (Krejci, Masri et al. 2005). Ensemble, ces données suggèrent que le CNP stimule la croissance osseuse via plusieurs mécanismes incluant la stimulation de la prolifération et de l'hypertrophie des chondrocytes et l'augmentation de la synthèse de matrice extracellulaire par les chondrocytes.

La voie de signalisation du CNP dans les chondrocytes est encore mal connue. Les souris dont le gène de la PKGII, mais pas de la PKGI, a été inactivé présentent un phénotype de nanisme similaire aux souris déficientes en CNP ou NPRB (Pfeifer, Ruth et al. 1999) (**Tableau 3.1**), suggérant la participation de PKGII dans la voie de signalisation du CNP (**Figure 3.11**). Cependant, leurs plaques de croissance sont élargies, contrairement à celle des souris déficientes en CNP ou NPRB, suggérant qu'il existe une voie de signalisation CNP-dépendante mais PKGII-indépendante dans les chondrocytes. Le phénotype de nanisme des souris PKGII (-/-) ne peut cependant pas être renversé par une surexpression de CNP (Miyazawa, Ogawa et al. 2002). Les souris déficientes en CNP ou NPRB présentent des caractéristiques de l'achondroplasie, la forme la plus répandue de nanisme chez l'humain. L'achondroplasie est causée par des mutations activatrices du récepteur du facteur de croissance des fibroblastes (FGFR3). Le FGFR3 constitutivement actif active alors la

voie de signalisation ERK1/2, entraînant une inhibition de la prolifération des chondrocytes et une dégradation de la matrice extracellulaire (**Figure 3.11**). La surexpression de CNP dans les chondrocytes du modèle murin d'achondroplasie renverse partiellement le phénotype de nanisme, suggérant que les voies de signalisation du CNP et du FGF sont intimement liées dans le contrôle de la croissance endochondrale (Yasoda, Komatsu et al. 2004). En fait, le CNP, via l'activation de la PKGII inhibe la voie de signalisation ERK1/2, en inhibant Raf1 (Krejci, Masri et al. 2005) (**Figure 3.11**). Inversement, FGF est capable d'inhiber la voie de signalisation du CNP dans le chondrocyte (Yasoda, Komatsu et al. 2004). D'autres kinases comme p38 et PI3K/Akt pourraient être impliquées dans la différenciation des chondrocytes induite par CNP (Agoston, Khan et al. 2007; Ulici, Hoenselaar et al. 2008). CNP active la voie de la p38 kinase dans les chondrocytes et l'inhibition de p38 inhibe les effets anaboliques du CNP dans les cultures du tibia de souris (**Figure 3.11**). D'autres études sont nécessaires pour caractériser les voies de signalisation impliquées dans la régulation de la croissance osseuse par CNP.

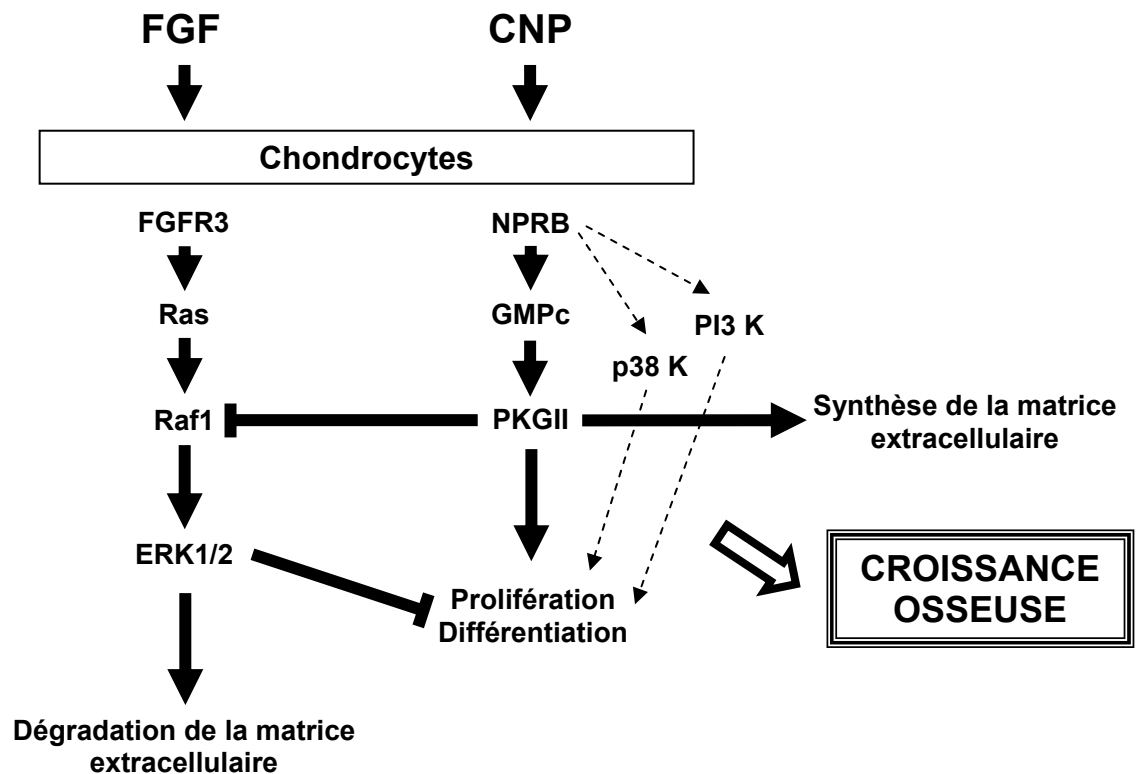


Figure 3.11 : Régulation de la croissance endochondrale par le CNP.

Chez l'humain, des mutations du gène de NPRB ont été liées à la dysplasie acromésomélique de type Maroteaux, une forme rare de nanisme (Bartels, Bukulmez et al. 2004). L'hétérozygotie pour ces mutations est également associée à une petite stature (Olney, Bukulmez et al. 2005). Le fait que la perte d'un seul allèle fonctionnel du gène de NPRB est suffisante pour affecter la croissance osseuse confirme l'importance clinique du système CNP/NPRB dans le contrôle de la croissance endochondrale. Plus récemment, une sucroissance squelettique chez un patient a été corrélée avec une augmentation de l'expression de CNP due à une translocation chromosomale impliquant le gène du CNP (Bocciardi, Giorda et al. 2007). Également, une mutation inactivatrice de la PKGII a été liée à un nanisme « naturel » retrouvé chez la lignée de rat miniature Ishikawa (Chikuda, Kugimiya et al. 2004).

D. Fonctions physiologiques régulées par le NPRC

Le NPRC a d'abord été considéré comme un récepteur silencieux dont le rôle se limitait à la clairance des peptides natriurétiques. Mais comme nous l'avons vu auparavant, certaines voies de signalisation des peptides natriurétiques pourraient être médiées par le NPRC. Les peptides natriurétiques via NPRC sont par exemple capables d'inhiber l'adénylate cyclase et de stimuler la PLC (Chapitre 2.B.1.3.2). Le NPRC serait au moins en partie responsable des effets anti-prolifératifs des peptides natriurétiques. Il a ainsi été démontré que l'ANP et le C-ANP, via NPRC, inhibaient la prolifération des cellules endothéliales et du muscle lisse vasculaire (Cahill and Hassid 1991; Itoh, Pratt et al. 1992). L'action anti-proliférative du C-ANP est atténuée par un inhibiteur de la MEK1/2, indiquant une inhibition de la voie des MAPK (**Figure 3.10**) (Hashim, Li et al. 2006). L'action anti-proliférative du BNP sur les fibroblastes passerait aussi par l'activation du NPRC (Huntley, Sandberg et al. 2006). Le NPRC a également été impliqué dans les effets chronotropiques du CNP. Une étude récente a démontré, en utilisant des cellules sinoatriales de souris, que le CNP inhibait le courant Ca^{2+} de type L, ralentissant ainsi l'activité « pacemaker » de ces cellules. Cet effet était mimé par le C-ANP, le ligand spécifique du NPRC ou par un activateur de la protéine G_i , mais n'était pas bloqué par l'antagoniste de NPRA/B HS-142-1, suggérant que le NPRC est le récepteur impliqué dans les effets chronotropiques cardiaques du CNP (Rose and Giles 2008). Le CNP est aussi un

vasodilatateur puissant des vaisseaux sanguins humains. Il induit la vasorelaxation par hyperpolarisation des cellules du muscle lisse vasculaire (Chapitre 3.C.1.1). Les effets vasodilatateurs du CNP pourraient être médiés en partie par le NPRC. Il a été démontré que le CNP entraînait une relaxation des artères mésentériques. Cet effet était atténué par l'utilisation de la toxine pertussique, impliquant la protéine Gi et le NPRC. De plus, il n'était pas affecté par un inhibiteur de NPRA/B et était mimé par l'utilisation de C-ANP, confirmant l'implication du NPRC (Chauhan, Nilsson et al. 2003). L'implication du CNP et du NPRC dans la relaxation des vaisseaux sanguins a également été démontrée dans les coronaires. Cependant, l'implication du NPRC semble être vaisseaux spécifique. En effet, l'aorte de rat présente une réponse vasorelaxante à l'ANP et au CNP, cependant cet effet ne passe pas par NPRC puisque l'utilisation d'un antagoniste spécifique au NPRC, M372049, n'affecte pas la réponse physiologique aux peptides natriurétiques (Villar, Panayiotou et al. 2007). Dans le muscle lisse gastro-intestinal, NPRC pourrait médier les effets relaxants des peptides natriurétiques, en activant la NO synthase endothéliale (eNOS) via Gi (Murthy, Teng et al. 1998) (**Figure 3.10**).

L'implication du NPRC dans les voies de signalisation des peptides natriurétiques a été peu étudiée et les résultats obtenus sont parfois contradictoires. D'autres études sont nécessaires pour confirmer le rôle du NPRC. L'inactivation du gène du NPRC dans certains tissus, par exemple, pourrait aider à confirmer certains effets qui lui sont attribués. Des souris dont le gène du NPRC a été inactivé ont été générées (**Tableau 3.1**). Elles présentent une surcroissance osseuse, une hypotension, et une diminution du volume vasculaire, compatibles avec une augmentation de la demi-vie des peptides natriurétiques (Matsukawa, Grzesik et al. 1999). NPRC est souvent co-exprimé avec NPRA et/ou NPRB dans les tissus. Il reste à comprendre comment ces récepteurs travaillent de concert pour réguler la physiologie de l'organisme.

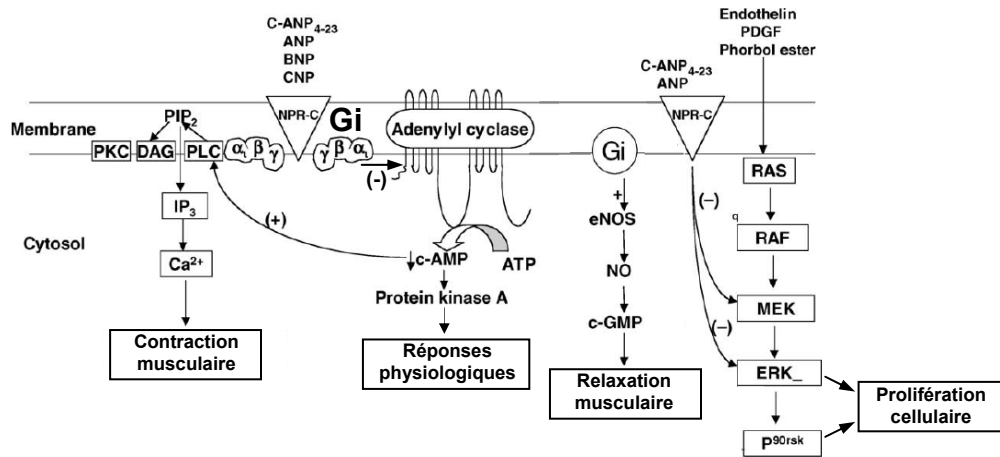


Figure 3.12 : Voies de signalisation du NPRC. Le NPRC est couplé au système de transduction du signal de l'adénylate cyclase par la protéine G hétérotrimérique sensible à la toxine pertussique Gi. L'activation de NPRC par les peptides natriurétiques entraîne une inhibition de l'activité adénylate cyclase et diminue les niveaux d'AMPc. Cette diminution des niveaux d'AMPc stimule le cycle du phosphatidyl inositol (PI). L'activation du NPRC augmente également l'activité de la NO-synthase endothéliale (eNOS) et entraîne une augmentation de la formation de monoxyde d'azote (NO). Le NO stimule la guanylate cyclase soluble et augmente la formation de GMPc, impliqué dans la vasorelaxation. L'activation du NPRC atténue enfin l'activité des MAPK stimulées par l'ET-1, le PDGF et l'ester de phorbol et inhibe de cette façon la prolifération cellulaire. Modifié (Anand-Srivastava 2005).

E. Contribution génétique du système des peptides natriurétiques aux maladies cardiovasculaires.

Plusieurs polymorphismes dans les séquences non-codantes des gènes des peptides natriurétiques ou de leurs récepteurs ont été associés à des maladies cardiovasculaires. Par exemple, le polymorphisme HpaII dans l'intron 2 du gène de l'ANP est observé plus fréquemment chez les afro-américains souffrant d'hypertension sensible au sel (50%) que chez les sujets normotensif (3%), il est aussi plus observé chez les sujets blancs souffrant d'hypertension essentielle (15%) (Rutledge, Sun et al. 1995; Beige, Ringel et al. 1997). Des polymorphismes dans le gène du BNP et du CNP ont aussi été reliés à l'hypertension essentielle dans la population japonaise (Ono, Mannami et al. 2002; Kosuge, Soma et al. 2007).

Une délétion fonctionnelle, dans le promoteur du gène de NPRA, diminuant l'expression du récepteur, a été associée avec une hypertension essentielle et une hypertrophie du ventricule gauche dans la population japonaise (Nakayama, Soma et al. 2000). D'autres mutations dans les parties non codantes du gène de NPRA ont été associées à l'hypertension essentielle, à l'hypertrophie du ventricule gauche et à l'infarctus du myocarde (Nakayama, Soma et al. 2002; Nakayama, Soma et al. 2003; Rubattu, Bigatti et al. 2006). Certains polymorphismes du NPRC ont été associés à l'hypertension reliée à l'obésité (Aoi, Soma et al. 2004).

CHAPITRE 4 : Applications thérapeutiques des peptides natriurétiques

L'ANP et le BNP sont produits par les cellules myocardiales. Ils sont relâchés par le cœur en réponse à un étirement de la paroi. Ce phénomène est exagéré en cas d'insuffisance cardiaque (IC) où les pressions de remplissage sont élevées. L'activation du NPRA entraîne une production de GMPc qui induit la natriurèse, l'inhibition du système RAAS, ainsi que des effets vasorelaxant, anti-fibrotique, anti-hypertrophique et anti-inflammatoire, entre autres. Son origine est majoritairement endothéliale, mais il est largement distribué dans les tissus. Il agit par un mécanisme paracrine. La liaison de CNP au NPRB induit une production de GMPc qui a pour effets principaux : la vasorelaxation, l'inhibition de la prolifération des cellules musculaires lisses vasculaires, de l'hypertrophie des cardiomyocytes et de la croissance des fibroblastes, l'atténuation des blessures myocardiques suite à une ischémie/reperfusion et la prévention du remodelage après un infarctus du myocarde. Le CNP n'a cependant aucun effet natriurétique ou diurétique. L'urodilatine possède 4 acides aminés supplémentaires en N-terminal par rapport à l'ANP et lie le NPRA avec moins d'affinité. Elle agit dans le glomérule et les tubules collecteurs et fonctionne comme un régulateur paracrine de l'excrétion de sodium dans le rein. Etant donné son action cardiorénale protectrice, le système des peptides natriurétiques sert de mécanisme compensatoire important qui contrebalance l'activation neurohormonale délétère impliquée dans l'IC. Cette propriété fait des peptides natriurétiques des outils de choix dans le traitement de l'IC.

Un médicament est défini comme une substance utilisée pour prévenir ou combattre une maladie. Les peptides natriurétiques, qui répondent à ces 2 critères, ont trouvé leur place dans l'arsenal clinique du traitement de l'IC. La quantification des niveaux sérologiques de BNP est utilisée comme diagnostique clinique de l'IC et des formes synthétiques de l'ANP et du BNP ont été approuvées dans certains pays pour le traitement de l'IC. L'urodilatine ainsi que d'autres peptides homologues sont actuellement testés en clinique.

A. ANP (Carperitide)

L'ANP humain recombinant (Carperitide) a été approuvé au Japon en 1995 pour le traitement de l'IC aiguë. L'ANP humain a été évalué dans de multiples études (Tan, Russel et al. 1993). Chez les hommes sains, la perfusion IV d'ANP synthétique diminue la pression sanguine systémique, augmente la filtration glomérulaire et induit une natriurèse et une diurèse marquée (Weidmann, Hasler et al. 1986). Chez les patients atteints d'IC, la perfusion IV d'ANP induit la natriurèse et la diurèse, inhibe le RAAS, diminue la pression sanguine systémique et la pression dans les capillaires pulmonaires. Cependant, la réponse rénale est atténuée en IC, comparée à celle observée chez les sujets sains (Cody, Atlas et al. 1986). Cette résistance relative aux peptides natriurétiques n'a pas été bien définie, mais des explications potentielles ont été proposées : une régulation négative des récepteurs aux peptides natriurétiques dans le rein, une diminution de la production ou une augmentation de la dégradation du GMPc, une augmentation de l'activité de la NEP ou une augmentation de l'activité du RAAS. L'efficacité et l'innocuité du carperitide ont été évaluées sur 6 ans sur des patients souffrants d'IC aiguë et il a été rapporté que 83 % des patients présentait une amélioration clinique.

B. BNP (Nesiritide)

Le BNP humain recombinant (Nesiritide) a été approuvé aux États-Unis en 2001 pour le traitement de l'IC décompensée aiguë. Il est produit chez E. Coli (Keating and Goa 2003). Le BNP affiche les mêmes effets physiologiques que le BNP endogène. Sa demi-vie est plus longue que celle de l'ANP synthétique (18 min contre 1,7 min). Le nesiritide diminue la pression de remplissage, diminue la résistance vasculaire systémique et pulmonaire et augmente le débit cardiaque d'une manière dose-dépendante (Lee and Burnett 2007; Woodard and Rosado 2007). L'efficacité du nesiritide dans le traitement de l'IC a été évaluée dans plusieurs études cliniques. Chez les patients souffrants d'IC décompensée, le nesiritide réduit la pression dans les capillaires pulmonaires et améliore significativement la dyspnée, l'épuisement et le statut clinique global. De plus, le nesiritide s'est montré aussi efficace sur ces critères que le traitement standard. Il induit également la vasodilatation (Colucci, Elkayam et al. 2000) (**Tableau 4.1**). Dans le traitement de

l'IC congestive aiguë, le nesiritide s'est montré plus efficace que la nitroglycérine à réduire la pression dans les capillaires pulmonaires et aussi efficace dans l'amélioration de la dyspnée. Il augmente également le taux de filtration glomérulaire et la fraction de filtration ainsi que la diurèse et la natriurèse. De plus, contrairement à la nitroglycérine, il n'a pas d'effet arythmogène et n'augmente pas la consommation myocardiale d'oxygène (Lee and Burnett 2007; Woodard and Rosado 2007) (**Tableau 4.1**). L'effet secondaire le plus commun de l'utilisation du Nesiritide, comme du Carperitide, est l'hypotension. De récentes analyses des données d'essai clinique du Nesiritide l'ont associé à des effets délétères sur la fonction rénale et à une augmentation de la mortalité à court terme (**Tableau 4.1**). Ces effets délétères n'ont pas été bien décrit, mais pourraient impliquer l'hypotension systémique induite par les peptides natriurétiques, avec une réduction subséquente de la pression de perfusion rénale et l'activation du RAAS (Sackner-Bernstein, Kowalski et al. 2005; Sackner-Bernstein, Skopicki et al. 2005). Il a été recommandé de limiter l'utilisation du nesiritide en attendant que d'autres études cliniques étudient en profondeur les risques et les bénéfices de son utilisation. L'utilisation de plus faibles doses de Nesiritide, pour éviter l'hypotension, pourrait cependant améliorer la fonction rénale (Riter, Redfield et al. 2006).

Des études ont montré que les concentrations plasmatiques d'ANP et de BNP augmentaient de 10 à 30 fois et de 200 à 300 fois respectivement, en cas d'IC congestive. En fait, les concentrations d'ANP et de BNP augmentent de manière proportionnelle à la sévérité de la dysfonction ventriculaire gauche (Yoshimura, Yasue et al. 1993). Ce phénomène fait de ces peptides de bons marqueurs pour le diagnostic et le pronostic de l'IC. Le BNP, qui a une demi-vie plus longue que l'ANP, est un marqueur de choix. Les tests immunologiques pour mesurer les niveaux plasmatiques de BNP sont utilisés couramment en clinique, dans le cadre de la gestion de l'IC (Richards, Lainchbury et al. 2004). Les niveaux de BNP sont également mesurés après un infarctus du myocarde ou une chirurgie cardiaque, pour évaluer la fonction cardiaque et la capacité de récupération (Wazni, Martin et al. 2004; Makikallio, Makikallio et al. 2005). Le BNP pourrait également être un bon marqueur en cas de septicémie, de choc septique ou d'insuffisance rénale, des cas

dans lesquels les niveaux de BNP sont également augmentés (Maeder, Fehr et al. 2006; Obineche, Pathan et al. 2006).

Effets bénéfiques	Effets délétères
Vasodilatation vasculaire, réduction de la pré-charge et de la post-charge cardiaque, augmentation du débit cardiaque	Possible risque de mort à court terme (30 jours) pour les patients souffrant d'insuffisance cardiaque décompensée aiguë
Augmentation du taux de filtration glomérulaire et de la fraction de filtration	Perfusions de Nesiritide de 24h ou plus associées à une dégradation de la fonction rénale
Augmentation du volume d'éjection	
Pas de risque de mortalité supplémentaire après 30 jours et 180 jours	
Augmentation de la diurèse et de la natriurèse	
Diminution de la pression dans les capillaires pulmonaires et l'oreillette droite	
Pas d'arythmie, de tachycardie ou d'augmentation de la consommation myocardique en oxygène	

Tableau 4.1 : Effets bénéfiques et délétères du Nesiritide dans le système cardiovasculaire et rénal. Modifié de (Woodard and Rosado 2007).

C. Autres peptides natriurétiques

L'urodilatine humaine recombinante (Ularitide) est actuellement en développement clinique en Europe et aux Etats-Unis (Lee and Burnett 2007). Elle induit des effets diurétiques et natriurétiques et une diminution de la pression sanguine (Carstens, Jensen et al. 1998). Elle a une demi-vie un peu plus longue que l'ANP (5,57 min) et ne diminue que la pression sanguine diastolique, alors que l'ANP diminue les pressions sanguines diastolique et systolique. Par contre, l'urodilatine est plus puissante pour induire l'excrétion de sodium que l'ANP (Saxenhofer, Raselli et al. 1990). Chez les patients en IC décompensée chronique, l'urodilatine réduit significativement la pression dans les capillaires pulmonaires et la pression artérielle rénale, mais n'a pas d'effet supplémentaire sur la diurèse (Mitrovic, Luss et al. 2005).

Le DNP, un peptide natriurétique identifié dans le venin de serpent, mais dont l'existence endogène chez l'humain reste à vérifier, serait un autre peptide intéressant dans le traitement de l'IC. Il a les mêmes propriétés cardiorénales que les autres peptides natriurétiques, mais a plus d'affinité pour le NPRA que l'ANP et le BNP (Singh, Kuc et al. 2006). Chez le chien, le DNP réduit significativement la pression artérielle moyenne et la pression dans les capillaires pulmonaires. Il réduit la précharge et la post-charge cardiaque, augmente légèrement la contractilité et améliore la relaxation. Il a des effets diurétiques et natriurétiques. Dans un modèle d'insuffisance cardiaque chez le chien, le DNP supprime l'activité plasmatique de la rénine, induit la diurèse et la natriurèse, augmente le taux de filtration glomérulaire et réduit la pression de remplissage cardiaque (Lisy, Jougasaki et al. 1999; Lisy, Lainchbury et al. 2001). Le DNP aurait de plus une demi-vie plus longue que l'ANP puisqu'il est résistant à la dégradation par la NEP (Chen, Lainchbury et al. 2002).

Plusieurs peptides natriurétiques chimériques ont été mis au point dans le but d'obtenir un profil pharmacologique unique. Le peptide vasonatine par exemple est une chimère des 22 acides aminés du CNP et des 5 derniers acides aminés C-terminaux de l'ANP. Il présente les effets vénéodilatateurs et natriurétiques caractéristiques du CNP et de l'ANP respectivement. Il possède de plus des effets vasorelaxants sur les artères et les veines plus puissant que l'ANP ou le CNP seul (Wei, Kim et al. 1993). Plus récemment, un autre peptide chimérique a été mis au point, le CD-NP, qui combine la structure en anneau et l'extrémité exocyclique N-terminale du CNP et l'extrémité exocyclique C-terminale de 15 acides aminés du DNP. Le CD-NP a été mis au point pour combiner les propriétés venodilatatrices et cardiaques uniques du CNP et les propriétés rénales bénéfiques du DNP. Chez le chien, le CD-NP diminue les pressions de remplissage cardiaque, induit la diurèse et la natriurèse et inhibe la relâche de rénine. De plus, il a un effet hypotenseur plus faible que le BNP, ce qui est un avantage puisque l'hypotension est l'effet secondaire néfaste des peptides natriurétiques utilisés jusqu'à présent (Lisy, Huntley et al. 2008). Les propriétés uniques du CD-NP s'expliquent aussi par le fait qu'il est également capable d'activer le NPRA (agoniste partiel) contrairement au CNP (Dickey, Burnett et al. 2008). Le CD-NP fait actuellement l'objet d'une étude clinique chez des sujets sains volontaires. Les premiers résultats montrent que le CD-NP a des effets

natriurétiques et préserve la fonction rénale, sans induire d'hypotension excessive. De plus, il supprime les niveaux plasmatiques d'aldostérone (Lee, Chen et al. 2009). Ces propriétés sont particulièrement intéressantes dans le traitement de l'IC ou pour réduire le remodelage ventriculaire après un infarctus du myocarde. L'efficacité du CD-NP chez les patients souffrants d'IC reste encore à prouver.

La plus grande limitation de l'utilisation des peptides natriurétiques dans le traitement des maladies cardiovasculaires est sa voie d'administration. À cause de leur nature peptidique et de leur demi-vie très courte, les peptides natriurétiques doivent être administrés en IV, un mode d'administration qui ne convient pas à un traitement chronique. Le développement de peptides pouvant être administrés par voie orale a été un défi pendant longtemps, étant donné les nombreuses barrières à l'absorption et à la pénétration des protéines. Récemment, une forme orale de BNP, attaché de façon covalente à de petits oligomères amphiphiles a été mise au point. Chez le chien, cette forme orale conjuguée du BNP induit une production de GMPc et a des effets hypotenseurs (Cataliotti, Schirger et al. 2005). Dans un modèle d'hypertension aiguë chez le chien, cette forme orale de BNP diminue également la pression artérielle moyenne (Cataliotti, Chen et al. 2008). L'existence d'une forme orale de BNP permettrait son utilisation dans le traitement de l'hypertension. Une forme recombinante du BNP humain fusionnée avec l'albumine humaine a également été mise au point. Elle montre une demi-vie étendue comparée au BNP (12 à 19h vs 3 min) et réduit la pression sanguine des rats spontanément hypertendus (Wang, Ou et al. 2004).

Outre ses propriétés cardiovasculaires, le CNP joue un grand rôle dans la croissance osseuse. Cette propriété unique pourrait aussi être utilisée en clinique dans le traitement des dysplasies squelettiques. Il a récemment été démontré dans un modèle d'achondroplasie (la forme la plus répandue de nanisme chez l'humain) chez la souris que l'administration systémique et la surexpression de CNP renversait le phénotype de croissance osseuse réduite sans effets secondaires significatifs (Yasoda, Kitamura et al. 2009). Le CNP pourrait également être utilisé pour accélérer la guérison des fractures osseuses. En effet, il a été observé que les souris dont le gène

de la PKGII, le principal effecteur du CNP dans l'os, a été inactivé guérissent beaucoup plus lentement que les souris contrôle (Chikuda, Kugimiya et al. 2004).

CHAPITRE 5 : Problématiques

Un des enjeux les plus importants dans le domaine de la signalisation des récepteurs est de comprendre comment la reconnaissance extracellulaire du ligand mène à l'activation d'une signalisation intracellulaire. Cette question reste évasive, même pour les systèmes les plus étudiés (rhodopsine, récepteurs des cytokines, récepteurs de chimiotactisme, etc). Pour les récepteurs à simple ou multiples passages transmembranaires, l'oligomérisation induite par le ligand est clairement un paradigme important pour l'activation des récepteurs, mais les transitions allostériques, ou changements de conformation semblent être également nécessaires (Ottemann, Xiao et al. 1999; Ferguson, Berger et al. 2003). Une variété de structures de récepteurs en complexe avec leur ligand suggère que l'oligomérisation des récepteurs induite par le ligand est nécessaire pour initier la signalisation des récepteurs de la surface cellulaire (de Vos, Ultsch et al. 1992; Banner, D'Arcy et al. 1993). Cependant, il a été démontré que de petites différences d'orientation des sous-unités de récepteur, comme observées pour les récepteurs de chimiotactisme, de l'EPO ou de la GH, peuvent faire varier la puissance du signal en aval ou même entraîner l'activation de voies de signalisations différentes (Syed, Reid et al. 1998; Falke and Hazelbauer 2001; Rowlinson, Yoshizato et al. 2008). Ainsi, la signalisation requière plus qu'un simple rapprochement de 2 sous-unités de récepteur : il est donc nécessaire d'avoir une meilleure compréhension de comment une réorganisation structurale allostérique peut agir comme intermédiaire entre la liaison du ligand et l'activation du récepteur.

Le NPRA serait présent à la surface des cellules sous forme d'homodimère pré-associé (Chinkers and Wilson 1992; Lowe 1992). La présence de ligand n'est pas requise pour observer une dimérisation, mais la dimérisation est nécessaire à l'activation du NPRA. Le NPRA possède des interfaces dimériques au niveau extracellulaire et intracellulaire (Chinkers and Wilson 1992; Joubert, McNicoll et al. 2007). Il a été rapporté que la forme soluble de l'ECD du NPRA était monomérique en absence du ligand, indiquant que l'ANP était indispensable à la dimérisation de l'ECD (Misono, Sivasubramanian et al. 1999). Pourtant, la structure cristalline de

l'ECD de NPRA en absence de ligand montre bien un dimère avec une interface de dimérisation distale (Misono, Ogawa et al. 2005) (**Figure 2.8**). Même si la stabilisation de la forme dimérique de l'ECD du NPRA semble cruciale à l'initiation de l'activation du récepteur, son état monomérique ou dimérique à l'état de base reste à être confirmé. De plus, les étapes du processus de dimérisation de l'ECD induite par l'ANP n'ont jamais été définies. Pour le récepteur de l'hormone de croissance (GHR) et les récepteurs de certaines cytokines de type I et interférons, qui ont une topologie similaire au NPRA, les étapes de dimérisation de l'ECD sont les suivantes. Le site I du ligand interagit d'abord avec une sous-unité de récepteur (Cunningham, Ultsch et al. 1991). Ce premier contact est suivi par l'interaction du site II du ligand avec une 2^{ème} sous-unité de récepteur, entraînant la formation d'un complexe dimérique plus stable qui serait responsable de l'activation du récepteur (Cunningham and Wells 1993) (**Figure 5.1**). Les analogues de la GH, mutés sur le site II, ne sont pas capables de lier la seconde sous-unité de récepteur et agissent comme des antagonistes (Fuh, Cunningham et al. 1992). De plus, à haute concentration, la GH se lie selon un ratio 1:1, empêchant la dimérisation du récepteur, ce qui produit des courbes dose-réponse en forme de cloche (Cunningham, Ultsch et al. 1991) (**Figure 5.1**).

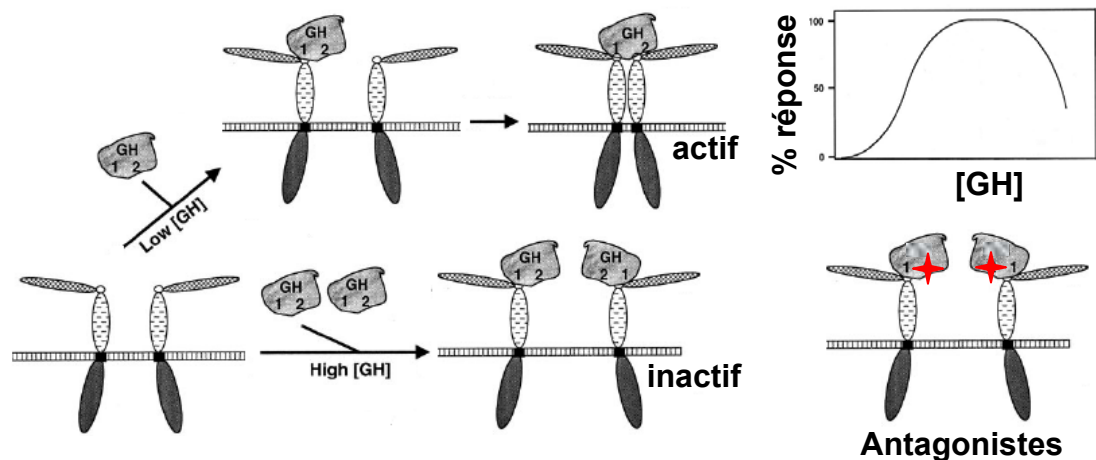


Figure 5.1 : Processus de dimérisation du GHR. Modifié de (Frank 2002).

La pré-association du NPRA en absence de ligand laisse croire que la dimérisation du récepteur induite par l'ANP n'est pas suffisante pour activer le récepteur. Dans ce sens, plusieurs études suggèrent que la liaison de l'ANP entraîne

un changement de conformation dans la région juxtamembraine extracellulaire. En effet, la liaison de l'ANP conduit à une augmentation de la sensibilité de la région juxtamembranaire aux protéases (Huo, Abe et al. 1999). De plus, la mutation C423S, qui fait disparaître une boucle intrachaine fermée par un pont disulfure en laissant la cystéine 432 libre, produit un récepteur dimérique covalent et constitutivement actif (Labrecque, Mc Nicoll et al. 1999). Le mutant D435C, quant à lui, présente une cystéine libre 3 résidus en aval de la cystéine 432 et ne forme un dimère covalent qu'en présence d'ANP (Labrecque, Deschenes et al. 2001). Ensemble, ces données suggèrent que la liaison de l'ANP entraîne un changement de conformation, tel un mouvement latéral ou une rotation des domaines juxtamembranaires de chaque sous unité. Des études cristallographiques de la forme soluble de l'ECD du NPRA complexé ou non à l'ANP ont confirmé l'hypothèse d'un changement de conformation des domaines juxtamembranaires, bien que la documentation structurale de cette région ne soit que partielle (Misono, Ogawa et al. 2005). La conformation correcte du domaine juxtamembranaire est en effet probablement dépendante de son ancrage dans la membrane plasmique. Le changement de conformation du domaine juxtamembranaire semble donc jouer un rôle crucial dans la transduction du signal à travers la membrane. Ce mécanisme de transduction reste cependant à être identifié, dans le contexte d'un récepteur natif pleine longueur. Pour certains récepteurs des cytokines et les récepteurs à activité tyrosine kinase, le mécanisme communément proposé implique une rotation des sous unités dans le récepteur dimérique (Bell, Tynan et al. 2000; Moriki, Maruyama et al. 2001; Brown, Adams et al. 2005; Lu, Gross et al. 2006). Les auteurs des études cristallographiques de l'ECD de NPRA avaient également proposé un mécanisme de rotation (Misono, Ogawa et al. 2005).

L'objectif de mon doctorat était d'étudier les mécanismes moléculaires d'activation du NPRA. Dans un premier volet, nous nous sommes intéressés à déterminer le rôle de la dimérisation du domaine extracellulaire dans l'activation du NPRA et à identifier les différentes étapes du processus de dimérisation (Chapitre 6) (Parat, McNicoll et al. 2008). Nous avons utilisé des techniques de liaison de radioligands, d'extinction de fluorescence (FRET) et de modélisation moléculaire pour caractériser la liaison à l'ECD de NPRA des ligands naturels ANP et BNP, d'un

superagoniste BANP et d'un antagoniste A71915. Nous avons pu démontrer que l'ANP se lie à un dimère d'ECD pré-formé et que la dimérisation spontanée est l'étape limitante du processus de liaison du ligand. De plus, nous avons démontré par étude de la dimérisation par extinction de fluorescence que tous les peptides, incluant l'antagoniste, stabilisent le récepteur sous sa forme dimérique. Cependant, l'antagoniste A71915 stabilise le dimère d'ECD dans une conformation différente de celle induite par l'ANP. Ensembles, ces données nous ont permis de confirmer que la dimérisation du NPRA était nécessaire, mais non suffisante à l'activation du récepteur et que l'état d'activation du récepteur était dépendante de l'orientation des sous unités de récepteur dans le dimère.

Dans un deuxième volet, nous avons cherché à identifier le changement de conformation, initié par l'ANP, et responsable de la transduction du signal à travers la membrane plasmique (Chapitre 7) (Parat et al. 2009 en soumission). Pour analyser ce changement conformationnel, nous avons tout d'abord substitué séquentiellement les 9 acides aminés du domaine juxtamembranaire par une cystéine. En étudiant la capacité des mutants à former des dimères covalents de façon constitutive ou induite par l'ANP, nous avons évalué la proximité relative des résidus du domaine juxtamembranaire, avant et après activation du NPRA. Ces résultats obtenus avec un récepteur pleine longueur ont démontré une proximité élevée de certains résidus spécifiques et sont en contradiction avec les données cristallographiques. Nous avons aussi testé l'hypothèse que le signal de transduction impliquerait un mécanisme de rotation des domaines transmembranaires, menant à l'activation du domaine intracellulaire. En introduisant 1 à 5 alanines dans l'hélice- α du domaine transmembranaire, nous avons démontré qu'une rotation des domaines transmembranaires de 40° induit une activation constitutive du NPRA. Finalement, nous avons étudié le rôle du domaine transmembranaire dans la dimérisation du NPRA. En utilisant le système ToxR, nous avons démontré que les derniers résidus du domaine juxtamembranaire sont requis pour stabiliser le dimère. Ces données expérimentales nous ont permis de générer un nouveau modèle moléculaire illustrant la conformation active du NPRA, où les domaines juxtamembranaires et transmembranaires sont représentés.

**DEUXIEME PARTIE : PRÉSENTATION DES
ARTICLES**

**CHAPITRE 6 : Role of Extracellular Domain
Dimerization in Agonist-Induced Activation of
Natriuretic Peptide Receptor A**

Marie Parat, Normand McNicoll, Brian Wilkes, Alain Fournier, and André De Léan

Molecular Pharmacology (2008) 73 (2), 431-440

Département de Pharmacologie, Faculté de Médecine, Université de Montréal,
Montréal, Québec, Canada, H3T 1J4

Abstract

Natriuretic peptide receptor (NPR) A is composed of an extracellular domain (ECD) with a ligand binding site, a single transmembrane region, a kinase homology domain, and a guanylyl cyclase domain. The natural agonists atrial and brain natriuretic peptides (ANP, BNP) bind and activate NPRA, leading to cyclic GMP production, which is responsible for their role in cardiovascular homeostasis. Previous studies suggested that stabilization of a dimeric form of NPRA by agonist is essential for receptor activation. However, ligand specificity and sequential steps of this dimerization process have not been investigated. We used radioligand binding, fluorescence resonance energy transfer homoquenching, and molecular modeling to characterize the interaction of human NPRA-ECD with ANP, BNP, the superagonist (Arg¹⁰,Leu¹²,Ser¹⁷,Leu¹⁸)-rANP-(1-28), the minimized analog mini-ANP and the antagonist (Arg⁶,β-cyclohexyl-Ala⁸,D-Tic¹⁶,Arg¹⁷,Cys¹⁸)-rANP-(6–18)-amide (A71915). ANP binds to preformed ECD dimers and spontaneous dimerization is the rate-limiting step of the ligand binding process. All the studied peptides, including A71915 antagonist, induce a dose-dependent fluorescence homoquenching, specific to dimerization, with potencies highly correlated with their binding affinities. A71915 induced more quenching than other peptides, suggesting stabilization by the antagonist of ECD dimer in a distinct inactive conformation. In summary, these results indicate that the ligand-induced dimerization process of NPRA is different from that for cytokine receptor model. Agonists or antagonists bind to preformed dimeric ECD, leading to dimer stabilization in an active or inactive conformation, respectively. Furthermore, the highly sensitive fluorescence assay designed to assess dimerization could serve as a powerful tool for further detailing the kinetic steps involved in natriuretic peptide receptor binding and activation.

Abbreviations : ANP, atrial natriuretic peptide; NPR, natriuretic peptide receptor; ECD, extracellular domain; KHD, kinase homology domain; GC, guanylyl cyclase domain; GHR, growth hormone receptor; GH, growth hormone; FRET, fluorescence resonance energy transfer; rANP, rat atrial natriuretic peptide; pBNP, porcine brain natriuretic peptide; BANP, (Arg¹⁰,Leu¹²,Ser¹⁷,Leu¹⁸)-rANP-(1-28); mini-ANP, (Met⁵,Cys^{6,17},His⁷,Ser¹⁶,Tyr¹⁸,Arg¹⁹)-rANP-(5-19)-amide; A71915, (Arg⁶, β -cyclohexyl-Ala⁸,D-Tic¹⁶,Arg¹⁷,Cys¹⁸)-rANP-(6-18)-amide; C-ANF, (Des-Gln¹⁸,des-Ser¹⁹,des-Gly^{20,22},des-Leu²¹)-rANP-(4-23)-amide; CNP, C-type natriuretic peptide; hANP, human atrial natriuretic peptide; hNPRA, human natriuretic peptide receptor A; AF488, Alexa Fluor 488; WT, wild type; SFM, serum-free medium; PAGE, polyacrylamide gel electrophoresis; A68828, (3*S*)-4-[[[(2*S*)-1-[[[(2*S*,3*S*)-1-[[[(2*S*)-1-[[[(2*S*)-1-[[[(2*R*)-1-[[[(2*R*)-2-[[[(2*S*)-2-amino-5-carbamimidamidopentanoyl]amino]-3-sulfanylpropanoyl]amino]-1-oxo-3-sulfanylpropan-2-yl]amino]-5-carbamimidamido-1-oxopentan-2-yl]amino]-3-cyclohexyl-1-oxopropan-2-yl]amino]-3-methyl-1-oxopentan-2-yl]amino]-5-carbamimidamido-1-oxopentan-2-yl]amino]-3-[[[(2*S*,3*S*)-2-[[[(2*S*)-2-[[2-[[2-[(2*S*)-2-amino-3-cyclohexylpropanoyl]-iminoacetyl]amino]acetyl]amino]-5-carbamimidamidopentanoyl]amino]-3-methylpentanoyl]amino]-4-oxobutanoic acid.

Introduction

Natriuretic peptides provide an essential counterbalance mechanism to the renin-angiotensin-aldosterone system (Gardner et al., 2007). Their cardioprotective role is exemplified in gene knockout studies that have shown that they act locally to prevent cardiac hypertrophy (Kuhn, 2004). Gene polymorphism of atrial natriuretic peptide (ANP) and of natriuretic peptide receptor (NPR) type A has been associated with increased left ventricular mass in essential hypertensive patients (Rubattu et al., 2006). Natriuretic peptides are currently used as therapeutic agents in the treatment of the acute phase of myocardial infarct (Strain, 2004; Lee and Burnett, 2007).

ANP cellular action is mediated through NPRA. This receptor is typical of membrane guanylyl cyclases, and it is formed of five domains (Padayatti et al., 2004). An extracellular domain (ECD) specifically binds natriuretic peptides in a 2:1 stoichiometric ratio (Rondeau et al., 1995; He et al., 2001; Ogawa et al., 2004). A single transmembrane domain transfers the activation conformational change from the ECD to the cytoplasmic domain. The cytoplasmic domain includes a kinase homology domain (KHD), which allosterically regulates both peptide binding to the ECD and activation of the effector guanylyl cyclase (GC) (Larose et al., 1991; Duda et al., 2005). The KHD directly binds ATP after activation of the ECD by ANP (Joubert et al., 2005). It is also normally phosphorylated, and its dephosphorylation coincides with desensitization of NPRA to ANP activation (Joubert et al., 2001; Potter et al., 2006). The KHD and the GC domains are connected by a coiled-coil that maintains the catalytic moieties in close contact. The GC domain presents two functional and allosterically regulated catalytic sites whose structure is jointly contributed by both subunits (Joubert et al., 2007).

The extracellular juxtamembrane region connecting the bilobed ECD to the transmembrane domain seems to play a crucial role in the transmembrane signal transduction mechanism. Mutation C423S disrupts a short intrachain disulfide bridged loop and leads to constitutive activation of NPRA (Labrecque et al., 1999). The unpaired Cys432 of this mutant forms an interchain disulfide, showing that the juxtamembrane regions are juxtaposed. However, mutation D435C, three residues downstream of Cys432, leads to an agonist induced disulfide, indicating that a conformational change, either a translation or a rotation of the subunits, is occurring

upon activation by ANP (Labrecque et al., 2001). Crystallographic study of the soluble ECD of NPRA has confirmed this hypothesis (Ogawa et al., 2004), although no structural documentation of the juxtamembrane region of the ECD was obtained.

The cytokine receptor family displays structural similarities with those of natriuretic peptide receptors. The prototypical growth hormone receptor (GHR) is a homodimeric receptor constituted of an ECD with limited dimerization interface, but with specific binding surfaces for contacting GH, a single transmembrane domain, and a cytoplasmic domain involved in activation of downstream effectors signalling (de Vos et al., 1992). For this hormone and for all cytokines, a site I on the agonist interacts sequentially with one receptor subunit (Cunningham et al., 1991). This first contact is followed by the interaction of site II of the ligand with a second receptor subunit, resulting in a more stable complex and in transmembrane activation (Cunningham and Wells, 1993). GH analogs mutated on site II fail to bind to the second receptor subunit and act as antagonists (Fuh et al., 1992). In addition, native GH at high concentration binds in a 1:1 stoichiometric ratio, resulting in a bell-shaped dose response curve for GH (Cunningham et al., 1991).

In contrast with cytokines, ANP is not well structured in solution (Carpenter et al., 1997). However, in the receptor-bound state it displays a flat ring moiety tightly interfacing with both ECD subunits, resulting in high-affinity binding (Ogawa et al., 2004). Whether NPRA ECD is spontaneously monomeric or dimeric in the inactive state is still debated. It has been reported that the soluble ECD of NPRA is monomeric even at micromolar concentration and that it dimerizes only in the presence of ANP (Misono et al., 1999). However, the sequence of the binding steps of ANP was not defined. We have studied by radioligand binding, FRET homotransfer, and molecular modeling the interaction of NPRA ECD with the agonists rat atrial natriuretic peptide (rANP) and porcine brain natriuretic peptide (pBNP), the superagonist (Arg¹⁰,Leu¹²,Ser¹⁷,Leu¹⁸)-rANP-(1-28) (BANP) (Mimeault et al., 1993; Bodart et al., 1996), the minimized analog (Met⁵,Cys^{6,17},His⁷,Ser¹⁶,Tyr¹⁸,Arg¹⁹)-rANP-(5-19) amide (mini-ANP) (Li et al., 1995), and the antagonist A71915 (von Geldern et al., 1990). The results indicate that ANP binds to preformed ECD dimers and that spontaneous ECD dimerization is the rate limiting step. In addition, we document that both agonists and the antagonist stabilize the ECD dimeric state, but with different conformations.

Materials and Methods

Materials

rANP 1-28 and C-type natriuretic peptide (CNP) were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO). A71915, mini-ANP, pBNP32, and (Des-Gln¹⁸,des-Ser¹⁹,des-Gly^{20,22},des-Leu²¹)-rANP-(4-23)-amide (C-ANF) were obtained from Bachem California (Torrance, CA). BANP (or pBNP1) was synthesized as described previously (Mimeault et al., 1993). Aprotinin, leupeptin, Pefabloc, and pepstatin were purchased from Roche Diagnostics (Laval, QC, Canada). Oligonucleotides were obtained from BioCorp (Montréal, QC, Canada).

Construction of Soluble hNPRA-ECD WT and C423S Mutant

Human full-length NPRA clone, formerly inserted into the expression vector pBK-cytomegalovirus (Stratagene, La Jolla, CA) (Jossart et al., 2005), was used for the construction of deletion mutants containing only the soluble extracellular domain (hNPRA-ECD). A carboxyl-terminal His-Tag epitope (RSHHHHHH) was inserted by polymerase chain reaction mutagenesis at the membrane-proximal end of the extracellular domain of hNPRA, beginning at and replacing residue Glu⁴⁴¹ (mature protein numbering), as described for the rat NPRA (Labrecque et al., 1999). The hNPRA-ECD^{WT} truncation mutant was subcloned into the Sf9 cell expression vector pFastBac1 (Invitrogen Canada Inc., Burlington, ON, Canada). To improve the expression level of the secreted ECD by Sf9 cells, the hNPRA peptide signal was substituted with the melittin peptide signal MKFLVNVALVFMVVYISYIYA, using a synthetic DNA linker replacing the signal peptide up to the first mature residue Gly¹. The disulfide-bridged hNPRA-ECD^{C423S} mutant was obtained by site-directed mutagenesis, using the QuikChange methodology (Stratagene), as described previously (Labrecque et al., 1999).

Transfection of Sf9 Insect Cells

Sf9 cells were grown in SF-900 II SFM medium (Invitrogen Canada Inc.) containing penicillin and streptomycin on a rotating shaker at 28°C. For each transfection, 9 x 10⁵ cells were seeded in a six-well plate, and cells allowed to attach for at least 1 h. Recombinant Bacmid DNA was transfected into Sf9 insect cells using Cellfectin

reagent (Invitrogen Canada Inc.). The Lipid reagent and Bacmid DNA were diluted separately into 100 μ l of Grace's medium without antibiotics, and they were combined to form lipid-DNA complexes that were incubated at 22°C for 45 min. Medium from Sf9 was removed, and cells were washed with 2 ml of Grace's medium (Invitrogen Canada Inc.). The lipid-DNA complexes were then diluted to 1 ml with Grace's medium, laid over the washed Sf9 cells, and incubated at 28°C for 5 h. The medium was then removed, and cells were incubated for another 72 h in 2 ml of SF-900 II SFM medium containing antibiotics. Medium was collected and clarified by centrifugation at 500g for 5 min. Recombinant baculovirus were harvested from supernatant and amplified by subsequent infection steps in Sf9 cells as described in the pFastBac Kit protocol (Invitrogen Canada Inc.).

Titration of Recombinant Baculovirus by Expression in Sf9 Cells

To maximize the expression level of hNPRA-ECDs in Sf9 cells, we tested the multiplicity of infection ratio of recombinant baculovirus over Sf9 cells by sequential dilution. In brief, Sf9 cells (5×10^5) were incubated in 50 ml of SF-900 II SFM medium in 250-ml Erlenmeyer flasks on a rotating shaker for 48 h at 28°C. At the end of the incubation, 2 μ g/ml each of leupeptin and aprotinin were added, followed by increasing amounts of recombinant baculovirus and the incubation was prolonged for another 72 h. A cocktail of proteases inhibitors (2 μ g/ml aprotinin, 2 μ g/ml leupeptin, 2 μ g/ml pepstatin, 0.2 mg/ml Pefabloc, and 0.1 mM EDTA) was then added, and Sf9 cells were centrifuged at 500g for 5 min at 4°C. The supernatants were collected, and an aliquot was denatured in Laemmli sample buffer and submitted to electrophoresis as described below. After the Western blot (see below), bands corresponding to the protein of interest were evaluated by densitometry. The baculovirus dilution corresponding to the maximum level of expression was used to scale up the production of hNPRA-ECD.

Expression of hNPRA-ECD^{WT} and hNPRA-ECD^{C423S} Mutant in Sf9 Cells

Sf9 cells (5×10^8) were incubated in 1000 ml of SF-900 II SFM medium in 250-ml Erlenmeyer flasks (100 ml/flask) on a rotating shaker for 48 h at 28°C. In general,

4ml of recombinant baculovirus was added, and the incubation was prolonged for another 72 h in the presence of leupeptin and aprotinin. After the addition of the protease inhibitors cocktail, the media containing the ECD^{WT} and the ECD^{C423S} were clarified by centrifugation at 500g for 5 min at 4°C and purified to homogeneity.

Purification of hNPRA-ECD

The hNPRA-ECD^{WT} and the hNPRA-ECD^{C423S} were dialyzed against 20 volumes of buffer containing 30 mM Tris-HCl, pH 7.4, and 0.1 mM EDTA, and then they were loaded on a 50-ml bed of anionic exchanger quaternary methyl ammonium (Waters, Mississauga, ON, Canada) equilibrated with the dialyzing buffer. The gel was then washed with 5 volumes of 5 mM NaPO₄, pH 7.4, 30 mM NaCl, and 0.1 mM EDTA, and proteins were eluted with 250 ml of 50m MNaPO₄, pH 7.4, 300 mMNaCl, and 0.1 mM EDTA. After addition of 15% glycerol and 10 mM imidazole, the eluate was loaded on a 3 ml nickel-nitrilotriacetic acid column (QIAGEN, Mississauga, ON, Canada). The gel was washed with 30 ml of 50 mM NaPO₄, pH 7.4, 300 mM NaCl, and 0.1 mM EDTA, and proteins were eluted with 6 ml of the same buffer containing 300 mM imidazole.

The purified ECD was then loaded on 1 ml of ANP-agarose affinity column and washed with 50 mM NaPO₄, pH 7.4, 300 mM NaCl, and 0.1 mM EDTA. The pure protein was eluted with 5 volumes of 1 ml of 50 mM sodium acetate, pH 5.0, 1 M NaCl, and 0.1 mM EDTA in tubes containing 12 µl of 1 M sodium-HEPES to neutralize the pH. The high degree of purity of the hNPRA-ECD was confirmed by Coomassie staining of proteins after analytical SDS-PAGE under reducing and non-reducing conditions.

Electrophoresis and Immunoblot Analysis

For the electrophoresis, proteins were solubilized in Laemmli sample buffer (62mM Tris-HCl, 2% SDS, 10% glycerol, and 0.001% bromophenol blue, pH 6.8) and heated at 100°C for 3 min. For the reducing condition, 5% β-mercaptoethanol was added to the sample buffer before boiling. Electrophoresis was performed in 7.5% polyacrylamide gel. Proteins were stained in protein staining solution PageBlue (MBI Fermentas, Burlington, ON, Canada) as specified by the manufacturer. For the

Western blot, proteins were electrotransferred from polyacrylamide gel to a nitrocellulose membrane (Bio-Rad, Mississauga, ON, Canada) using the liquid Mini Trans-Blot (Bio-Rad). Detection of hNPRA-ECD was achieved using a Tetra-His Antibody (QIAGEN), and the specific signal was probed with a horseradish peroxidase-coupled secondary antibody, according to the ECL Western blotting analysis system (GE Healthcare, Mississauga, ON, Canada). Under reducing conditions, hNPRA-ECD^{WT} behaves as a 56 kDa protein, whereas hNPRA-ECD^{C423S} showed an apparent molecular mass of 109 and 56 kDa under non-reducing and reducing conditions, respectively.

Radioligand Binding Assays

Competitive binding assays were performed in 200 μ l of 50 mM NaPO₄, pH 7.4, 100 mM NaCl, 0.1 mM EDTA, 0.05% lysozyme, 0.1% bovine serum albumin containing 67 fmol (200,000 cpm) and 13 fmol (40,000 cpm) of ¹²⁵I-ANP for incubation with the ECD^{WT} and the ECD^{C423S}, respectively. Increasing concentrations of indicated competing peptides were added, and the reaction was initiated by the addition of 7.4 ng (132 fmol of monomer) for the ECD^{WT} and 4.3 ng (39 fmol of dimer) for the ECD^{C423S}. After 22 h at 22°C, the tubes were cooled down at 4°C. Then, 100 μ l of the reaction medium was loaded on 1.8 ml of Sephadex G-50 (GE Healthcare) and eluted with 50 mM NaPO₄, pH 7.4, 100 mM NaCl, and 0.1 mM EDTA. The void volume containing the ECD-bound radioligand was recovered and quantified in a Perkin-Elmer gamma counter (PerkinElmer Life and Analytical Sciences, Waltham, MA). Kinetic assays were performed under the same conditions as the binding assays. Association was initiated by the addition of ¹²⁵I-ANP (0.3 nM and 66 pM for ECD^{WT} and ECD^{C423S}, respectively). Dissociation was initiated by the addition of an excess of unlabeled rANP (1 μ M). The amount of specific binding was assessed at different times of incubation at 22°C, as described above.

Labeling of Mutant at the Cys432 with Fluorescent Probe

The residue Cys⁴³², which is involved in the interchain disulfide bridge of homodimeric hNPRA-ECD^{C423S}, was used as the specific site for anchoring fluorescent probes. To expose free Cys⁴²³, 125 μ g of pure hNPRA-ECD^{C423S} was

reduced in 250 μ l of 50 mM HEPES, pH 7.4, and 0.1 mM EDTA by reacting at room temperature for 10 min with 20 μ l of 80 mM tris(2-carboxyethyl) phosphine (Promega, San Luis Obispo, CA) in HEPES buffer. After the addition of 12.5 μ l of dimethyl sulfoxide containing 250 μ g of Alexa Fluor 488 C5 maleimide (Invitrogen Canada Inc.), the reaction was carried for two additional hours at room temperature, followed by an overnight incubation at 4°C. The labeled protein was separated from unreacted fluorophore by gel permeation chromatography on PD-10 column (GE Healthcare) using 50 mM NaPO₄, pH 7.4, 100 mM NaCl, and 0.1 mM EDTA as eluant. The final cleaning of the hNPRA-ECD-AF488-labeled protein was achieved by chromatography on nickel-nitrilotriacetic acid column as described above. The protein was aliquoted and kept frozen at -80°C in 10% glycerol until used.

Measurement of ECD Dimerization by FRET Homotransfer

We preincubated 17.6 ng (332 fmol of monomer) of hNPRA-ECD-AF488 in 100 μ l of 50 mM NaPO₄, pH 7.4, 100 mM NaCl, 0.1 mM EDTA, 0.05% lysozyme, 0.1% bovine serum albumin, and Tween 0.01% for 60 min at 22°C in black untreated 96-well (Corning Inc., New York, NY). Then, 100 μ l of increasing concentrations of indicated peptides were added, and the plates were placed on a rotating shaker for 20 s and incubated at 22°C for another hour in the dark. The fluorescence was then measured for 5 s, using a Victor 2 multilabel counter (PerkinElmer Life and Analytical Sciences) with the excitation filter set at 485 nm. The fluorescence was recorded at 535 nm for 5 s. Net fluorescence was corrected by subtraction of background values measured in the absence of ECD protein.

Molecular Modeling of NP-hNPRA-ECD

All calculations were performed using the software package SYBYL (Tripos, St. Louis, MO). The Tripos force field was used for energy calculations, and a dielectric constant of 1 was used. The X-ray crystal structure of rANP 7-27 bound to the rat NPRA dimer (Ogawa et al., 2004) was used as a template for the receptor-bound form of hNPRA-ECD. Each variable amino acid within the ECD dimer complex was replaced one at a time by its equivalent in hNPRA sequence. The backbone dihedral angles were held fixed to preserve the receptor's secondary structure, whereas the

amino acid side chains were positioned using the scan subroutine in SYBYL. This routine rotates each side chain dihedral angle until a sterically acceptable conformation was obtained. The complex was then energy minimized for 1000 steps. No major conformational changes were observed during the minimization process. Modeling of the superagonist BANP bound to hNPRA was based on the contact points found using the photoaffinity results reported previously (Jossart et al., 2005). Both backbone and side chain dihedral angles of these residues were manipulated until steric complementarity with the receptor dimer was obtained and the required ligand-to-receptor contact was formed. At this point, the complex was again subjected to 1000 steps of minimization. For modeling of the antagonist A71915 bound to hNPRA, the NPRA-bound structure of rANP 7-27 reported (Hogawa et al., 2004) was properly modified by deletion and substitution to yield the shorter 11 residue disulfide-bridged loop. Conserved residues between A71915 and rANP 7-27 were then placed at equivalent positions in the binding cleft of the receptor dimer. The complex was then adjusted for steric complementarities with the receptor, and it was subjected to 1000 steps of minimization.

Data Analysis and Statistics

Dose-response curves were analyzed by nonlinear least-squares regression using the four-parameter logistic equation (De Lean et al., 1978).

$$Y = D + \frac{A - D}{1 + \left(\frac{X}{C}\right)^B} \quad (1)$$

where X is the concentration of agent, Y is the response measurement, A is the basal response value in the absence of agent, and D is the maximal response value at high concentration of agent. B is the slope factor of the curve, and C is the concentration of agent at 50% response level.

Radioligand binding saturation and competition curves were analyzed by nonlinear least-squares regression using a model based on the law of mass action for the binding of two ligands to a single class of receptor sites (DeLean et al., 1982). Radioligand binding association kinetics data were analyzed using a model for second order ligand binding to a single class of sites (Rodbard, 1973):

$$B = \frac{V \cdot (U - B_0) - U \cdot (V - B_0) \cdot e^{-k_{on}(U-V)t}}{(U - B_0) - (V - B_0) \cdot e^{-k_{on}(U-V)t}} \quad (2a)$$

where

$$U = \frac{(k_{on} \cdot L_t + k_{on} \cdot R_t + k_{off}) + \sqrt{(k_{on} \cdot L_t + k_{on} \cdot R_t + k_{off})^2 - 4 \cdot k_{on}^2 \cdot L_t \cdot R_t}}{2k_{on}} \quad (2b)$$

$$V = \frac{(k_{on} \cdot L_t + k_{on} \cdot R_t + k_{off}) - \sqrt{(k_{on} \cdot L_t + k_{on} \cdot R_t + k_{off})^2 - 4 \cdot k_{on}^2 \cdot L_t \cdot R_t}}{2k_{on}} \quad (2c)$$

B_0 equals initial binding at time 0 of association kinetics; k_{on} and k_{off} are the association and dissociation constants, respectively; and t is time since the beginning of association kinetics. Dissociation kinetics data were analyzed using a model for a single exponential component.

$$B = B_0 \cdot e^{-k_{off} \cdot t} \quad (3)$$

Statistical testing of repeat experiments was performed by analysis of variance, followed by post hoc Dunnett's or Student-Newman-Keuls test. The logarithmic transform of IC_{50} values were used for statistical tests in the case of competition binding and fluorescence quenching studies.

Results

Characterization of Soluble hNPRA-ECD WT and C423S Mutant

Expression of the rat extracellular domain of NPRA in mammalian cell lines has been described previously (Labrecque et al., 1999; Misono et al., 1999). Based on size-exclusion chromatography, the rat NPRA-ECD behaved in solution as a monomer in the absence of ANP and as a dimer in the presence of ANP (Misono et al., 1999). Expression of human NPRA-ECD in human embryonic kidney-293 cells proved to be more difficult, and they produced a low yield (data not shown). We therefore expressed the human ECD in Sf9 cells, after replacement of the original signal peptide sequence by that of melittin and by addition of a carboxyl-terminal hexahistidine tag. The secreted ECD was harvested in the Sf9 cell culture medium, and it was purified by metal-chelate and affinity chromatography. The pure ECD monomer was obtained at a decent level (100 µg/l). Microsequencing of the amino-terminal of the ECD documented the expected sequence of the mature form [GNLT(V)AVVLP. . .], confirming that cleavage of the melittin signal peptide was properly processed in Sf9 cells. The protein displayed a single homogeneous band of 56 kDa on PAGE (Fig. 1), suggesting that the protein core (~50 kDa) was glycosylated in this expression system. However, detection of Asn² by microsequencing confirmed that this residue was not glycosylated.

We have formerly documented that mutation C423S of rat NPRA disrupts a short disulfide-bridged decapeptide and exposes an unpaired Cys⁴³², which covalently dimerizes NPRA in a manner reminiscent of that of clearance-type receptor NPRC (Labrecque et al., 1999). This mutation also constitutively activates NPRA. It also provides a covalent dimeric form of the soluble NPRA-ECD with an affinity for ANP that is similar to that of full-length NPRA (Labrecque et al., 1999). This mutation was applied to human NPRA-ECD. It yielded a homogeneous 106 kDa band on non-reducing PAGE (Fig. 1), with very little monomeric form. hNPRA-ECD^{C423S} was more easily purified, and it was more avidly retained on ANP affinity gel than NPRA-ECDWT, presumably because of its covalently dimeric state and its higher affinity for ANP.

Equilibrium Binding and Kinetics of ANP on NPRAECD WT and C423S Mutant

Soluble hNPRA-ECD^{WT} proved to be fully competent under equilibrium binding conditions, with a dissociation constant (K_d) of 7.9×10^{-10} M for ANP (Table 1). As expected for a soluble monomeric ECD, this affinity is somewhat lower than that documented for membrane hNPRA (K_d of 1.3×10^{-10} M; Bodart et al., 1996) or intact cell receptor (K_d of 1.6×10^{-10} M; Jewett et al., 1993). In contrast, the disulfide-bridged hNPRA-ECD^{C423S} displayed a significantly higher affinity ($K_d = 1.3 \times 10^{-10}$ M; $p < 0.01$; Table 1) than that for the WT form. This higher affinity of the C423S mutant matched that for the membrane receptor, again strongly suggesting that functional NPRA is naturally dimeric (Labrecque et al., 1999).

For cytokine homodimeric receptors, such as GHR, and heterodimeric receptors, such as type I interferon receptor, ligand binding proceeds sequentially in two steps. Cytokines interact with one receptor subunit of the ECD. Then, dimerization of the ECD increases affinity for the ligand by slowing down the k_{off} of the cytokine (Cunningham et al., 1991; Lamken et al., 2004). To test whether this mechanism applies to homodimeric NPRA, we compared the association and dissociation kinetics of ANP to NPRA-ECD WT and C423S mutant (Fig. 2; Table 1). Binding of ANP to the ECD^{WT} was characterized by an overall k_{on} of $4 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, typical of protein-protein interactions (Schlosshauer and Baker, 2004). However the association kinetics displayed a slight deviation from a second order reaction, and it could be compatible with a two-step process. This suggested that a rate-limiting step was involved, which might correspond to dimerization of the ECD monomers. The dissociation kinetics of ANP from the ECD-WT was very slow and monophasic, with a single k_{off} of $7.6 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$. In the covalently dimeric ECD^{C423S} mutant, association kinetics of ANP was monophasic, with a 16-fold faster k_{on} of $6.6 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, strongly suggesting that the rate-limiting step required for dimerization of the ECD was absent for this mutant. However, the dissociation rate constant k_{off} of $8.4 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ was very similar to that for the ECD^{WT}. These results contrast with those obtained for cytokine receptors, and they indicate that a different mechanism probably occurs for NPRA. A plausible scheme would involve the binding of ANP to preformed ECD dimers. Kinetically derived estimates of K_d , calculated as the ratio $k_{\text{off}}/k_{\text{on}}$, deviate

from estimates obtained with equilibrium binding results (Table 1). Such a discrepancy is not uncommon, and it suggests that a more complex binding process is occurring for the ECD^{WT} and ECD^{C423S} mutant, possibly involving fast rebinding of ANP while still in its active conformation.

Specificity of Binding for Natriuretic Peptide Agonists and Antagonist

In contrast with rNPRA, hNPRA is highly selective for full-length ANP 1-28 (Schoenfeld et al., 1995). hANP and rANP have nearly identical potencies on hNPRA. However, hANP contains a unique residue Met¹² that is oxidized under experimental conditions, leading to a potency loss. Therefore, rANP was preferred as a reference ligand. hBNP is ~8-fold less potent than ANP, and even ~2-fold weaker than pBNP32. CNP, the NPRB-selective peptide, is inactive at submicromolar concentrations. To check whether the soluble hNPRA-ECD could maintain the peptide binding properties of membrane receptor, we tested the specificity of soluble hNPRA-ECD, using a series of natural natriuretic peptides and analogs with agonist and antagonist properties (Table 2; Fig. 3). rANP was ~10-fold more potent than pBNP32, whereas CNP, which is specific for NPRB, and C-ANF, which is specific for NPRC, were inactive.

It is noteworthy that, BANP, which is a chimeric peptide with the cyclic portion from pBNP32 and the exocyclic segments from ANP, proved to be 13-fold more potent than the natural ligand ANP. This confirms the unique properties of this superagonist that we have reported previously (Mimeault et al., 1993; Bodart et al., 1996). Testing of the kinetics of BANP binding to hNPRA-ECD^{WT} indicated that the higher affinity of the superagonist is due to both a 10-fold faster k_{on} ($7.4 \pm 1.6 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$; data not shown) and a slower k_{off} ($<10^{-5} \text{ s}^{-1}$; data not shown), compared with rANP (Table 1). The size-reduced mini-ANP (Li et al., 1995) proved to be 9-fold less potent than ANP. In addition, we tested the potency of the small peptide antagonist A71915 (von Geldern et al., 1990) in this system. A71915 displayed micromolar affinity and completely inhibited ANP binding at 10 μM (Fig. 3; Table 2). The potency order BANP > ANP > BNP ~ mini-ANP >> A71915 >> CNP ~ C-ANF

confirms that the ECD provides a reliable model for the peptide binding site of hNPRA.

Dimerization of ECDWT

We have shown previously (Rondeau et al., 1995) that ANP is binding to NPRA homodimeric subunits in a 1:2 stoichiometric ratio and that a single peptide is contacting both monomers. This was later confirmed by crystal structure determination (Ogawa et al., 2004). Misono et al. (1999) have documented by size-exclusion chromatography that soluble rat NPRA-ECD behaved as monomer in the ligand-free state, but as a homodimer when bound to ANP. However the ligand specificity of the dimerization process was not established. Therefore, we established a homogeneous assay for soluble hNPRA-ECD that enables measurement in solution of the dimerization state without phase separation. Covalently dimeric hNPRA-ECD^{C423S} was monomerized by reduction with tris(2-carboxyethyl) phosphine and derivatized on free Cys⁴³² with Alexa Fluor 488-maleimide. The residue Cys⁴³² is normally located in a decapeptide disulfide-bridged loop under the membrane-proximal lobe of the ECD. Mutation C423S disrupts the loop, resulting in a flexible region with poorly defined secondary structure and leaving Cys432 exposed and reactive. The resulting fluorescent ECD monomer behaved in ANP binding assays with the same affinity as for underivatized hNPRA-ECDWT (data not shown). Ligand-induced dimerization of the derivatized ECD is expected to bring the two fluorophores of the subunits close together (~50 Å). At this short distance, fluorescence resonance energy homotransfer (autoquenching) should reduce overall fluorescence (Triccerri et al., 2001). As shown in Fig. 4, addition of ANP significantly inhibited fluorescence, directly documenting in solution ligand-induced dimerization without any perturbation by a separation step. The addition of as small as a 1.4-fold excess of underivatized monomeric ECD^{WT} drastically reduced the proportion of fluorescent ECD homodimer to 18% of control (Fig. 4). Addition of ECD^{WT} leads to an almost complete reversal of fluorescence autoquenching induced by ANP. Addition of ECD^{WT} in the absence of ANP also slightly but significantly increased fluorescence (Fig. 4). This strongly suggests that a small portion of ECD is spontaneously dimeric even in the absence of ANP. Attempts to document ANP-

induced dimerization of hNPRA-ECD by FRET heterotransfer using Alexa Fluor 350 and Alexa Fluor 488 as the donor-acceptor pair confirmed those results (data not shown). However, this heterotransfer system was much less sensitive than with homotransfer, and it required at least 20-fold higher concentrations of derivatized-ECD. Therefore, autoquenching based on Alexa Fluor 488-derivatized ECD was used for subsequent studies.

Because agonists are expected to bind to hNPRA-ECD as a homodimeric receptor, we then tested the specificity of natriuretic peptides and analogs in inducing autoquenching observed with ANP. As shown in Fig. 5 and Table 2, agonists dose-dependently inhibited fluorescence with a potency order BANP > ANP > BNP > mini-ANP. Potency estimates of peptides on fluorescence quenching was highly correlated ($r = 0.99$; $p < 0.002$) with those for ANP binding competition when expressed on a logarithmic scale (Table 2), indicating that high-affinity binding involves the dimeric state of hNPRA-ECD. The NPRB-selective peptide CNP was inactive, even at micromolar concentrations. It is noteworthy that the antagonist A71915 also inhibited fluorescence, indicating that the antagonist is binding to a homodimeric form of hNPRA-ECD. This contrasts with the results obtained for GH antagonists, which bind to GHR monomer and fail to induce receptor dimerization (Cunningham et al., 1991; Cunningham and Wells, 1993). In addition, dose-response curves for autoquenching all displayed a lower plateau at high peptide concentration (Fig. 5), indicating that excess peptide could not lead to receptor ECD monomerization. This is again in contrast with GHR (Cunningham et al., 1991), for which GH favours receptor dimerization only at low concentration. This would be expected for such a system where the agonist first binds with high affinity to an ECD monomer, followed by ECD dimerization, which further increases the affinity for the agonist. The absence for ANP and analogs of any high concentration reversal of dimerization strongly argues that natriuretic peptides, agonists, or antagonists essentially bind to preformed dimeric ECD.

The maximum level of autoquenching obtained at high concentration of peptides was quite reproducible for each peptide, but it clearly differed among them (Table 2). The maximal quenching for the agonist pBNP32 and the antagonist A71915 highly significantly differed from that of ANP and BANP. The higher quenching observed is consistent with a smaller distance between the ECD subunits

(Triccerri et al., 2001). Thus, although all peptides bind to a dimeric form of the ECD, the conformation of the ECD dimer seems to differ among agonists and especially between the agonists and the antagonist.

Molecular Modeling of NP-NPRA-ECD Complex

The crystal structure of rNPRA-ECD bound to rANP 7-27 has been reported previously (Ogawa et al., 2004). The truncated peptide used, equivalent to atriopeptin II [rANP-(5-27)], lacks the exocyclic amino-terminal and the carboxyl-terminal residue Tyr²⁸. It displays low potency, especially on hNPRA (Schoenfeld et al., 1995). Nevertheless, it exemplifies the flat conformation of the natriuretic peptide ring, which is tightly bound in the cleft between the ECD subunits. Because hNPRA and rNPRA sequences mostly differ in their ECD portion and because their affinities for natriuretic peptides are also divergent (Schoenfeld et al., 1995), it was necessary to derive a structural model for the hNPRA ECD and to compare it with that for rNPRA ECD. Such a model is expected to document the interactions between the peptides and the receptor subunits. It might explain the higher affinity of the superagonist BANP relative to ANP. The model could also document the peculiar positioning of the antagonist A71915 within the peptide binding cleft. All residues of the ECD that differ between hNPRA and rNPRA were properly substituted, and the resulting model, bound to ANP 7-27, was energy-minimized (Fig. 6A; Table 3). The peptide was then replaced by a previously documented conformation of the superagonist BANP (Jossart et al., 2005) or by modifying ANP into the antagonist A71915 (Fig. 6, B and C; Table 3). Two outstanding regions of the ligand binding interface of natriuretic peptide receptors involve hydrophobic regions (He et al., 2006). Hydrophobic pocket 1 of chain A binds Phe⁸ of ANP or BANP, and Cha⁸ of A71915, and the residues involved are highly conserved (Fig. 6; Table 3).

Hydrophobic pocket 2 of chain B binds Gln¹⁸ of ANP or Leu¹⁸ of BANP, whereas the non-natural residue D-Tic¹⁶ of A71915 interacts with the margin of pocket 2. BANP contains an excess of positive charges provided by the amino terminal and six arginines. Correspondingly, a number of acidic residues are located on the surface of the peptide binding cleft. Both the amino-terminal and Arg³ of BANP interact with Asp¹⁷⁷ of chain A. Arg⁴ is located close to Asp¹⁹² of subunit B,

Arg¹¹ is in contact with Glu¹⁸⁷ of chain B, Arg¹⁴ is close to Asp⁶² of chain B, whereas Arg²⁷ is interacting with Glu¹⁸⁷ of subunit A (Table 3). The carboxyl-terminal residue Tyr²⁸ of BANP is located in the vicinity of Met¹⁷³, and it is facing the opposite edge of the binding cleft (Fig. 6B). This contrasts with the positioning of the carboxyl-terminal residues of the truncated ANP 7-27, which binds over and occupies the position of the amino-terminal portion of full-length natriuretic peptide (Fig. 6A; Table 3). This suggests that the expected conformation of the exocyclic portions of native ANP 1-28, which includes both amino- and carboxyl-terminal segments, is more accurately represented by the complex obtained with BANP (Fig. 6B). This is in agreement with previous observations on the contribution of both the amino- and the carboxyl-terminal to the potency of ANP on human NPRA (Schoenfeld et al., 1995). Several residues of the cyclic portion of BANP (Arg¹¹, Leu¹², Ile¹⁵, Ser¹⁷) interact with different residues of the receptor than those for ANP 7-27 (Table 3). This might contribute to the higher affinity and potency of BANP relative to ANP, because the ring portion of the natriuretic peptides is central to their tight interaction with NPRA.

Docking of the antagonist A71915 indicates that, despite the fact that this antagonist is approximately half the size of full-length agonists such as ANP or BANP, a single molecule of the ligand could fit in the binding cleft (Fig. 6C). It is noteworthy that the interactions of the crucial residues FGGRFRI of the ring portion seem to be conserved for A71915. However, residue D-Tic16 seems to constraint binding of the peptide and to result in a suboptimal fitting with hydrophobic pocket 2. This might possibly explain the antagonistic character of A71915. It is also likely associated with the closer dimer conformation documented by FRET autoquenching (Fig. 5; Table 2).

Discussion

We have shown that natriuretic peptide binding to NPRA does not conform to the cytokine receptor model exemplified by GHR. In contrast to cytokines, which present a well defined secondary structure both in the free and the receptor-bound states, natriuretic peptide conformation is disordered in solution (Carpenter et al., 1997). When binding to NPRA, the peptides must acquire a flat penny-like conformation by selection or induction. Perhaps because of their stable conformation in solution, cytokines first bind with nanomolar affinity to one receptor subunit. Interaction with the second receptor subunit then stabilizes the high-affinity dimer, resulting in a slower dissociation rate. However, at higher concentration, two molecules of cytokines can bind their homodimeric receptor, resulting in its monomerization and in loss of activation. Again in contrast with cytokines, natriuretic peptides seem to bind only to a preformed dimeric state of NPRA. This is documented by the flat high-dose asymptote of the homoquenching dose-response curve, which occurs for all peptides (Fig. 3), contrasting with GHR (Cunningham et al., 1991).

Slower and apparently more complex association kinetics of ANP to soluble ECD^{WT} than to covalently dimeric ECD^{C423S} indicates that spontaneous dimerization constitutes the rate-limiting step of the ligand binding process (Fig. 7). In contrast with the conclusions of a previous report (Misono et al., 1999), it is proposed that ECD^{WT} dimers are present in solution at submicromolar concentration. However, the fast monomerization constant (k_{mon}) would preclude the documentation of spontaneous dimers in assay systems involving phase separation such as size exclusion chromatography. The use of a homogeneous assay involving FRET homoquenching provided the first evidence for spontaneous dimer formation at nanomolar concentration of ECD (Fig. 4). Further documentation of the kinetic properties of the dimerization and the ligand binding steps will be required to completely characterize this proposed mechanism (Fig. 7). Binding of natriuretic peptides to NPRA-ECD is quite stable (Fig. 1; Table 1). The affinity of ANP for the covalently dimeric soluble ECDC423S closely mimics that observed with full-length cellular NPRA. This agrees with previous results obtained with rNPRA-ECD

(Labrecque et al., 1999), and with previous observations that full-length NPRA is spontaneously homodimeric.

The correlation of the rank order of potency for natriuretic peptides in ligand binding (Fig. 3) and ECD dimerization assays (Fig. 4; Table 2) again confirms that all natriuretic peptides bind to the dimeric state of the ECD. The lower potency of the antagonist A71915 could be interpreted as being due to its smaller size (13 versus 28 residues for ANP). However, the agonist mini-ANP (15 residues) still conserves high affinity, albeit reduced relative to that for full-length ANP. Thus, the lower affinity of A71915 might be due to its altered conformation. For erythropoietin receptor, both agonists and antagonists also bind to the dimeric form of the receptor (Syed et al., 1998). However, the conformation of the receptor dimer differs between various ligands. Our results on distinct maxima of fluorescence autoquenching (Fig. 5; Table 2) also show that the conformation of the ligand-bound NPRA-ECD dimer differs among peptides. The antagonist A71915 mostly differs from the results for ANP (Table 2). This would be compatible with a shorter distance between the fluorophores located in the carboxyl-terminal region of the ECD. This might be associated with an axial or a lateral rotation of the ECD subunits, leading to an inactive conformation of the receptor. The constrained interaction of residue D-Tic16 of A71915 with hydrophobic pocket 2 of the ECD is potentially associated with the antagonistic properties. Indeed, substitution in A71915 of D-Tic16 with the natural residue L-Phe16 leads to the full agonist A68828 (von Geldern et al., 1992).

The conformational change occurring during activation of NPRA is still unknown. Agonist binding to the homodimeric ECD seems to alter the positioning of the receptor subunits, possibly according to a rotation mechanism (Ogawa et al., 2004). This was predictable based upon previous results using cysteine substitution of the extracellular juxtamembrane domain. Mutation C423S of NPRA, leading to an unpaired Cys⁴³², results in spontaneous disulfide bridge formation, indicating that the juxtamembrane regions of the ECD subunits should be juxtaposed (Labrecque et al., 1999). However, mutation D435C, producing an unpaired Cys⁴³⁵ three residues distal to Cys⁴³², leads to a disulfide bridge only upon NPRA activation by ANP (Labrecque et al., 2001). These results are compatible with a conformational change of the juxtamembrane domain that was also documented in the present work by FRET autoquenching. Whether this change is due to an axial rotation or to a lateral

movement of the subunits is not yet clear. For cytokine receptors, one prevalently proposed activation mechanism involves subunit rotation within a receptor dimer (Brown et al., 2005). The structure of the juxtamembrane region of NPRA-ECD is not well documented in the reported crystallographic studies of soluble ECD. The proper conformation of this region is probably dependent on its natural proximity to the plasma membrane, and it should ultimately be studied in the presence of a phospholipid bilayer. Further studies will be required for documenting this activation conformational change of NPRA. The homogenous FRET assay described in this study provides a new experimental approach for detailing the kinetic steps involved in natriuretic peptide receptor binding and activation. Its high sensitivity and accuracy could also prove valuable in the study of agonist- and antagonist-specific conformations of the receptor.

Acknowledgments

We thank Claude Lazure (Clinical Research Institute of Montreal) for microsequencing the purified hNPRA-ECD.

This work was supported by grants from Canadian Institutes of Health Research and Groupe d'Étude des Protéines Membranaires of Fonds de Recherche en Santé du Québec.

References

- Bodart V, Rainey WE, Fournier A, Ong H, and De Léan A (1996) The H295R human adrenocortical cell line contains functional atrial natriuretic peptide receptors that inhibit aldosterone biosynthesis. *Mol Cell Endocrinol* **118**:137–144.
- Brown RJ, Adams JJ, Pelekanos RA, Wan Y, McKinstry WJ, Palethorpe K, Seeber RM, Monks TA, Eidne KA, Parker MW, et al. (2005) Model for growth hormone receptor activation based on subunit rotation within a receptor dimer. *Nat Struct Mol Biol* **12**:814–821.
- Carpenter KA, Wilkes BC, De Léan A, Fournier A, and Schiller PW (1997) Hydrophobic forces are responsible for the folding of a highly potent natriuretic peptide analogue at a membrane mimetic surface: an NMR study. *Biopolymers* **42**:37–48.
- Cunningham BC, Ultsch M, de Vos AM, Mulkerrin MG, Clauser KR, and Wells JA (1991) Dimerization of the extracellular domain of the human growth hormone receptor by a single hormone molecule. *Science* **254**:821–825.
- Cunningham BC and Wells JA (1993) Comparison of a structural and a functional epitope. *J Mol Biol* **234**:554–563.
- De Léan A, Munson PJ, and Rodbard D (1978) Simultaneous analysis of families of sigmoidal curves: application to bioassay, radioligand assay, and physiological dose-response curves. *Am J Physiol* **235**:E97–E102.
- De Léan A, Hancock AA, and Lefkowitz RJ (1982) Validation and statistical analysis of a computer modeling method for quantitative analysis of radioligand binding data for mixtures of pharmacological receptor subtypes. *Mol Pharmacol* **21**:5–16.
- de Vos AM, Ultsch M, and Kossiakoff AA (1992) Human growth hormone and extracellular domain of its receptor: crystal structure of the complex. *Science* **255**:306–312.
- Duda T, Venkataraman V, Ravichandran S, and Sharma RK (2005) ATP-regulated module (ARM) of the atrial natriuretic factor receptor guanylate cyclase. *Peptides* **26**:969–984.

- Fuh G, Cunningham BC, Fukunaga R, Nagata S, Goeddel DV, and Wells JA (1992) Rational design of potent antagonists to the human growth hormone receptor. *Science* **256**:1677–1680.
- Gardner DG, Chen S, Glenn DJ, and Grigby CL (2007) Molecular biology of the natriuretic peptide system: implication for physiology and hypertension. *Hypertension* **49**:419–426.
- He XI, Chow Dc, Martick MM, and Garcia KC (2001) Allosteric activation of a spring-loaded natriuretic peptide receptor dimer by hormone. *Science* **293**:1657–1662.
- He XL, Dukkipati A, and Garcia KC (2006) Structural determinants of natriuretic peptide receptor specificity and degeneracy. *J Mol Biol* **361**:698–714.
- Jewett JRS, Koller KJ, Goeddel DV, and Lowe DG (1993) Hormonal induction of low affinity receptor guanylyl cyclase. *EMBO J* **12**:769–777.
- Kuhn M (2004) Molecular physiology of natriuretic peptide signalling. *Basic Res Cardiol* **99**:76–82.
- Jossart C, Coupal M, McNicoll N, Fournier A, Wilkes BC, and De Léan A (2005) Photolabeling study of the ligand binding domain of natriuretic peptide receptor A: development of a model. *Biochemistry* **44**:2397–2408.
- Joubert S, Jossart C, McNicoll N, and De Léan A (2005) Atrial natriuretic peptide-dependent photolabeling of a regulatory ATP-binding site on the natriuretic peptide receptor-A. *FEBS J* **272**:5572–5583.
- Joubert S, Labrecque J, and De Léan A (2001) Reduced activity of the NPR-A kinase triggers dephosphorylation and homologous desensitization of the receptor. *Biochemistry* **40**:11096–11105.
- Joubert S, McNicoll N, and De Léan A (2007) Biochemical and pharmacological characterization of P-site inhibitors on homodimeric guanylyl cyclase domain from natriuretic peptide receptor-A. *Biochem Pharmacol* **73**:954–963.
- Labrecque J, McNicoll N, Marquis M, and De Léan A (1999) A disulfide-bridged mutant of natriuretic peptide receptor-A displays constitutive activity. Role of receptor dimerization in signal transduction. *J Biol Chem* **274**:9752–9759.
- Labrecque J, Deschenes J, McNicoll N, and De Léan A (2001) Agonistic induction of a covalent dimer in a mutant of natriuretic peptide receptor-A

documents a juxtamembrane interaction that accompanies receptor activation. *J Biol Chem* **276**:8064–8072.

- Lamken P, Lata S, Gavutis M, and Piehler J (2004) Ligand-induced assembling of the type I interferon receptor on supported lipid bilayers. *J Mol Biol* **341**:303–318.
- Larose L, McNicoll N, Ong H, and De Léan A (1991) Allosteric modulation by ATP of the bovine adrenal natriuretic factor R1 receptor functions. *Biochemistry* **30**:8990–8995.
- Lee CY and Burnett JC Jr (2007) Natriuretic peptides and therapeutic applications. *Heart Fail Rev* **12**:131–142.
- Li B, Tom JY, Oare D, Yen R, Fairbrother WJ, Wells JA, and Cunningham BC (1995) Minimization of a polypeptide hormone. *Science* **270**:1657–1659.
- Mimeault M, Fournier A, Fe' thie`re J, De Léan A (1993) Development of natriuretic peptide analogs selective for the atrial natriuretic factor-R1A receptor subtype. *Mol Pharmacol* **43**:775–782.
- Misono KS, Sivasubramanian N, Berkner K, and Zhang X (1999) Expression and purification of the extracellular ligand-binding domain of the atrial natriuretic peptide (ANP) receptor: monovalent binding with ANP induces 2:2 complexes. *Biochemistry* **38**:516–523.
- Ogawa H, Qiu Y, Ogata CM, and Misono KS (2004) Crystal structure of hormonebound atrial natriuretic peptide receptor extracellular domain. *J Biol Chem* **279**:28625–28631.
- Padayatti PS, Pattanaik P, Ma X, and van den Akker F (2004) Structural insights into the regulation and the activation mechanism of mammalian guanylyl cyclases. *Pharmacol Ther* **104**:83–99.
- Potter LR, Abbey-Hosch S, and Dickey DM (2006) Natriuretic peptides, their receptors, and cyclic guanosine monophosphate-dependent signaling functions. *Endocr Rev* **27**:47–72.
- Rodbard D (1973) Mathematics of hormone-receptor interaction. I. Basic principles. *Adv Exp Med Biol* **36**:289–326.

- Rondeau JJ, McNicoll N, Gagnon J, Bouchard N, Ong H, and De Léan A (1995) Stoichiometry of the atrial natriuretic factor-R1 receptor complex in the bovine zona glomerulosa. *Biochemistry* **34**:2130–2136.
- Rubattu S, Bigatti G, Evangelista A, Lanzani C, Stanzione R, Zagato L, Manunta P, Marchitti S, Venturelli V, Bianchi G, et al. (2006) Association of atrial natriuretic peptide and type A natriuretic peptide receptor gene polymorphisms with left ventricular mass in human essential hypertension. *J Am Coll Cardiol* **48**:499–505.
- Schlosshauer M and Baker D (2004) Realistic protein–protein association rates from a simple diffusional model neglecting long-range interactions, free energy barriers, and landscape ruggedness. *Protein Sci* **13**:1660–1669.
- Schoenfeld JR, Sehl P, Quan C, Burnier JP, and Lowe DG (1995) Agonist selectivity for three species of natriuretic peptide receptor-A. *Mol Pharmacol* **47**:172–180.
- Strain WD (2004) The use of recombinant human B-type natriuretic peptide (nesiritide) in the management of acute decompensated heart failure. *Int J Clin Pract* **58**:1081–1087.
- Syed RS, Reid SW, Li C, Cheetham JC, Aoki KH, Liu B, Zhan H, Osslund TD, Chirino AJ, Zhang J, et al. (1998) Efficiency of signalling through cytokine receptors depends critically on receptor orientation. *Nature* **395**:511–516.
- Tricerri MA, Behling Agree K, Sanchez SA, Bronski J, and Jonas A (2001) Arrangement of apolipoprotein A-I in reconstituted high-density lipoprotein disks: an alternative model based on fluorescence resonance energy transfer experiments. *Biochemistry* **40**:5065–5074.
- von Geldern TW, Budzik GP, Dillon TP, Holleman WH, Holst MA, Kiso Y, Novosad EI, Opgenorth TJ, Rockway TW, Thomas AM, et al. (1990) Atrial natriuretic peptide antagonists: biological evaluation and structural correlations. *Mol Pharmacol* **38**:771–778.
- von Geldern TW, Rockway TW, Davidsen SK, Budzik GP, Bush EN, Chu-Moyer MY, Devine EM Jr, Holleman WH, Johnson MC, Lucas SD, et al. (1992) Small atrial natriuretic peptide analogues: design, synthesis, and structural requirements for guanylate cyclase activation. *J Med Chem* **35**:808–816.

Table 6.1: Kinetic parameters of [¹²⁵I]ANP binding to hNPRA-ECD

Kinetic assays were performed as mentioned under Materials and Methods and Fig. 2 legend. Radioligand binding association and dissociation kinetics data were analyzed using models described in Materials and Methods. Values are mean \pm S.E. of three to four separate experiments (indicated in parenthesis), with each measurement done in duplicate.

	hNPRA-ECD ^{WT}	hNPRA-ECD ^{C423S}
k_{on} (M⁻¹s⁻¹)	4.04\pm0.50x10⁵ (3)	6.57\pm0.15x10⁶ (3)^a
k_{off} (s⁻¹)	7.55\pm1.17x10⁻⁵ (3)	8.45\pm0.42x10⁻⁵ (3)
k_{off}/k_{on} (M)	1.90\pm0.32x10⁻¹⁰ (3)	1.29\pm0.04x10⁻¹¹ (3)^a
K_d (M)	7.92\pm0.79x10⁻¹⁰ (4)	1.31\pm0.14x10⁻¹⁰ (4)^a

^a p<0.01

Table 6.2: IC₅₀ for competition curves and FRET homotransfer

IC₅₀ were determined by competition binding and FRET homotransfer, as described under Materials and Methods and Fig. 3 and Fig.5 legends. F and F₀ are the net fluorescence of the hNPRA-ECD-AF-488 homodimer in the presence of the highest concentration of peptide or in its absence, respectively. Values are mean ± S.E. of three to four separate experiments (indicated in parenthesis), with each measurement done in duplicate or quadruplicate, for binding and quenching respectively. There was a high correlation (r=0.99, p<0.002) between the log of IC₅₀ from binding assays and those from fluorescence quenching studies

Peptides	Radioligand binding		Fluorescence quenching	
	IC ₅₀ (M)	IC ₅₀ (M)	IC ₅₀ (M)	F/F ₀ (Maximum)
BANP	2.72 ± 0.13 x 10 ⁻¹⁰ (3)	4.27 ± 0.52 x 10 ⁻¹⁰ (3)	4.27 ± 0.52 x 10 ⁻¹⁰ (3)	0.77 ± 0.03 (3)
rANP 1-28	1.77 ± 0.18 x 10 ⁻⁹ (4)	3.10 ± 0.72 x 10 ⁻⁹ (4)	3.10 ± 0.72 x 10 ⁻⁹ (4)	0.80 ± 0.03 (4)
mini-ANP	1.52 ± 0.11 x 10 ⁻⁸ (3)	2.18 ± 0.32 x 10 ⁻⁸ (3)	2.18 ± 0.32 x 10 ⁻⁸ (3)	0.75 ± 0.01 (3) ^a
pBNP32	1.64 ± 0.10 x 10 ⁻⁸ (3)	7.70 ± 0.39 x 10 ⁻⁹ (3)	7.70 ± 0.39 x 10 ⁻⁹ (3)	0.66 ± 0.01 (3) ^b
A-71915	1.04 ± 0.14 x 10 ⁻⁶ (3)	6.10 ± 0.99 x 10 ⁻⁷ (3)	6.10 ± 0.99 x 10 ⁻⁷ (3)	0.60 ± 0.02 (3) ^b
C-ANF	> 10 ⁻⁵ (3)	> 10 ⁻⁵ (3)	> 10 ⁻⁵ (3)	ND
CNP-22	> 10 ⁻⁵ (3)	> 10 ⁻⁵ (3)	> 10 ⁻⁵ (3)	ND

^a p<0.05 versus rANP

^b p<0.01 versus rANP

Table 6.3: Residues interactions in the peptide-bound hNPRA-ECD complexes

Interactions analysis was performed using the software SYBYL, as described under Materials and Methods. Residues in each subunit of the ECD homodimer are specified as belonging to subunit A or B.

rANP7-27	Sites	BANP	Sites	A71915	Sites
		S1	D177a		
		L2			
		R3	L112a,M173a,D177a		
		R4	D192b		
		S5			
		S6	F172a,R176a	R6	F172a
C7		C7	H185a	C7	H185a
F8	Y154a,F165a,V168a, E169a,F172a,M173a, H185a	F8	Y154a,F165a,V168a, E169a,F172a,M173a	Cha8	Y154a,F165a,V168a, E169a,F172a,H185a
G9	M173a	G9	M173a	G9	M173a
G10	L112a,E169a,M173a	R10	M173a	G10	M173a
R11	L112a,G113a,V116a, E169a,M173a	R11	Y156b,E187b	R11	E187b,Y156b,E162b
I12		L12	Y88b	I12	F165a
D13	V87a,A91a,G113a, Y120a	D13	A91a,R95a,G113a, Y120a	D13	G113a,Y120a
R14	R95a,E119a,D62b, Y88b,Y120a	R14	A91a,R95a,D62b, Y88b	R14	D62b,R95a
I15	D62b,Y88b,A91b, P92a,P92b,R95a, R95b	I15	Y88a,F165a,F166a	I15	Y88b
G16	Y88a	G16	Y88a	D-tic16	V87b,Y88b, A111b, F165b,F166b,E169b
A17		S17	D62a,R95b,E119b, Y120b	R17	Y156a,P158a,E162a, F165b
Q18	A91b,G113b,F114b, F166b	L18	A111b,G113b,F114b, F116b,Y120b	C18-NH₂	F165b
S19	Y156a	S19			
G20	F165b,E169b	G20	L112b,F165b,E169b,		

			M173b
L21	F172b,M173b	L21	M173b
G22	H185b	G22	F165b
C23	H185b	C23	
N24	H185b,L186b,E187b	N24	Y154b,E187b
S25	L186b,E187b	S25	H185b
F26	H195b,R198b	F26	H185b,L186a,E187a
R27	M173a,H195b	R27	Y154a,E187a
		Y28	F172b,M173b,R174b, V175b,176b,D177b, V183b,H185b

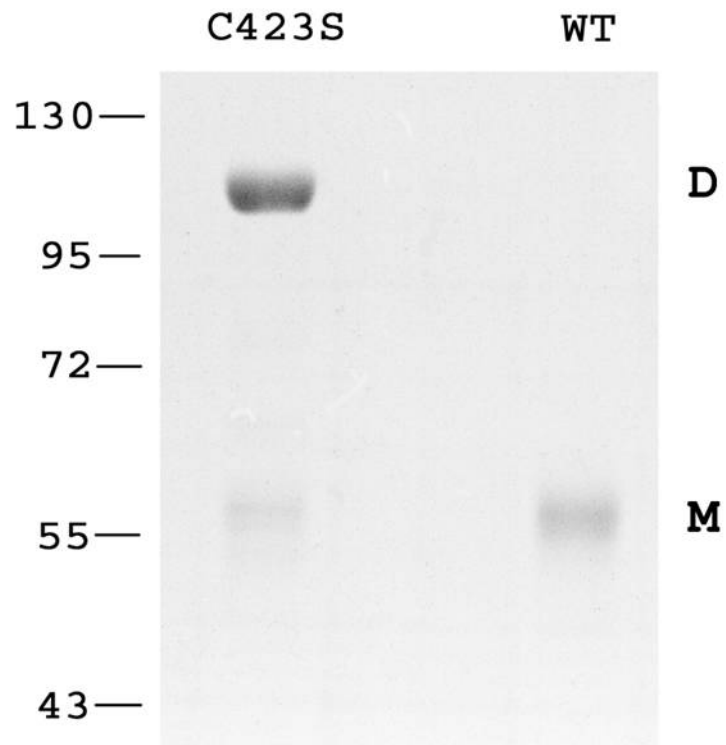


Figure 6.1: Coomassie staining of purified hNPRA-ECD WT and C423S.

Purified hNPRA-ECD (WT and C423S) were subjected to SDS PAGE on 7.5% polyacrylamide gel under non-reducing conditions and stained with Coomassie Blue, as described under *Materials and Methods*. The positions of monomers (M) and disulfide-linked dimers (D) are indicated.

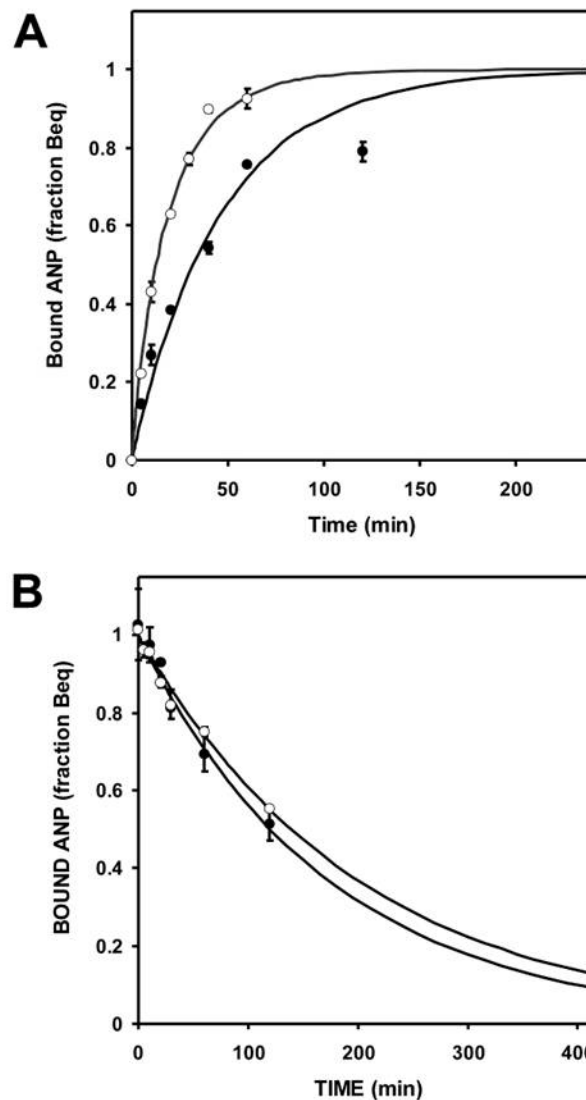


Figure 6.2: Association (A) and dissociation (B) kinetics for ANP.

Association was initiated by addition of ^{125}I -ANP (0.33 nM and 65 pM, respectively) to purified hNPRA-ECD^{WT} (0.66 nM monomer; closed circles) or hNPRAECD^{C423S} (0.195 nM dimer; open circles). Dissociation was initiated by adding an excess of unlabeled rANP (1 μM). The amount of specific binding was assessed at different times of incubation at 22°C as described under *Materials and Methods*. ANP binding is expressed as a fraction of equilibrium binding. Each data point represents the mean \pm S.E. of duplicate determinations. The results are representative of at least three identical experiments. Association and dissociation kinetics curves were fitted using models described under *Materials and Methods*. Kinetic parameters are shown in Table 1.

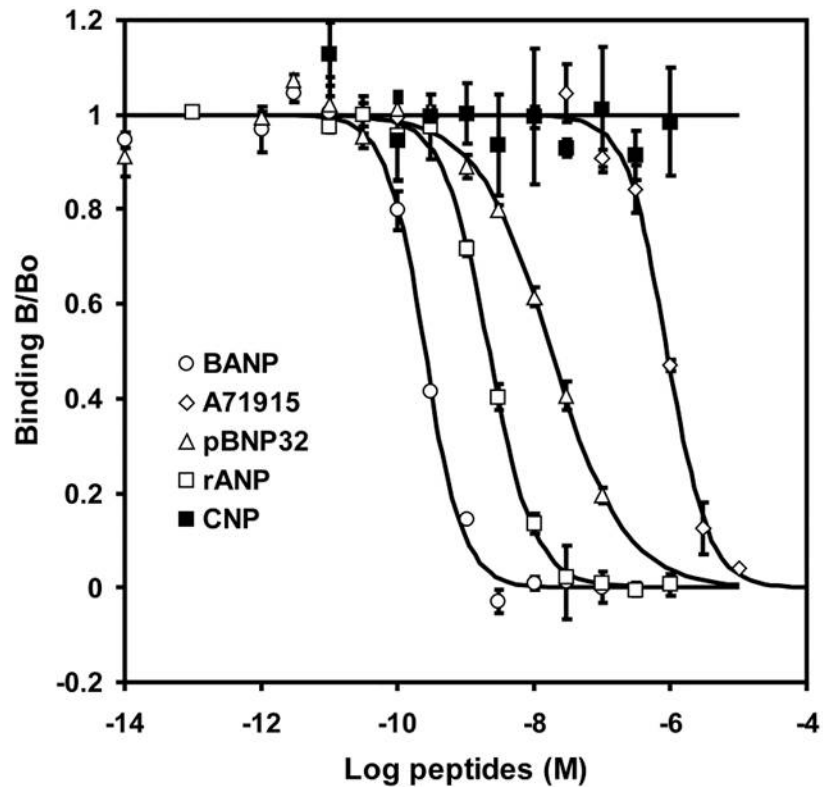


Figure 6.3: Competition curves for peptides.

Purified hNPRA-ECD^{WT} (0.66 nM monomer) was incubated with ¹²⁵I-ANP (0.33 nM) and varying concentrations of indicated competing unlabeled peptides for 22h at 22°C, as described under *Materials and Methods*. ANP binding is expressed as a fraction of initial binding B_0 in absence of competing peptides. Each data point represents the mean \pm S.E. of duplicate determinations. The results are representative of at least three identical experiments. The curves were analyzed by nonlinear least-squares regression as described previously (De Léan et al., 1982). IC₅₀ values for these peptides are shown in Table 2.

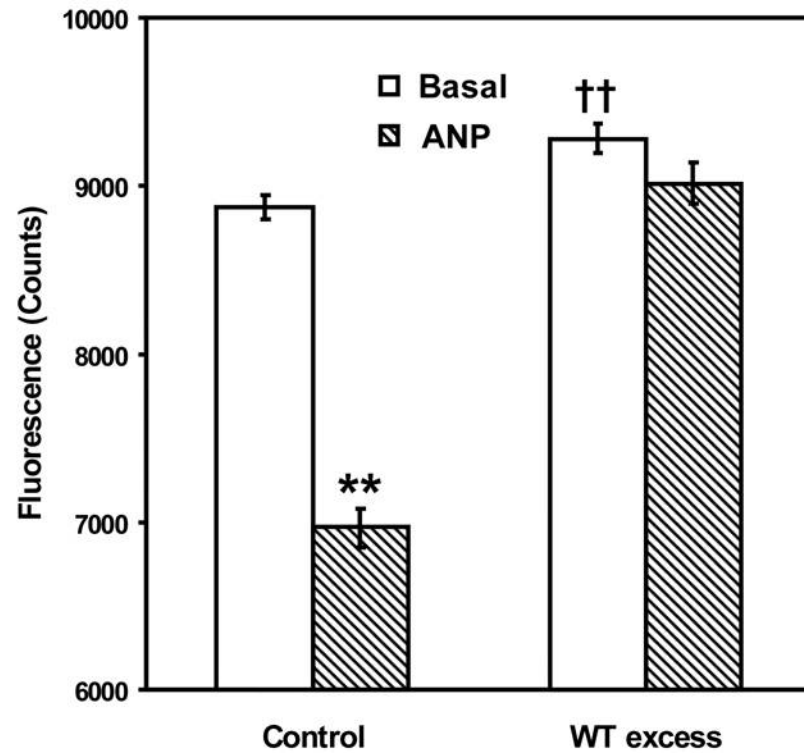


Figure 6.4: Inhibition of ANP-induced homo-FRET by addition of excess WT. hNPRA-ECD-AF488 (1.66 nM monomer) was incubated with or without ANP (1 μ M), in presence or in absence of an excess of hNPRA-ECD^{WT} (2.26 nM monomer). The fluorescence was measured after 1 h of incubation at 22°C as described under *Materials and Methods*. Values represent averages from three separate experiments, each assayed in quadruplicate. **, $p < 0.01$, significantly different from all other groups. ††, $p < 0.01$, significantly different from control.

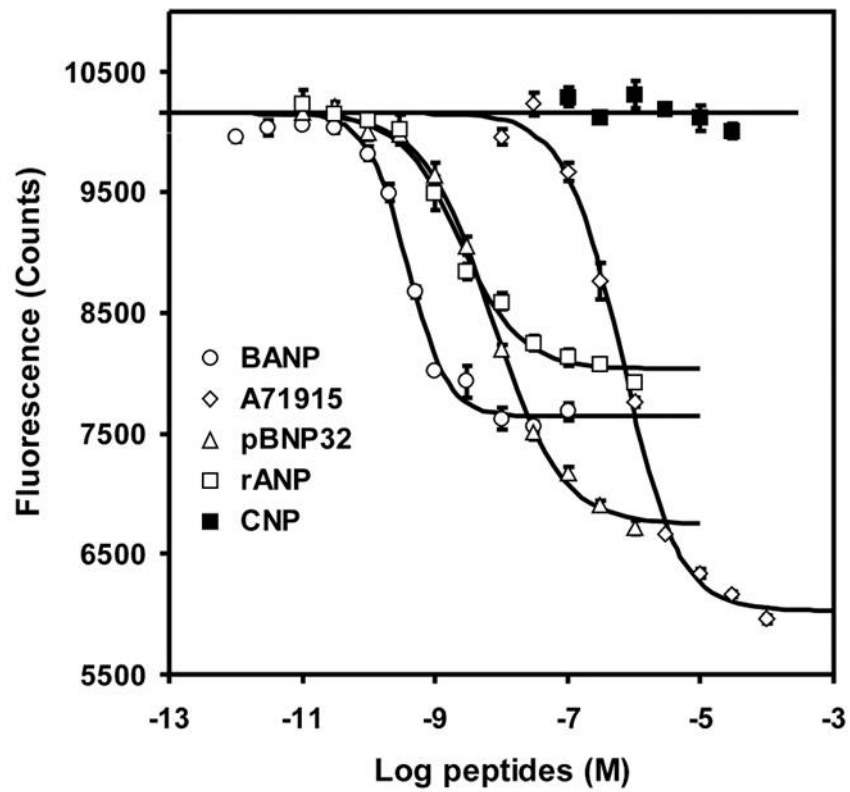


Figure 6.5: Dose-response curves of peptides on FRET homotransfer.

Increasing concentrations of indicated peptides were added to hNPRA-ECDAF488 (1.66 nM monomer), and fluorescence was measured after 1 h of incubation at 22°C, as described under *Materials and Methods*. Fluorescence is expressed as mean \pm S.E. of four determinations. The results are representative of at least three identical experiments. IC₅₀ and F/F₀ values for these peptides are shown in Table 2.

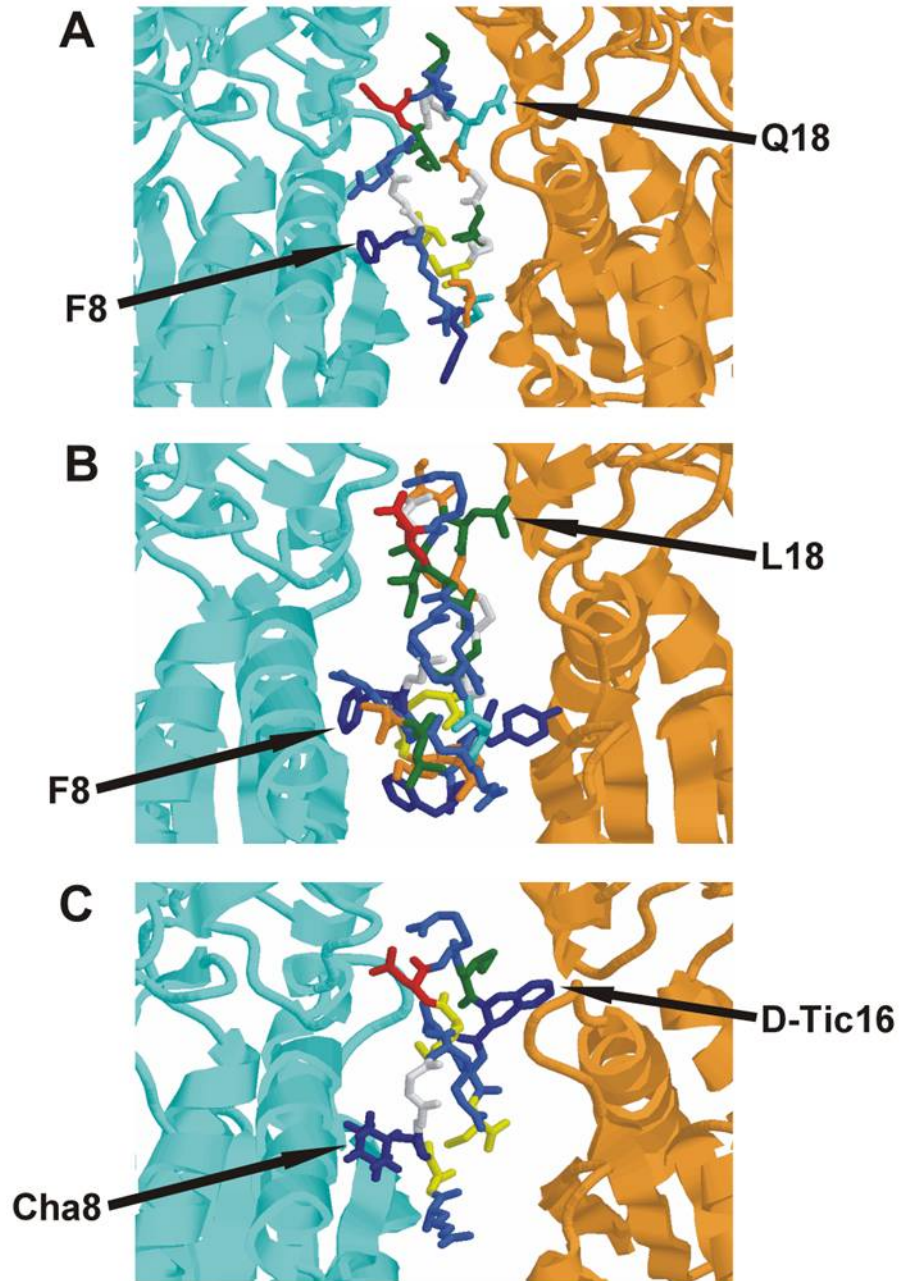


Figure 6.6: Model for binding of ANP (A), BANP (B), and A71915 (C) to hNPRA-ECD dimer.

Modeling of hNPRA-ECD in complex with peptides was carried out as described under *Materials and Methods* using SYBYL software. hNPRA-ECD homodimer subunits are shown in ribbon model. Peptides are shown in sticks model. Residues of peptides interacting with hydrophobic pocket 1 (subunit A) and 2 (subunit B) of ECD dimer are indicated.

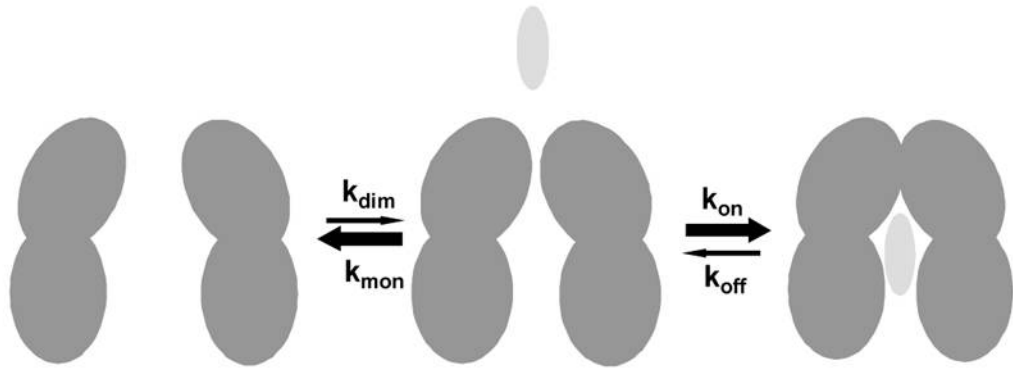


Figure 6.7: Schematic model for ANP binding to hNPRA-ECD homodimer.

The subunits of the soluble extracellular domain are represented as two connected lobes (dark gray), with the membrane distal lobes interfacing each other when in the peptide-bound state. The plasma membrane (not shown) is assumed to be located below the ECD. The peptide ligand is presented as a small ellipse (light gray). The fast rates for the monomerization of the ECD (k_{mon}) and the association (k_{on}) of the ligand to the preformed ECD dimer are represented as thick arrows. The slow rates for ECD dimer formation (k_{dim}) and peptide dissociation (k_{off}) are shown as thin arrows.

CHAPITRE 7: Role of Juxtamembrane and Transmembrane Domains in the Mechanism of Natriuretic Peptide Receptor A Activation

Marie Parat, Jonathan Blanchet and André De Léan

Accepté pour publication dans Biochemistry le 9 mars 2010.

Département de Pharmacologie, Faculté de Médecine, Université de Montréal,
Montréal, Quebec, Canada, H3T 1J4

Abbreviations

A71915, (Arg6, β -cyclohexyl-Ala8, D-Tic16, Arg17, Cys18)-rANP-(6-18)-amide; **ANP**, atrial natriuretic peptide; **rANP**, rat ANP; **BNP**, brain natriuretic peptide; **CD-NP**, contains the full-length 22-amino acid human C-type natriuretic peptide (CNP) fused to the 15-amino acid carboxylterminal tail of Dendroaspis natriuretic peptide; **CU-NP**, consists of the ring structure and the disulfide bond of CNP in combination with the N-terminus and the C-terminus of urodilatin; **ECD**, extracellular domain; **EGFR**, epidermal growth factor receptor; **EpoR**, erythropoietin receptor; **ErbB2**, epidermal growth factor receptor 2; **FRET**, fluorescence resonance energy transfer; **GHR**, growth hormone receptor; **GC**, guanylyl cyclase domain; **GpA**, Glycophorin A; **IBMX**, 3-isobutyl-1-methylxanthine, **ICD**, intracellular domain; Δ **ICD**, NPRA lacking its ICD; **IGF-1R**, insulin growth factor-1 receptor; **IPTG**, isopropyl- β -thiogalactoside; **JM**, juxtamembrane domain; **KHD**, kinase homology domain; **NMR**, nuclear magnetic resonance; **NPRA**, natriuretic peptide receptor A; **rNPRA**, rat NPRA; **PAGE**, polyacrylamide gel electrophoresis; **TM**, transmembrane domain; **WT**, wild type.

Abstract

Natriuretic peptide receptor A (NPRA) is a noncovalent homodimeric receptor, composed of an extracellular domain (ECD) with a ligand-binding site, a single transmembrane domain (TM), and an intracellular domain (ICD) exhibiting guanylyl cyclase activity. NPRA activation by atrial natriuretic peptide (ANP) leads to cGMP production, which plays important roles in cardiovascular homeostasis. Initial studies have shown that activation of NPRA involves a conformational change in the juxtamembrane domain (JM). However, crystallographic study of the soluble ECD of NPRA has failed to document JM structure, and the conformational change involved in transmembrane signal transduction is still unknown. To analyze this conformational change, we first sequentially substituted nine amino acids of the JM with a cysteine residue. By studying the mutant's capacity to form ANP-induced or constitutive covalent disulfide dimers, we evaluated the relative proximity of JM residues, before and after NPRA activation. These results obtained with the full-length receptor demonstrate a high proximity of specific JM residues and are in disagreement with crystallography data. We also tested the hypothesis that signal transduction involves a TM rotation mechanism leading to ICD activation. By introducing one to five alanine residues into the TM α -helix, we show that a TM rotation of 40° leads to constitutive NPRA activation. We finally studied the role of the TM in NPRA dimerization. By using the ToxR system, we demonstrate that the last JM residues are required to stabilize the TM dimer. Using these experimental data, we generated a new molecular model illustrating the active conformation of NPRA, where the JM and TM are depicted.

Introduction

Natriuretic peptides play a key role in cardiovascular homeostasis. Atrial natriuretic peptide (ANP) and brain natriuretic peptide (BNP) are released by the heart in response to cardiac overload. Their physiologic effects include diuresis and natriuresis, inhibition of the renin-angiotensin-aldosterone system and vasorelaxation, leading to a global decrease in blood pressure (1). They also have a local protective role by preventing cardiac fibrosis and hypertrophy (2). Their physiologic role was exemplified in knockout mice with abrogated or reduced expression of ANP and BNP or their receptor NPRA which displayed hypertension, cardiac hypertrophy, and ventricular fibrosis (3). Cardioprotective properties of natriuretic peptides are used in therapeutic strategies. Indeed, Anaritide and Nesiritide, ANP and BNP analogues respectively, are currently used in the treatment of myocardial infarction (4, 5). Currently, natriuretic peptide chimeras, like CD-NP and CU-NP, are being investigated to improve therapeutic efficacy and minimize undesirable effects in the treatment of acute decompensated heart failure (6, 7).

Cellular effects of ANP are mediated through the transmembrane natriuretic peptide receptor A (NPRA). NPRA displays a typical particulate guanylyl cyclase structure with four structural domains: an extracellular domain (ECD) with a ligand binding site, a single transmembrane domain (TM), a kinase-like homology domain (KHD), and a guanylyl cyclase domain (GC), responsible for cGMP production (8). ECD specifically binds ANP in a 2:1 stoichiometric ratio (9), inducing a conformational change transmitted to the cytoplasmic domain through the TM. The KHD allosterically regulates both peptide binding to the ECD and activation of the GC (10, 11). It is thought to maintain the receptor in the basal state, because receptors lacking this domain are constitutively active (12). The KHD responds to ANP binding by adopting a conformation that allows direct ATP binding, resulting in the release of the guanylyl cyclase activity repression (13). The KHD is also normally phosphorylated, and its dephosphorylation coincides with desensitization of NPRA to ANP activation (1, 14). The GC domain presents two functional and allosterically regulated catalytic sites whose structure is jointly contributed by both subunits (15).

The juxtamembrane region (JM) connecting the bilobed ECD to the TM seems to play a crucial role in the transmembrane signal transduction mechanism.

Indeed, it has been reported that ANP activation increases the protease sensitivity of the juxtamembrane region (16). Mutation C423S, which disrupts a short intrachain juxtamembrane disulfide-bridged loop, leads to both constitutive activation and receptor covalent dimerization through the exposed and unpaired C432 (17). This activation was later attributed to the conformational change induced by the loop disruption more than to the covalent dimerization process, because a C423S/C432S double mutation was shown also to be constitutively active but not covalently dimeric (16). However, the occurrence of a constitutive disulfide bridge still indicated the proximity of the juxtamembrane regions in the NPRA dimer. Moreover, mutation D435C, exposing a free cysteine three residues downstream of C432, led to an agonist-induced covalent dimer, indicating that a conformational change, either a translation or a rotation of the subunits, is occurring upon activation by ANP (18). Finally, fluorescence resonance energy transfer (FRET) studies with the ECD NPRA derivatized at C423 demonstrated that the ECD was spontaneously dimeric in solution, indicating that dimerization is not sufficient for NPRA activation. These studies also suggested that ANP and the antagonist A71915 both stabilize an ECD dimer form in which the juxtamembrane regions are in the proximity of each other, but in different conformations, supporting the hypothesis that the JM conformation determines the activation state of NPRA (19).

Crystallographic studies of the soluble liganded or unliganded extracellular domain of NPRA have failed to document the juxtamembrane domain structure and to identify the conformational change involved in signal transduction (20). The proper conformation of this region is probably dependent on its anchorage in the plasma membrane. For the single-transmembrane cytokine and tyrosine kinase receptors, one prevalently proposed activation mechanism involves subunit rotation within a receptor dimer (21-24). In the report presented here, we studied the JM conformation in a full-length receptor context, by cysteine scanning. This method allowed us to evaluate the relative proximity of JM residues before and after NPRA activation. We then confirmed the hypothesis that signal transduction involves a TM rotation mechanism, by inserting alanine residues at the end of the TM. Indeed, each alanine insertion mimics a 100° rotation of the NPRA subunits. We also studied the role of the TM in NPRA dimerization using a bacterial ToxR assay for TM dimerization and demonstrated that the last residues of the JM stabilize the TM

dimer. Finally, our data allow us to propose a new molecular model for NPRA's active conformation in which JM and TM regions are taken into account.

Materials and Methods

Construction of NPRA Mutants.

A wild-type rat NPRA clone inserted into pBK-CMV (Stratagene) between sites NheI and KpnI (pBK-NPRA) (25), was used for generating the various mutants. Nucleotide positions are numbered from the NheI insertion site. First, the BamHI site at position 1281 was eliminated by site-directed mutagenesis according to Quikchange strategy (Stratagene). Then, new BamHI and SpeI sites were created at positions 1421 and 1469, respectively, using mutagenic primers. The cysteine mutants were obtained by ligating complementary pairs of oligonucleotides containing a cysteine substitution between the BamHI and SpeI sites. WT and cysteine mutants sequence between NheI and KpnI were then subcloned into the pcDNA5-FRT vector (Invitrogen). For the alanine mutants, a second SpeI site was created by site-directed mutagenesis at position 1547. The alanine mutants were obtained by ligating synthetic DNA linkers containing alanine insertions between the two SpeI sites. Synthetic DNA linkers were obtained by hybridization of five oligonucleotides. The Δ ICD mutants lacking the cytoplasmic domain were obtained by PCR amplification of the cysteine mutants subcloned into the pcDNA5-FRT vector. The amplified fragment included the extracellular and transmembrane domains followed by the GERGSSTRG epitope, a stop codon, and finally a KpnI site. The Δ ICD mutants sequences between EcoRI and KpnI were then subcloned into pBK-rNPRA.

Cell Culture.

Human embryonic kidney cell line 293 (HEK293, American Type Culture Collection) was grown in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) supplemented with 10% fetal bovine serum and 100 units of penicillin/streptomycin in a 5% CO₂ incubator at 37°C. The Flp-In-293 cells (Invitrogen) were grown in DMEM supplemented with 10% fetal bovine serum, 2 mM L-Glutamine, 100 µg/ml Zeocin and 100 units of penicillin/streptomycin in a 5% CO₂ incubator at 37°C.

Stable Expression in Flp-In-293 cells.

Transfection assays were conducted in 100 mm plates (1.2×10^6 cells) using calcium phosphate precipitation. Cells were cotransfected with pcDNA5-FRT vectors containing WT rNPRA or cysteine mutants and pOG44 plasmid (20 μ g of total DNA/plate with a 9:1 (w/w) ratio of pOG44: pcDNA5-FRT plasmids). Clones were selected with 200 μ g/ml hygromycin B in culture medium and tested for zeocin sensitivity according to the manufacturer's recommendations.

Transient Expression in HEK293 Cells.

Transfection assays conducted in 100 mm plates (1.2×10^6 cells) using calcium phosphate precipitation. Cells were transfected with 20 μ g of total DNA/plate of pBK-rNPRA WT or alanine mutants and Δ ICD mutant constructs.

Dimerization Assay.

Dimerization assays were performed in 100 mm plates when cells were at subconfluence. Cells stably expressing cysteine mutants or transiently expressing Δ ICD mutants were washed twice with serum-free DMEM and incubated at 37°C with or without 10^{-8} M rANP (Sigma-Aldrich) or 10^{-5} M A71915 (Bachem) in the same medium containing 0.5% bovine serum albumin. After a 30 min incubation, cells were washed with PBS containing 10 mM NEM to prevent further covalent dimerization, and membranes were prepared according to the technique described below.

Membrane Preparations.

Membranes were prepared according to the method of Labrecque et al. (17). Essentially, cells were harvested after dimerization assay and homogenized with a Polytron homogenizer in ice-cold buffer (10 mM Tris-HCl (pH 7.4), 1 mM EDTA, and protease inhibitors). After centrifugation at 40000g for 30 min, the pellets were washed and finally resuspended in freezing buffer containing 50 mM Tris-HCl (pH 7.4), protease inhibitors, 1 mM $MgCl_2$, and 250 mM sucrose. For the dimerization assay, 10 mM NEM (Sigma) was added to all the buffers to prevent undesirable disulfide bridge formation. Membranes were then frozen in liquid nitrogen and kept

at -80°C until further use. The protein concentration was determined using the BCA protein assay kit (Pierce).

Immunoblot Analysis.

Membrane protein samples (20-80 μg) were solubilized in Laemmli sample buffer without β -mercaptoethanol (nonreducing condition) and heated at 100°C for 5 min. Electrophoresis was performed in a 7.5% polyacrylamide gel for the ΔICD mutants and a 5% polyacrylamide gel for the full-length NPRA mutants. Following electrophoresis, proteins were transferred to a nitrocellulose membrane (Bio-Rad). The receptor was detected using an affinity-purified antibody from a rabbit polyclonal antiserum raised against the C-terminus of rNPR-A (17). Specific signals were probed with horseradish peroxidase-coupled second antibody according to the ECL Plus Western blotting analysis system and analysed with a Typhoon Imager (GE Healthcare Life Sciences).

Whole Cell Guanylyl Cyclase Stimulation.

Cells stably expressing rNPRA WT and cysteine mutants were plated in 24-well cluster plates at a density of 10^5 cells/well and incubated 24 h prior to agonist stimulation. Cells transiently expressing rNPRA WT and alanine mutants were replated 48 h post-transfection. The cells were washed twice with serum-free DMEM and incubated at 37°C in quadruplicate wells with or without 10^{-7} M rANP (Sigma-Aldrich) in the same medium containing 0.5% bovine serum albumin and 0.5 mM 1-methyl-3-isobutylxanthine. After incubation for 1 h (cysteine mutants) or 1.5 h (alanine mutants), the medium was collected, and the level of accumulated extracellular cyclic GMP was determined by a radio-immunoassay (26). Maximal guanylyl cyclase activity was also assessed on the same cells that remained attached to the plate. Cells were solubilized in 25 mM HEPES (pH 7.4), with 50 mM NaCl, 10 mM theophylline, 2 mM IBMX, 10 mM creatine phosphate, 10 units of creatine kinase, 1 mM GTP, 4 mM MnCl_2 and 1% Triton X-100. After incubation for 10 min (cysteine mutants) or 30 min (alanine mutants) under agitation, reactions were stopped by addition of 110 mM zinc acetate followed by 110 mM sodium carbonate as described previously (15). After centrifugation at 12000g for 2 min, supernatants

were radio-immunoassayed for cyclic GMP content. Triton/Mn treatment is known to stimulate maximally the enzymatic domain of particulate guanylyl cyclase in a manner independent of the receptor activation state (27). It was used to normalize cGMP production results for differing levels of mutant protein expression and variation of cell number in each well.

Construction of the ToxR Chimeras.

Synthetic linkers encoding different fragments of the rNPRA TM (TM1 and TM2 – Figure 6A) were inserted between the ToxR transcription activator and the *Escherichia Coli* maltose binding protein (MalE) within the pToxRI GpA13 T87G plasmid (28) previously cut with NheI and BamHI. pToxRI GpA13 and pToxRI GpA13 G83A plasmids, displaying respectively WT or mutated glycoporphin A (GpA) TM between the ToxR and MalE proteins, were used as positive and negative controls, respectively. ToxR system plasmids were kindly provided by D. Langosch (Lehrstuhl für Chemie der Biopolymere, Department für biowissenschaftliche Grundlagen, Technische Universität München, Weihenstephaner Berg 3, Freising, Germany).

In Vivo Detection of TM Homodimerization.

Plasmids containing various ToxR chimera constructs (TM1, TM2, GpA, and GpA G83A) were transformed into *E. coli* FHK12 cells, which contain the β -galactosidase reporter gene. FHK12 cells were grown for 24 h at 37°C at 255 rpm in the presence of 2% maltose, 0.4 mM IPTG, and 30 μ g/mL chloramphenicol. β -Galactosidase activity was quantified in crude cell lysates after incubation at 37°C for 20 min with o-nitrophenyl galactoside as described previously (29). The reaction was stopped with 90 μ L of 1 M Na₂CO₃, and OD₄₀₅ was measured using a microtiter plate reader. β -Galactosidase activity was measured in Miller units [1000 (OD₄₀₅/min)/OD₆₀₀].

ToxR Chimera Protein Expression Levels.

Western blot analyses were performed with the FHK12 cells expressing the various ToxR chimera constructs used in the β -galactosidase activity assay. Aliquots

of cells were mixed with sample buffer and boiled for 5 min. The samples were separated via 10 % SDS-polyacrylamide gel and then transferred to a nitrocellulose membrane (Bio-Rad). Detection of ToxR chimera constructs was achieved using a monoclonal anti-maltose-binding protein antibody (Sigma-Aldrich). Specific signals were probed with a horseradish peroxidase-coupled anti-mouse polyclonal antibody using the ECL Western blotting Analysis System (GE Healthcare Life Sciences).

Maltose Complementation Assay.

Membrane insertion and correct orientation of the various ToxR chimera constructs (TM1, TM2, GpA, and GpA G83A) were examined as described previously (30). Briefly, PD28 cells were transformed with the different plasmids and cultured overnight. The cells were then washed twice and resuspended in phosphate-buffered saline and used to inoculate M9 minimal medium containing 0.4 % maltose as the only carbon source. The time course of cell growth was measured at different time points with a spectrophotometer at 600 nm.

Molecular Modeling of ECD and TM of NPRA in an Active Conformation.

First, the model of the TM was obtained by homology modeling performed with the default parameters of Modeler 9v3 (31). The NMR structure of the dimeric transmembrane domain of the growth factor receptor ErbB2 was used as the template [Protein Data Bank (PDB) entry 2JWA] (32). Sequence alignment of the ErbB2 and NPRA TM was performed with 3D-COFFEE (33) (Figure 7A). Fifty models were created, and the lowest-energy one was chosen for the next step of modeling. The second step was to merge residues 423-435, which form a disulfide bridge loop, with the structure of the ECD NPRA-ANP complex (PDB entry IT34) (20). These residues were indeed crystallized in the apo form of ECD NPRA (PDB entry 1DP4) (34). Their spatial conformation was merged with the ECD NPRA-ANP complex using ZMM (www.zmmsoft.com). Main chain atoms of residues 423-435 of the complex and the same residues of the loop were superimposed using energy minimization and distance constraints 0 Å for homologous atoms. No major conformational changes were observed during the minimization process. A similar energy minimization

protocol was used to merge the TM with the ECD NPRA-ANP complex. Merging involved residues 433-435 of the main structure and the same residues of the TM helices, and only residues 421-437 had freedom of movement during the minimization. At this point, the structure was complete (ECD and TM). The last step of the modeling was to impose a proximity constraint between the D435 residues from both subunits to suit experimental results. We used many molecular dynamics and relaxation steps until the distance between the C α atoms of the residues was no more than 7 Å. Module Discover3 of InsightII (Accelrys) was used for all the dynamic simulations, with the CVFF force field and a shell of explicit water molecules of 8 Å. During all the simulations, the backbone of the complex was tethered to its original position, except for residues 422-437 inclusively.

Data Analysis and Statistics.

Guanylyl cyclase activities were analysed with RiaFit, which was based on the four-parameter logistic equation (35). Statistical testing of repeat experiments was performed by analysis of variance, followed by post hoc Dunnett's test, with a $p < 0.05$ significance level.

Results

Evaluation of the Relative Proximity of the JM Residues within the NPRA Dimer.

NPRA JM plays a critical role in receptor activation (17, 18). To analyze the ANP-induced conformational change in the JM, we sequentially substituted the nine amino acids of the JM with a cysteine residue (Figure 1A). By studying the mutant's ability to form ANP-induced or constitutive covalent disulfide dimers, we evaluated the relative proximity of JM residues, before and after NPRA activation. Indeed, the ability to form a disulfide cross-link implies that the JM residues are closely apposed in the receptor dimer (~7 Å between the C α atoms). To determine whether these mutants, when stably expressed in Flp-In-293 cells, could form intermolecular disulfide bonds, we performed nonreducing SDS-PAGE and Western blotting and measured the percentage of covalent dimerization by densitometry (Figure 1C).

First we performed saturation binding assays to verify that WT and cysteine mutants had similar affinity for ANP and similar expression levels. Indeed, the pK ($=-\log K_d$) for ANP binding was maintained between 11.0 and 11.4, and the receptor expression level was between 1 and 3.0 pmol/mg (data not shown).

In the basal state, only some mutants are able to efficiently form covalent dimers (Figure 1B), especially T439C and L440C, which are 70 and 65% dimeric, respectively. However, upon binding by ANP, almost all the mutants are able to dimerize with variable efficiency. In particular, the extent of dimerization is very high ($>60\%$) for D435C and F437C to L440C. These results suggest that the JM conformation is constrained at the basal state and becomes more flexible upon ANP binding. In addition, ANP seems to induce repositioning of the JM residues. This is particularly true for D435C, S438C, and E441C which display a large induction of dimerization by ANP (>2 -fold higher than basal level).

Dimerization Is Necessary but Not Sufficient for NPRA activation.

To determine if residue proximities observed above were characteristic of the basal or active state of the NPRA, we measured the guanylyl cyclase activity of cysteine mutants at the basal state and after ANP stimulation. The amount of accumulated cGMP in extracellular medium was measured and normalized using the maximal activity measured after Triton/Mn solubilisation of cells remaining attached in wells.

As indicated in Figure 2, some mutants are constitutively active at the basal state, in particular N433C, D435C, and L440C which have guanylyl cyclase activities 36-, 25- and 29-fold higher than that of WT NPRA, respectively. However, the level of the disulfide-linked dimer is not correlated with the extent of guanylyl cyclase activity. For example, T439C shows the strongest extent of dimerization at the basal state, with almost 70% of the total cellular receptor as a disulfide-linked dimer (Figure 1B) but exhibits a guanylyl cyclase activity similar to that of WT NPRA (Figure 2). On the other hand, the L440C mutant, which shows the next highest percentage of dimerization at the basal state (65%, Figure 1B), is constitutively active. Intriguingly, N433C is constitutively active at the basal state, with the highest guanylyl cyclase activity of all, although it was unable to form an interchain disulfide

bridge in this basal state (Figure 1B). This increase in guanylyl cyclase activity could be due to the mutation itself. Indeed, the Asn substitution by a more hydrophobic amino acid could change the juxtamembrane conformation. In addition, in the N433C mutant, the additional cysteine is located just next to cysteine 432 which is involved in the intrachain C423-C432 loop. It has been demonstrated that an alteration of this loop, by the C423S/C432S mutation, leads to a constitutive activation of NPRA without disulfide bridge formation (16). The formation of an altered C432-C433 loop with an extra amino acid in the N433C mutant could possibly explain its high constitutive activity.

D435C and L440C, which were constitutively active at the basal state, are also almost 2,5-fold more active than WT NPRA in the presence of ANP. As these mutants were highly covalently dimeric in the presence of ANP, we can suggest that the proximity of D435 and L440 residues within the NPRA dimer is crucial for NPRA activation.

In a previous publication (19), we suggested that dimerization was not sufficient for NPRA activation by demonstrating that the antagonist A71915 stabilizes a dimeric form of ECD NPRA. We next used our cysteine mutants to confirm this suggestion. We compared the ability of the antagonist A71915 and agonist ANP to induce covalent dimerization of some cysteine mutants. All mutants exhibited the same increase in the level of covalent dimerization with each ligand, but we observed that N433C, S438C and E441C mutants exhibited different profiles of covalent dimerization according to the ligand (Figure 3). Results indicate that the antagonist A71915 stabilizes a dimeric form of the NPRA in which the JM residues are in a conformation different from the active and basal states.

Even though the positioning of N433, S438, and E441 seems to be discriminating, D435C and L440C exhibit the same covalent dimerization profiles with A71915 and ANP (Figure 3). One can speculate that this observation contradicts our conclusion that the proximity of D435 and L440 is crucial for NPRA activation. However, the antagonist A71915 is in fact a weak partial agonist (36). The proximity of D435 and L440 residues induced by A71915 could be responsible for its partial agonist activity.

We can conclude that dimerization is clearly not sufficient for NPRA activation. The receptor activation is not accomplished simply by bringing two

receptor subunits into the proximity of one another. Thus, the relative orientation of the two juxtamembrane domains of the NPRA dimer, rather than their proximity, determines the activation state of the receptor.

The Intracellular Domain Imposes a Conformational Constraint on the JM in the Basal State.

Our next objective was to assess the potential role of the intracellular domain in the conformational constraint observed at the basal state in the cysteine mutant covalent dimerization studies. We thus obtained constructs with truncations of the whole intracellular domain on some cysteine mutants which displayed a high level of induction of dimerization by ANP, such as D435C and S438C, or a high percentage of covalent dimerization at the basal state, such as L440C.

Covalent dimerization of the Δ ICD mutants appears almost complete at the basal state (80%), whereas it was less elevated for full-length D435C, S448C, and L440C mutants (41, 27 and 65%, respectively). Furthermore, ANP has no further effect on the dimerization level (Figure 4). Therefore, the intracellular domain is responsible for the JM conformational constraint observed in the basal state.

Constitutive NPRA Activation by Relative Subunit Rotation.

Previous studies in our laboratory demonstrated that dimerization of NPRA is not sufficient for activation (19). These results have been confirmed in this study. Furthermore, the minor extent of conformational difference between the unliganded and liganded forms of the ECD illustrated by crystallography restricts options for transmembrane signaling (20). We thus tested the rotation mechanism hypothesis by introducing one to five alanine residues running on from the TM α -helix (Figure 5A). Indeed, polyalanine peptides form α -helix structures in which each helix turn contains 3.5 amino acids so that each alanine insertion results in an ICD rotation of $\sim 100^\circ$ ($360^\circ/3.5$).

Alanine insertion resulted in high constitutive activity only in the case of the four-alanine insertion (~ 49 -fold more than WT activity, Figure 5B). This insertion is predicted to rotate the intracellular domain a total of 400° , thus 40° clockwise past the initial position. The five-alanine insertion doesn't induce a significant constitutive

activation, indicating that constitutive activity depends on the degree of rotation and not on the number of alanines inserted. Because there is no sequential increase in activity with serial addition of alanine residues, a piston mechanism can be excluded. Surprisingly, alanine insertion has no effect on ANP-induced activity, since alanine mutants exhibit the same induced activity as the WT receptor (Figure 5B). This observation could be explained by the fact that ANP binding increases flexibility in receptor conformation, as observed in the cysteine mutant dimerization assay. These results still support the hypothesis that TM helix rotation is a part of NPRA transmembrane signaling.

The Last Residues of the JM Stabilize the NPRA TM Dimer.

Our studies of rNPRA cysteine mutants suggested a close proximity of some JM residues and the presence of a dimerization interface at the beginning of the α -helical TM segment. The orientation of the TMs in the plasma membrane and the role of these domains in NPRA dimerization have not been studied. We therefore used the simple and robust ToxR system to assess the ability of NPRA TMs to self-assemble in vivo (28). The ToxR transcriptional activator can be used successfully to assess weak TM-TM interactions within the *E. coli* membrane. TMs under study are inserted between a periplasmic maltose binding protein and a cytoplasmic ToxR transcription activator protein. Dimerization of the TMs in this system results in the association of the ToxR transcriptional activator, which can then activate the transcription of the β -galactosidase reporter gene. Quantification of the level of TM dimerization is then obtained by measuring the β -galactosidase activity.

To assess the role of the last residues of the JM in TM dimerization, we tested two constructs of the NPRA TM. TM1 displayed the three last residues of the JM and the first 13 residues of the TM. TM2 displayed only the first 16 residues of the TM (Figure 6A). We used the well-investigated self-interacting GpA TM as a positive control for homodimerization and the GpA G83A mutant which lacks the capacity to dimerize as a monomeric control (28).

We first verified the expression levels of all the chimeras and their proper insertion into the membrane by performing Western blotting and maltose complementation assays. The expression levels of the chimeras were similar for Neg,

Pos, and TM1 (Figure 6B inset). Densitometric quantification of five independent blots established that average levels of these ToxR constructs range from 95% (TM1) to 125% (Pos) of the negative control (data not shown). The TM2 construct was however overexpressed (~200% of the negative control, data not shown). The membrane insertion and correct orientation of the various constructs were assessed via examination of the ability of the transformed PD28 bacteria, which lack the endogenous maltose-binding protein gene, to grow on minimal M9 medium containing maltose as the only carbon source. Indeed, these bacteria are unable to grow without the presence of a properly inserted chimera membrane protein. We followed the PD28 growth curve for 44 h. All constructs exhibited similar rates of cell growth (Figure 6C), indicating proper membrane integration. Thus, we conclude that all the constructs used in this study are expressed and inserted in the correct orientation into the inner membrane.

Then we evaluated the β -galactosidase activity of our NPRA TM constructs to assess their capacity to dimerize. The TM2 construct exhibited a signal similar to the negative control, corresponding to a monomeric TM. The TM1 construct displayed a signal significantly higher than the negative control (~2.5-fold), indicating its propensity to dimerize (Figure 6B). These results demonstrate that the last three residues of the JM (T439, L440, and E441) are required to stabilize the TM dimer. These data furthermore reinforce the hypothesis of the proximity of the last juxtamembrane residues documented by cysteine mutant studies.

Active Conformational Model of NPRA.

Crystallographic studies of the soluble liganded or unliganded extracellular domain of NPRA have failed to document the structure of the JM. The JM is poorly structured in solution, suggesting that its conformation is dependent on the TM and ICD domains. According to the ANP-liganded crystal, the NPRA extracellular domain subunits are composed of 2 well-structured lobes followed by a disulfide bridge loop (C423-C432) which links the JM to the lower lobe. Disulfide-bridged loops are hanging under the lower lobes with D435 residues of each subunit pointing in opposite directions (20, 34). Our results are in disagreement with these crystallographic data, since we demonstrated that D435 residues are in close

proximity in the activated state of NPRA. We thus generated an improved molecular model illustrating the active conformation of NPRA in which the TMs are taken into account.

We first built a model of the TM by homology modeling using the ErbB2 TM structure as a template. ErbB2 is a single-transmembrane receptor with the same topology as NPRA. Moreover, the RMN structure of the ErbB2 TM in an active conformation displayed a dimerization interface at the beginning of the TM (32) and our results suggested that it is also the case for NPRA. Finally, alignment of ErbB2 and NPRA TM amino acid sequences shows sufficient homology (Figure 7A). The resulting TM structure was then merged with the ECD crystal structure by energy minimization, and finally proximity constraints of C432 and D435 residues of the JM were imposed by molecular dynamics.

In contrast with the crystal structure, our proposed model shows that the disulfide-bridged loops C423-C432 are positioned horizontally under the lower lobes (Figure 7B). In addition, D435 residues are now in proximity. The last three residues of the JM (T439, L440, and E441) are located in an outer extension of the transmembrane α -helix. These residues, as well as the initial residues of the TM form a helix-helix interface, which is putatively mediating NPRA activation.

Discussion

Ottemann et al. (37) postulated general models for transmembrane signaling based on hypothetical motions in the transmembrane region. Their models included association, dissociation, piston, rotation, scissor, and seesaw mechanisms. Until recently, the general consensus was that signaling by most single-transmembrane receptors occurs by an association mechanism, in which ligand binding brings the receptor molecules close together, and this proximity activates in turn the effector enzyme. However, many recent studies on cytokine and tyrosine kinase receptors contradicted this consensus and demonstrated that dimerization is required but not necessarily sufficient for receptor activation (38). First, many of these receptors are normally present as dimers on the surface of the cell in the absence of ligand (21, 23, 39, 40). Moreover, certain covalently dimeric receptors, such as the A653C ErbB2 mutant or IGF-1 receptor, are inactive (38, 40). Finally, antagonists also stabilize the

dimeric form of some of these receptors, as shown for Epo receptor (EpoR) antagonist EMP33 (41). Activation of most single-transmembrane receptors thus seems to be orientation-dependent. NPRA is dimeric at the surface of the cell in the absence of ligand (42). We also recently demonstrated that ANP binds a preformed soluble ECD dimer of NPRA and that the antagonist A71915 also stabilizes a dimeric form of ECD (19). Taken together, these data clearly suggest that dimerization is insufficient for NPRA activation. Several studies have suggested that activation of NPRA involved a conformational change in the JM (16-18). Here, we confirm this hypothesis and demonstrate that the relative orientation of the two juxtamembrane domains of the NPRA dimer, rather than their proximity, determines the activation state of the receptor (Figures 1-3). Indeed, both the agonist and the antagonist stabilize a dimeric form of the NPRA where JMs occur in different conformations, which are distinct from that of the basal conformation.

Transmembrane signaling of some single-transmembrane receptors is likely to involve a rotation mechanism (21-24). The EpoR receptor seems to be activated by a combination of scissor movement and subunit rotation (24, 38), whereas GH receptor (GHR) activation requires relative subunit rotation and vertical movement (21). A rotational mechanism has also been proposed for the EGF receptor (EGFR) and ErbB2 (22, 23). We could expect that the conformational change induced by ANP on ECD would be much more subtle than conformational changes observed for growth hormone or cytokine receptors. Indeed, cytokines are larger proteins that present a well-defined secondary structure in both free and receptor-bound states. In contrast, natriuretic peptides are small polypeptides with a disordered conformation in solution (43) and they must acquire a flat penny-like conformation by selection or induction when binding to NPRA. Moreover, crystallography studies showed a minor extent of conformational difference between the unliganded and liganded forms of NPRA, restricting options for transmembrane signaling mechanisms (20). Here, we tested the hypothesis of a rotational mechanism and demonstrated that a 40° rotation of the NPRA TM leads to a constitutively activated receptor, although not fully. It is noteworthy that GHR is also constitutively activated by a 40° rotation of TM (21). However, this constitutive rotation-dependent activation of NPRA is partial compared to ANP activation (6% of the maximal ANP-activated level). The fact that rotation is not sufficient for full activation of the receptor suggests that rotation is not the sole

mechanism involved in signal transduction. Alternatively, we cannot exclude the possibility that alanine insertion incompletely mimics transmembrane domain rotation for NPRA. We also demonstrated that proximity of certain JM residues is crucial for NPRA activation (Figures 1 and 2). Thus, we can hypothesize that signal transduction would be a combination of subunit rotation together with additional translations which bring crucial residues of the JM into proximity.

We have originally proposed a rotational mechanism for NPRA activation based on the observation of agonist-induced covalent dimerization of the D435C mutant of full-length NPRA (18). Ogawa et al. confirmed this proposed rotational mechanism for NPRA soluble ECD, based on crystallographic study (20). However, this rotation mechanism is drastically different from the one that we propose here. In Ogawa's model, the proximity of JMs is not taken into account because they are absent from the structure documented. On the contrary, the central axes of the ECD subunits, including part of the JM, seem to move away from each other upon ANP binding. Although this structural study of the soluble ECD is certainly informative, it is not sufficient to describe the activation mechanism of NPRA in the context of the membrane-bound full-length receptor. Activation mechanisms must be studied in a full-length receptor context especially with NPRA, since mutual allosteric influences of ECD and ICD have been demonstrated. Indeed, as we are showing in this study, ICD constraints the JM conformation to the basal state (Figures 1 and 4). Agonists overcome this constraint, thus permitting initiation of activation (Figure 1). Following the response of the ICD to JM and TM conformational changes, ATP binds to the KHD, inducing guanylyl cyclase activation as well as increased ANP dissociation rate (10, 11).

Our model takes the JM and TM into account, and TMs are expected to influence ECD and particularly JM conformation (Figure 7). Accordingly, we demonstrated that T439, L440, and E441 residues are required and sufficient for the stabilization of the TM dimer (Figure 6). Moreover, we illustrated the proximity of these residues in the NPRA dimer by cysteine mutation studies (Figure 1). The TM of NPRA was predicted to begin with residue V442. However our TM dimerization study suggests that T439, L440, and E441 residues are also part of the transmembrane α -helix. ErbB2 and NPRA sequence alignment suggests that L440 and E441 could be part of the transmembrane domain and that T439 would be the α -

helix cap. The specific role of these three residues in the full-length receptor remains to be studied in detail. Our model illustrates the active state of NPRA and is the first model in which JM and TM are depicted. Obviously, this model is represented as a snapshot image, whereas activation mechanisms are dynamic processes. Recent studies suggest the occurrence of multiple conformations for G-protein-coupled receptor activation. This concept suggests the existence of multiple, ligand-specific conformational states and multiple conformational intermediates between the basal and maximal activation states (44). This concept could be applied to single-transmembrane receptors. Indeed, it has been demonstrated using crystallography that the natural agonist Epo and mimetic agonist EMP1 induce very different conformational changes in EpoR (38). Likewise, our FRET studies with NPRA ECD showed that the conformation of ligand-bound dimers differs depending on the agonist bound (19). The traditional concept of dual active and inactive conformations is most likely an oversimplification of receptor signal transduction mechanism that has now evolved into a more detailed kinetic model of signal transduction.

The NPRA activation process is currently divided into two steps. (1) ANP binding induces a conformational change in the JM, presumably transmitted through the membrane by a rotation of the TM. This rotation then allows ATP binding, perhaps by exposing the ATP binding site. (2) ATP binding induces another conformational change that is transmitted through the coiled coil connecting the KHD with the GC. Although the conformational changes occurring in the ICD remain to be elucidated, this could occur perhaps by an axial rotation or a lateral movement, which would then allow full activation of guanylyl cyclase. Crystallographic documentation of the structure of ICD should provide further insight into the signal transduction of NPRA. Here, we identified a plausible mechanism illustrating signal transduction through the cell membrane which could be applied to other membrane guanylyl cyclases and could contribute to an improved understanding of other single-transmembrane receptors. The generation of a full-length molecular model at the basal state would be also needed. Further studies will be required to document the dynamic conformational changes in the NPRA activation mechanism.

Acknowledgement

We greatly appreciate the gift of ToxR system vectors and bacterial strains from Dr. Dieter Langosch (Lehrstuhl für Chemie der Biopolymere). We are grateful to the GÉPROM (Groupe d'Étude des Protéines Membranaires) for allowing access to its molecular modeling platform. We thank Dr. Simon Joubert for critical reading of the manuscript.

References

1. Potter, L. R., Abbey-Hosch, S., and Dickey, D. M. (2006) Natriuretic peptides, their receptors, and cyclic guanosine monophosphate-dependent signaling functions, *Endocr Rev* 27, 47-72.
2. Gardner, D. G., Chen, S., Glenn, D. J., and Grigsby, C. L. (2007) Molecular biology of the natriuretic peptide system: implications for physiology and hypertension, *Hypertension* 49, 419-426.
3. Kuhn, M. (2004) Molecular physiology of natriuretic peptide signalling, *Basic Res Cardiol* 99, 76-82.
4. Strain, W. D. (2004) The use of recombinant human B-type natriuretic peptide (nesiritide) in the management of acute decompensated heart failure, *Int J Clin Pract* 58, 1081-1087.
5. Lee, C. Y., and Burnett, J. C., Jr. (2007) Natriuretic peptides and therapeutic applications, *Heart Fail Rev* 12, 131-142.
6. Dickey, D. M., Burnett, J. C., Jr., and Potter, L. R. (2008) Novel bifunctional natriuretic peptides as potential therapeutics, *J Biol Chem* 283, 35003-35009.
7. Lee, C. Y. W., and Burnett Jr, J. C. (2007) Discovery of a Novel Synthetic Natriuretic Peptide, CU-NP, *Journal of Cardiac Failure* 13, S74-S74.
8. Padayatti, P. S., Pattanaik, P., Ma, X., and van den Akker, F. (2004) Structural insights into the regulation and the activation mechanism of mammalian guanylyl cyclases, *Pharmacol Ther* 104, 83-99.
9. Rondeau, J. J., McNicoll, N., Gagnon, J., Bouchard, N., Ong, H., and De Lean, A. (1995) Stoichiometry of the atrial natriuretic factor-R1 receptor complex in the bovine zona glomerulosa, *Biochemistry* 34, 2130-2136.
10. Larose, L., McNicoll, N., Ong, H., and De Lean, A. (1991) Allosteric modulation by ATP of the bovine adrenal natriuretic factor R1 receptor functions, *Biochemistry* 30, 8990-8995.
11. Duda, T., Venkataraman, V., Ravichandran, S., and Sharma, R. K. (2005) ATP-regulated module (ARM) of the atrial natriuretic factor receptor guanylate cyclase, *Peptides* 26, 969-984.
12. Chinkers, M., and Garbers, D. L. (1989) The protein kinase domain of the ANP receptor is required for signaling, *Science* 245, 1392-1394.

13. Joubert, S., Jossart, C., McNicoll, N., and De Lean, A. (2005) Atrial natriuretic peptide-dependent photolabeling of a regulatory ATP-binding site on the natriuretic peptide receptor-A, *FEBS J* 272, 5572-5583.
14. Joubert, S., Labrecque, J., and De Lean, A. (2001) Reduced activity of the NPR-A kinase triggers dephosphorylation and homologous desensitization of the receptor, *Biochemistry* 40, 11096-11105.
15. Joubert, S., McNicoll, N., and De Lean, A. (2007) Biochemical and pharmacological characterization of P-site inhibitors on homodimeric guanylyl cyclase domain from natriuretic peptide receptor-A, *Biochem Pharmacol* 73, 954-963.
16. Huo, X., Abe, T., and Misono, K. S. (1999) Ligand binding-dependent limited proteolysis of the atrial natriuretic peptide receptor: juxtamembrane hinge structure essential for transmembrane signal transduction, *Biochemistry* 38, 16941-16951.
17. Labrecque, J., Mc Nicoll, N., Marquis, M., and De Lean, A. (1999) A disulfide-bridged mutant of natriuretic peptide receptor-A displays constitutive activity. Role of receptor dimerization in signal transduction, *J Biol Chem* 274, 9752-9759.
18. Labrecque, J., Deschenes, J., McNicoll, N., and De Lean, A. (2001) Agonistic induction of a covalent dimer in a mutant of natriuretic peptide receptor-A documents a juxtamembrane interaction that accompanies receptor activation, *J Biol Chem* 276, 8064-8072.
19. Parat, M., McNicoll, N., Wilkes, B., Fournier, A., and De Lean, A. (2008) Role of extracellular domain dimerization in agonist-induced activation of natriuretic peptide receptor A, *Mol Pharmacol* 73, 431-440.
20. Ogawa, H., Qiu, Y., Ogata, C. M., and Misono, K. S. (2004) Crystal structure of hormone-bound atrial natriuretic peptide receptor extracellular domain: rotation mechanism for transmembrane signal transduction, *J Biol Chem* 279, 28625-28631.
21. Brown, R. J., Adams, J. J., Pelekanos, R. A., Wan, Y., McKinsty, W. J., Palethorpe, K., Seeber, R. M., Monks, T. A., Eidne, K. A., Parker, M. W., and Waters, M. J. (2005) Model for growth hormone receptor activation based on subunit rotation within a receptor dimer, *Nat Struct Mol Biol* 12, 814-821.

22. Bell, C. A., Tynan, J. A., Hart, K. C., Meyer, A. N., Robertson, S. C., and Donoghue, D. J. (2000) Rotational coupling of the transmembrane and kinase domains of the Neu receptor tyrosine kinase, *Mol Biol Cell* 11, 3589-3599.
23. Moriki, T., Maruyama, H., and Maruyama, I. N. (2001) Activation of preformed EGF receptor dimers by ligand-induced rotation of the transmembrane domain, *J Mol Biol* 311, 1011-1026.
24. Lu, X., Gross, A. W., and Lodish, H. F. (2006) Active conformation of the erythropoietin receptor: random and cysteine-scanning mutagenesis of the extracellular juxtamembrane and transmembrane domains, *J Biol Chem* 281, 7002-7011.
25. Marquis, M., Fenrick, R., Pedro, L., Bouvier, M., and De Lean, A. (1999) Comparative binding study of rat natriuretic peptide receptor-A, *Mol Cell Biochem* 194, 23-30.
26. Fethiere, J., Meloche, S., Nguyen, T. T., Ong, H., and De Lean, A. (1989) Distinct properties of atrial natriuretic factor receptor subpopulations in epithelial and fibroblast cell lines, *Mol Pharmacol* 35, 584-592.
27. Potter, L. R., and Garbers, D. L. (1992) Dephosphorylation of the guanylyl cyclase-A receptor causes desensitization, *J Biol Chem* 267, 14531-14534.
28. Langosch, D., Brosig, B., Kolmar, H., and Fritz, H. J. (1996) Dimerisation of the glycoporphin A transmembrane segment in membranes probed with the ToxR transcription activator, *J Mol Biol* 263, 525-530.
29. Kolmar, H., Hennecke, F., Gotze, K., Janzer, B., Vogt, B., Mayer, F., and Fritz, H. J. (1995) Membrane insertion of the bacterial signal transduction protein ToxR and requirements of transcription activation studied by modular replacement of different protein substructures, *EMBO J* 14, 3895-3904.
30. Brosig, B., and Langosch, D. (1998) The dimerization motif of the glycoporphin A transmembrane segment in membranes: importance of glycine residues, *Protein Sci* 7, 1052-1056.
31. Sali, A., and Blundell, T. L. (1993) Comparative protein modelling by satisfaction of spatial restraints, *J Mol Biol* 234, 779-815.
32. Bocharov, E. V., Mineev, K. S., Volynsky, P. E., Ermolyuk, Y. S., Tkach, E. N., Sobol, A. G., Chupin, V. V., Kirpichnikov, M. P., Efremov, R. G., and Arseniev, A. S. (2008) Spatial structure of the dimeric transmembrane domain of the growth

factor receptor ErbB2 presumably corresponding to the receptor active state, *J Biol Chem* 283, 6950-6956.

33. Poirot, O., Suhre, K., Abergel, C., O'Toole, E., and Notredame, C. (2004) 3DCoffee@igs: a web server for combining sequences and structures into a multiple sequence alignment, *Nucleic Acids Res* 32, W37-40.

34. van den Akker, F., Zhang, X., Miyagi, M., Huo, X., Misono, K. S., and Yee, V. C. (2000) Structure of the dimerized hormone-binding domain of a guanylyl-cyclase-coupled receptor, *Nature* 406, 101-104.

35. De Lean, A., Munson, P. J., and Rodbard, D. (1978) Simultaneous analysis of families of sigmoidal curves: application to bioassay, radioligand assay, and physiological dose-response curves, *Am J Physiol* 235, E97-102.

36. von Geldern, T. W., Budzik, G. P., Dillon, T. P., Holleman, W. H., Holst, M. A., Kiso, Y., Novosad, E. I., Opgenorth, T. J., Rockway, T. W., Thomas, A. M., and et al. (1990) Atrial natriuretic peptide antagonists: biological evaluation and structural correlations, *Mol Pharmacol* 38, 771-778.

37. Ottemann, K. M., Xiao, W., Shin, Y. K., and Koshland, D. E., Jr. (1999) A piston model for transmembrane signaling of the aspartate receptor, *Science* 285, 1751-1754.

38. Jiang, G., and Hunter, T. (1999) Receptor signaling: when dimerization is not enough, *Curr Biol* 9, R568-571.

39. Remy, I., Wilson, I. A., and Michnick, S. W. (1999) Erythropoietin receptor activation by a ligand-induced conformation change, *Science* 283, 990-993.

40. Burke, C. L., and Stern, D. F. (1998) Activation of Neu (ErbB-2) mediated by disulfide bond-induced dimerization reveals a receptor tyrosine kinase dimer interface, *Mol Cell Biol* 18, 5371-5379.

41. Livnah, O., Johnson, D. L., Stura, E. A., Farrell, F. X., Barbone, F. P., You, Y., Liu, K. D., Goldsmith, M. A., He, W., Krause, C. D., Pestka, S., Jolliffe, L. K., and Wilson, I. A. (1998) An antagonist peptide-EPO receptor complex suggests that receptor dimerization is not sufficient for activation, *Nat Struct Biol* 5, 993-1004.

42. Chinkers, M., and Wilson, E. M. (1992) Ligand-independent oligomerization of natriuretic peptide receptors. Identification of heteromeric receptors and a dominant negative mutant, *J Biol Chem* 267, 18589-18597.

43. Carpenter, K. A., Wilkes, B. C., De Lean, A., Fournier, A., and Schiller, P. W. (1997) Hydrophobic forces are responsible for the folding of a highly potent natriuretic peptide analogue at a membrane mimetic surface: an NMR study, *Biopolymers* 42, 37-48.
44. Kobilka, B. K., and Deupi, X. (2007) Conformational complexity of G-protein-coupled receptors, *Trends Pharmacol Sci* 28, 397-406.

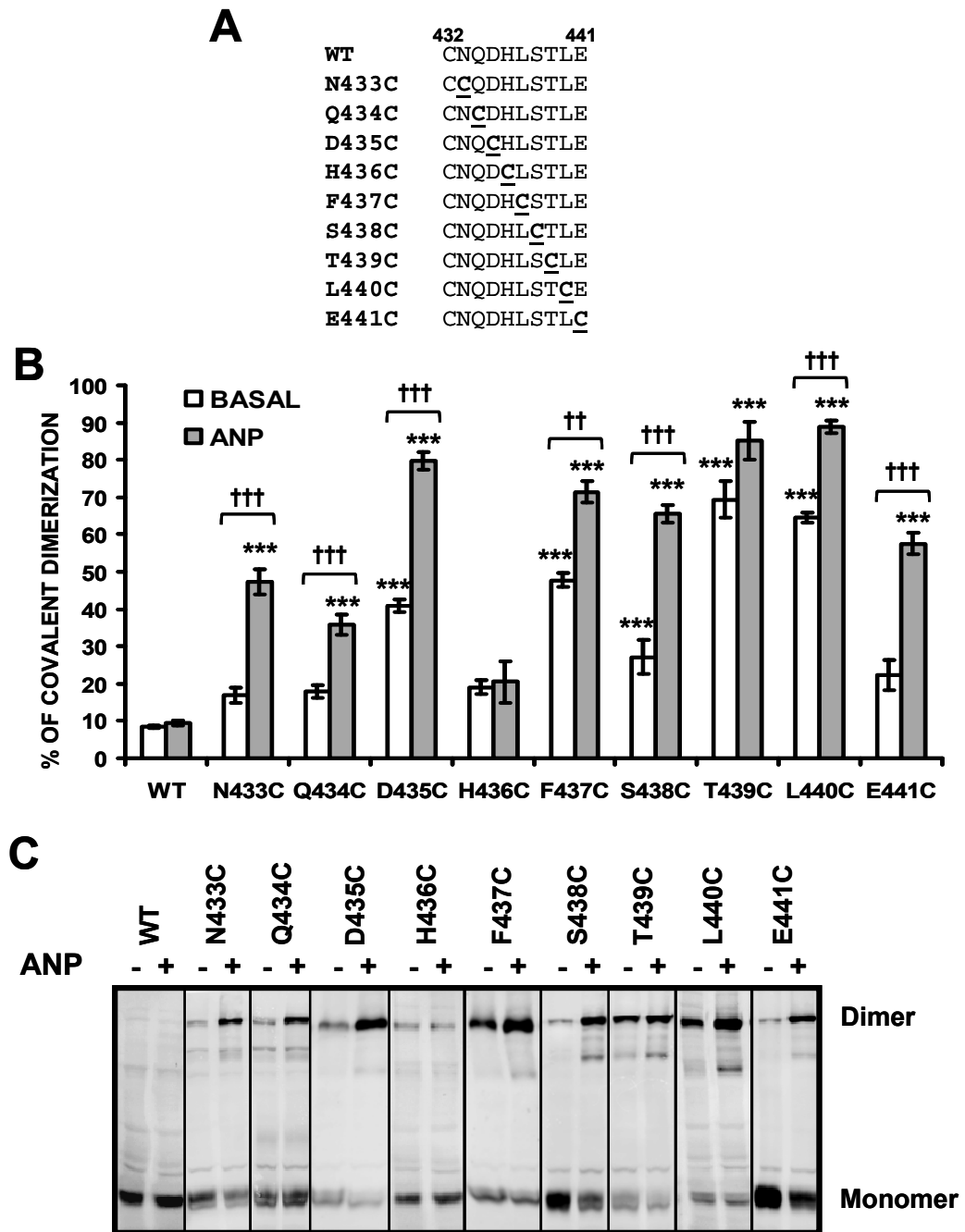


Figure 7.1: Covalent dimerization of NPRA cysteine mutants.

(A) Site-directed mutations in the NPRA JM. The cysteine substitutions are underlined. (B) Covalent dimerization levels of cysteine mutants. Flp-In-293 cells stably expressing WT NPRA or cysteine mutants were untreated (white) or treated (gray) with 10^{-8} M rANP at 37°C for 30 min. Membranes (20-80 μg) prepared from these cells in presence of NEM (to prevent nonspecific covalent dimerization) were loaded onto a nonreducing 5% SDS-PAGE gel. Receptor monomers and covalent dimers were detected by Western blotting using a specific antibody as described in

Materials and Methods and analyzed with a Typhoon Imager. For each mutant, levels of receptor dimers and monomers were measured by densitometry with ImageQuant TL v2005 and were used to calculate covalent dimerization percentages. $N = 4-12$. $P < 0.01$ (**) and $P < 0.001$ (***) compared to the WT. $P < 0.01$ (††) and $P < 0.001$ (†††) compared to the basal level of covalent dimerization. **(C)** Representative examples of Western blots of the cysteine mutants with or without ANP.

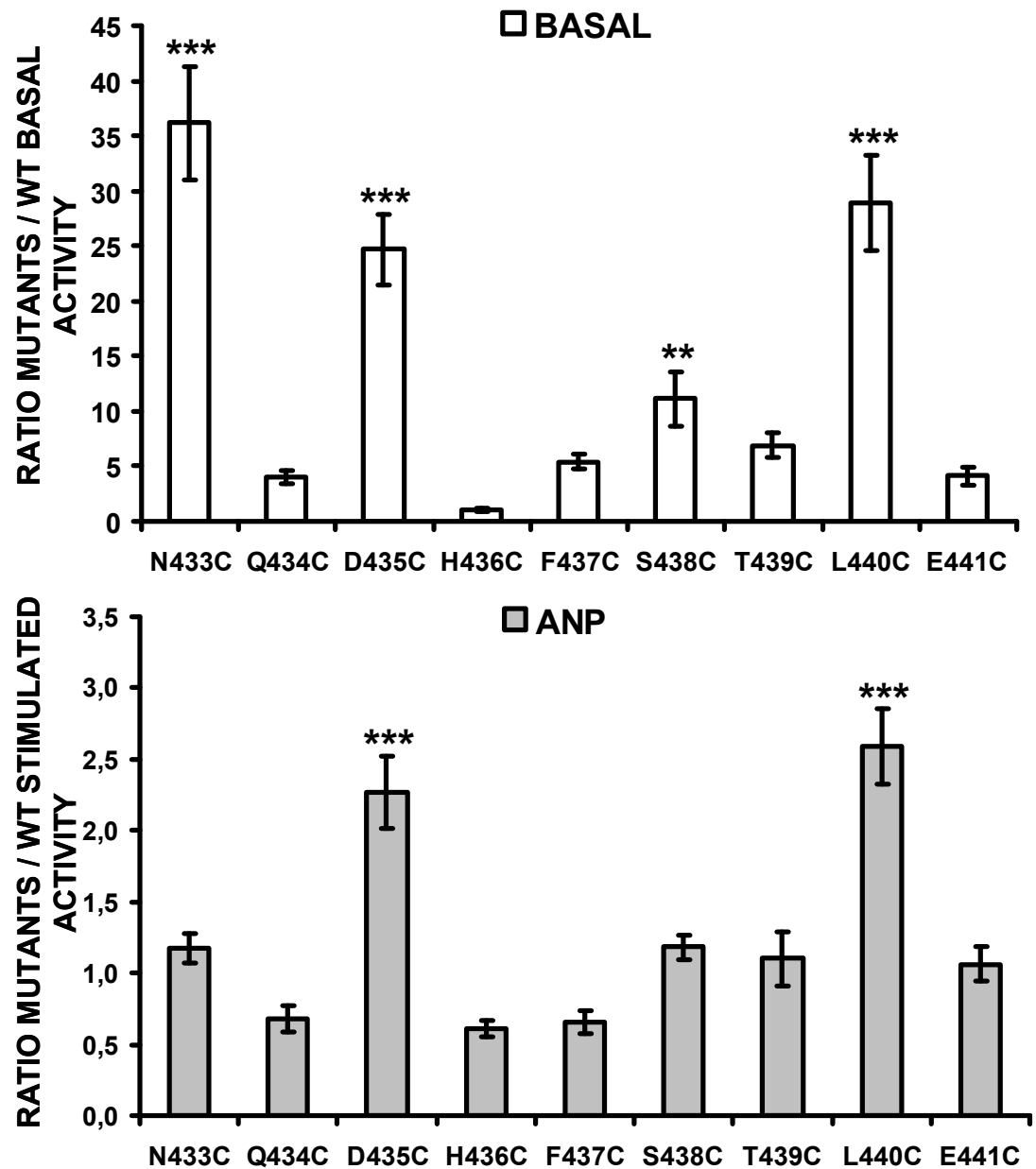


Figure 7.2: Guanylyl cyclase activity of NPRA cysteine mutants.

Flp-In-293 cells stably expressing WT NPRA or cysteine mutants were untreated (white) or treated (gray) with 10^{-7} M rANP at 37°C for 1 h, as described in Materials and Methods. The level of cGMP accumulation was measured in the extracellular medium by radio-immunoassay. Results were normalized according to the maximal enzymatic activation level of solubilized cells obtained in Triton and Mn^{2+} . The results are expressed as a ratio of mutants to WT NPRA activity under basal condition (white) or after stimulation by ANP (gray). $N = 4-12$. $P < 0.01$ (**) and $P < 0.001$ (***) compared to the WT.

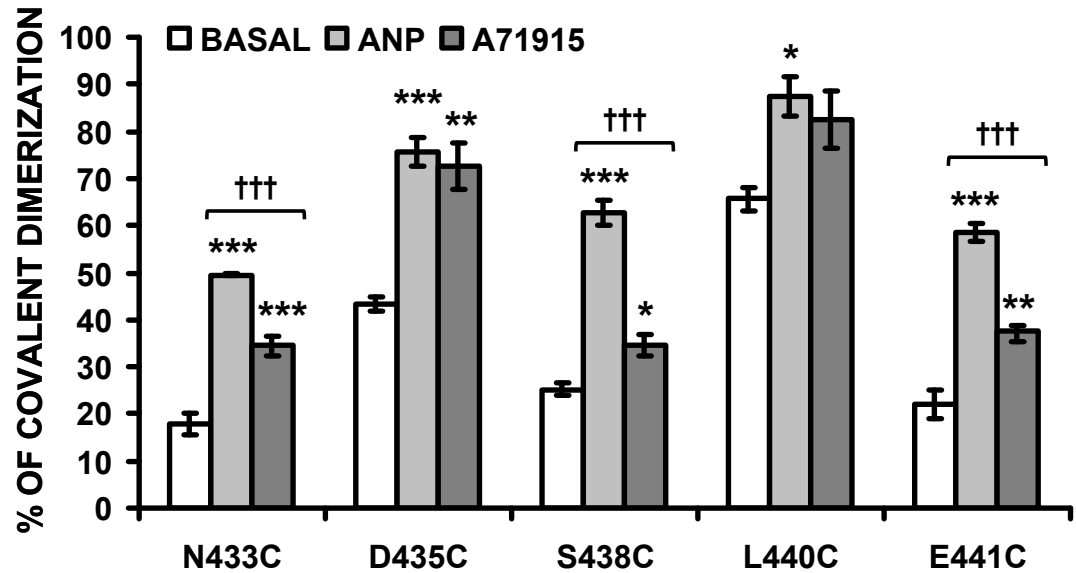


Figure 7.3: Effect of A71915 antagonist on the covalent dimerization of NPRA cysteine mutants.

Flp-In-293 cells stably expressing WT NPRA or cysteine mutants were untreated (white) or treated with 10^{-8} M rANP (gray) or 10^{-5} M A71915 (dark gray) at 37°C for 30 min. Membranes (20-80 μg) prepared from these cells in presence of NEM (to prevent nonspecific covalent dimerization) were loaded on a nonreducing 5% SDS-PAGE gel. Receptor monomers and covalent dimers were detected by Western blotting using a specific antibody as described in Materials and Methods and analyzed with a Typhoon Imager. Levels of receptor dimers and monomers were measured by densitometry with ImageQuant TL v2005 and were used to calculate covalent dimerization percentages. $N = 3$. $P < 0.01$ (**) and $P < 0.001$ (***) compared to the basal level of covalent dimerization. $P < 0.01$ (††) and $P < 0.001$ (†††) compared to the ANP-induced level of covalent dimerization.

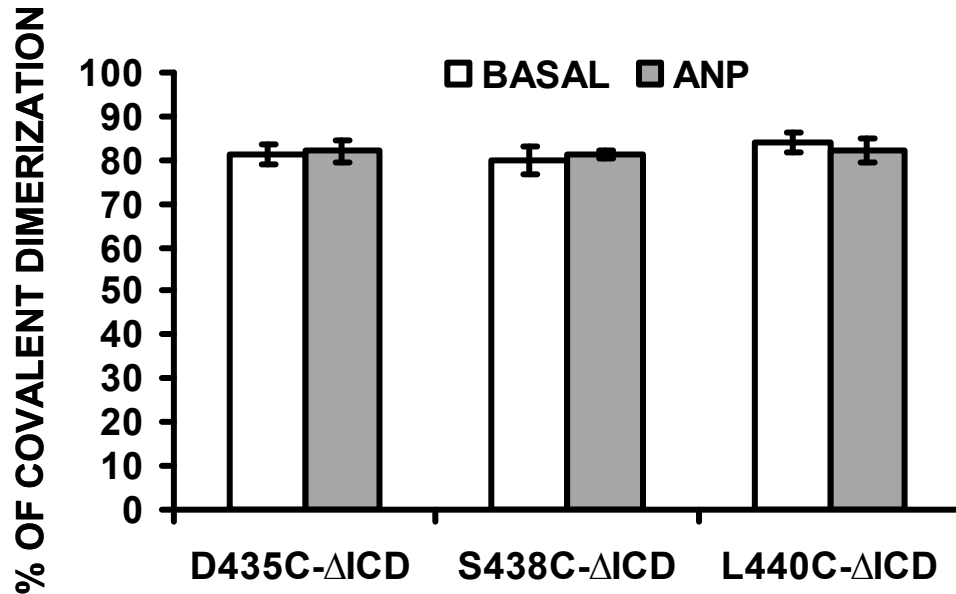


Figure 7.4: Covalent dimerization of NPRA cysteine mutants lacking their ICD. HEK293 cells transiently expressing Δ ICD cysteine mutants were untreated (white) or treated (gray) with 10^{-8} M rANP at 37°C for 30 min. Membranes (20-80 μ g) prepared from these cells in presence of NEM (to prevent nonspecific covalent dimerization) were loaded on a nonreducing 7,5% SDS-PAGE gel. Receptor monomers and covalent dimers were detected by Western blotting using a specific antibody as described in Materials and Methods and analyzed with a Typhoon Imager. Levels of receptor dimers and monomers were measured by densitometry with ImageQuant TL v2005 and were used to calculate covalent dimerization percentage. $N = 3$.

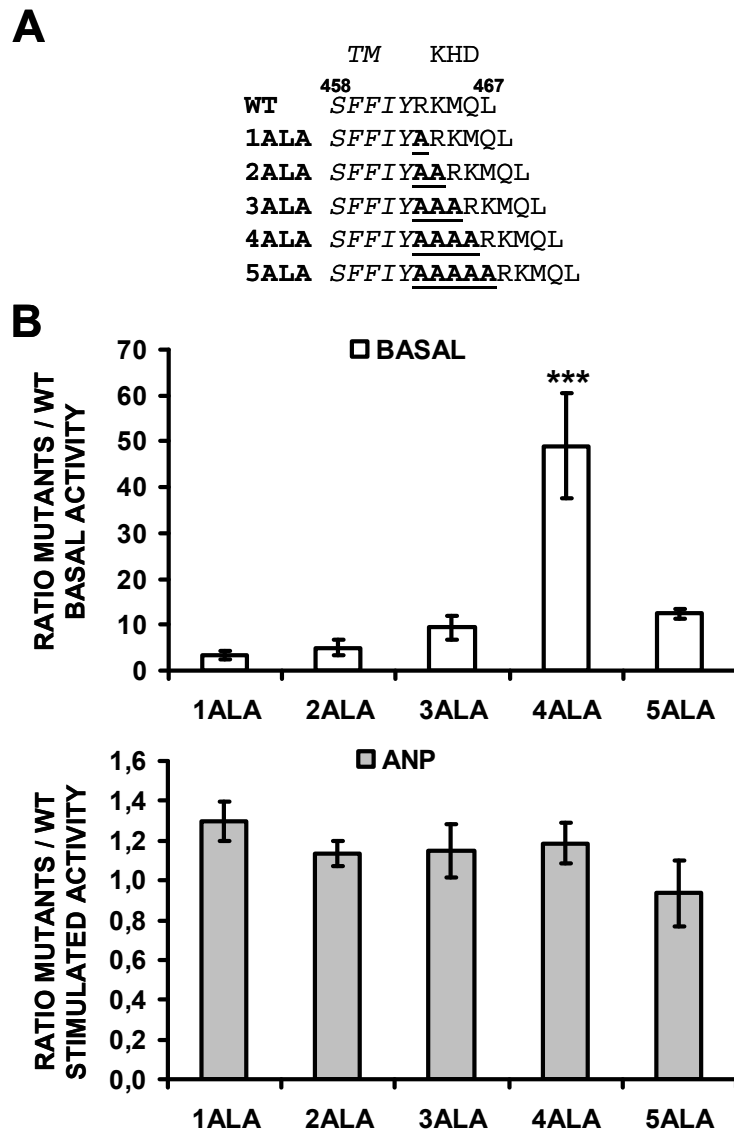


Figure 7.5: Effect of subunits rotation on NPRA guanylyl cyclase activity.

(A) Alanine residues (underlined) were sequentially introduced at the end of the TM after Y462 (*italicized*). (B) Guanylyl cyclase activity of NPRA alanine mutants. HEK293 cells transiently expressing WT NPRA or alanine mutants were untreated (white) or treated (gray) with 10^{-7} M rANP at 37°C for 1.5 h, as described under Materials and Methods. The level of cGMP accumulation was measured in the extracellular medium by radio-immunoassay. Results were normalized according to the maximal activation level of solubilized cells obtained in Triton and Mn^{2+} . The results are expressed as a ratio of mutants to WT NPRA activity under basal condition (white) or after stimulation by ANP (gray). $N = 5$. $P < 0.001$ (***) compared to the WT.

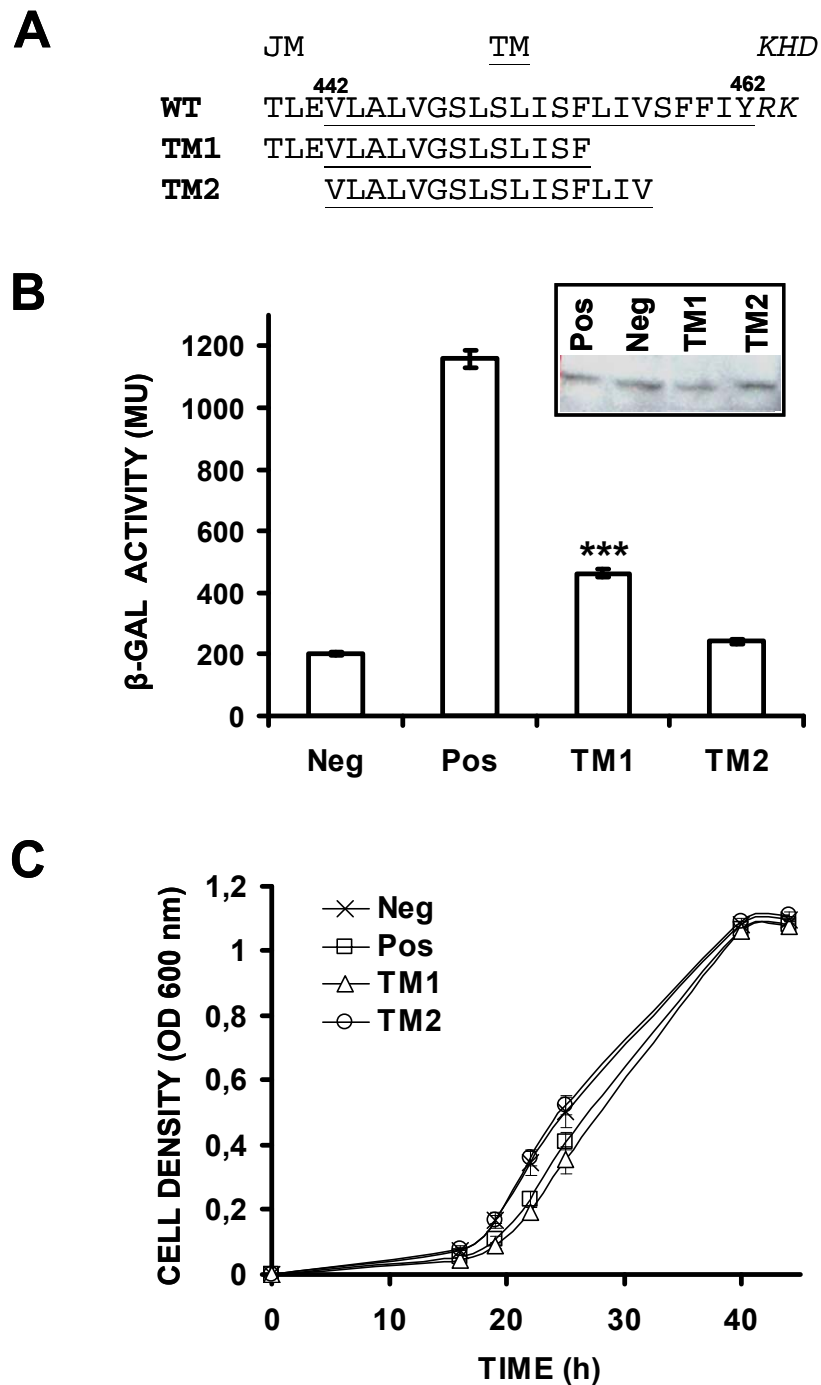


Figure 7.6: Homodimerization of NPRA TMs.

(A) Amino acid sequences of two NPRA TM segments (TM1 and TM2) as expressed in the context of the ToxR system. NPRA TM residues are underlined. (B) β -Galactosidase activity of the NPRA TM chimeras. β -Galactosidase activity was quantified in crude lysates of FHK12 bacteria expressing ToxR chimera as described in Materials and Methods. The GpA TM was used as a positive control for

homodimerization (Pos) and GpA G83A mutant which lacks the capacity to dimerize as a monomer control (Neg). $N = 20-28$. $P < 0.001$ (***) compared to the negative control (Neg). The inset shows the expression levels of the ToxR chimera proteins (70 kDa). FHK12 bacteria used in β -galactosidase activity experiment resuspended in sample buffer were loaded on a 10 % SDS-PAGE gel. ToxR constructs were detected using an anti-MBP antibody as described in Materials and Methods. The result is representative of five identical experiments. (C) Control for correct membrane integration. PD28 cells transformed with the ToxR constructs (Neg (\times), Pos (\square), TM1 (Δ), TM2 (\circ)) were grown in minimal medium containing maltose as the only carbon source. The cell density as monitored by optical density at 600 nm (OD_{600}) at different time points reflects the efficiency of membrane integration. Each data point represents the mean \pm S.E. of quadruplicate determinations. The results are representative of three identical experiments.

A

		<u>TM</u>	
	646		679
ErbB2	<i>QRASPLTSIISAVGILLVVLGVVFGILIKRRQ</i>		
NPRA	<i>NQDHFSTLEVLALVGSLSLISFLIVSFFIYRKMQ</i>		
	433		466

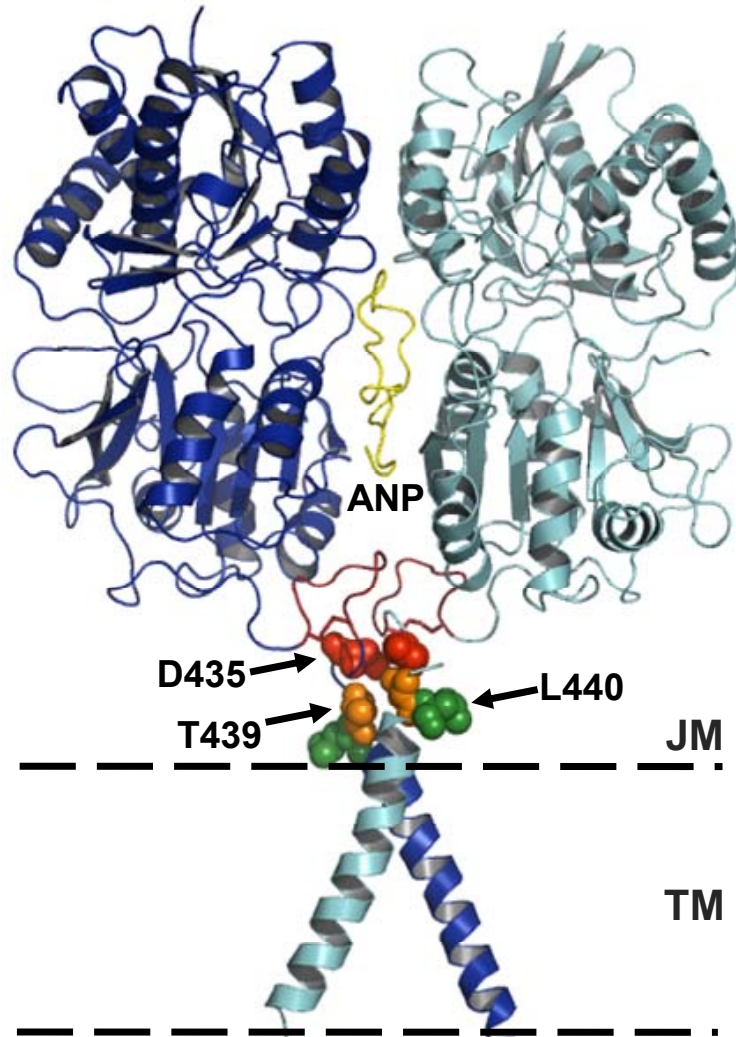
B

Figure 7.7: Model of the active conformation of NPRA ECD and TM.

(A) Amino acid sequence alignment of ErbB2 and NPRA TM obtained with 3D-COFFEE. Identical residues are in bold, and homologous residues are italicized. Transmembrane residues are underlined. (B) Modeling of the rNPRA ECD and TM in complex with ANP was conducted as described in Material and Methods. NPRA homodimer subunits (dark and light blue) and ANP (yellow) are shown in a ribbon

model using PyMol. Disulfide bridge loops C423-C432 are colored in dark red. JM domain residues expected to be in close proximity are indicated and shown in sphere model (D435 (light red), T439 (orange), and L440 (green)). The membrane double layer is shown as dashed lines.

**TROISIÈME PARTIE : DISCUSSION ET
CONCLUSION**

A. Discussion

Une des questions fondamentales dans le domaine de la signalisation des récepteurs membranaires est de comprendre comment la reconnaissance du ligand au niveau extracellulaire mène à l'activation d'un signal intracellulaire. Notre objectif principal a été d'essayer de répondre à cette question. Pour cela, nous avons étudié les mécanismes moléculaires régissant l'activation du NPRA. Nous nous sommes penchés particulièrement sur les premières étapes de ce processus, à savoir la stabilisation du dimère par la liaison de l'ANP et le mécanisme de transduction du signal à travers la membrane plasmique.

1. Rôle de la dimérisation du domaine extracellulaire dans l'activation du NPRA

Nous avons tout d'abord cherché à déterminer le rôle de la dimérisation du domaine extracellulaire dans l'activation du NPRA. En effet, l'état monomérique ou dimérique de l'ECD de NPRA à l'état de base était encore débattu. Il avait été rapporté, grâce à une technique de chromatographie d'exclusion, que l'ECD soluble de NPRA était monomérique, même à des concentrations micromolaires et qu'il ne dimérisait qu'en présence d'ANP (Misono, Sivasubramanian et al. 1999). Pourtant, une étude précédente avait démontré par co-immunoprécipitation qu'un monomère d'ECD soluble de NPRA était capable d'interagir avec un monomère de récepteur pleine-longueur (Chinkers and Wilson 1992). Les études cristallographiques de l'ECD soluble de NPRA en absence d'ANP ont également démontré que l'ECD forme un dimère avec une interface de dimérisation distale en absence de ligand (Misono, Ogawa et al. 2005). Nous avons, de plus, déterminé la séquence des étapes du processus de dimérisation de l'ECD qui n'avait encore jamais été définie.

Nous avons démontré au Chapitre 6 que le processus de liaison des peptides natriurétiques sur le NPRA ne correspond pas au modèle des récepteurs aux cytokines de type I illustré par le GHR. La famille des récepteurs aux cytokines affiche des similarités structurales avec les récepteurs aux peptides natriurétiques. Le GHR est un récepteur homodimérique constitué d'un ECD avec une interface de dimérisation limitée, mais avec des surfaces de liaison spécifiques pour lier la GH, un seul passage

transmembranaire, et un domaine cytoplasmique impliqué dans l'activation d'effecteurs en aval (de Vos, Ultsch et al. 1992). Pour certaines cytokines de type I et interférons, la liaison au récepteur est séquentielle. Le site I de la cytokine interagit d'abord avec une sous-unité de récepteur (Cunningham, Ultsch et al. 1991). Ce premier contact est alors suivi par l'interaction du site II du ligand avec une seconde sous-unité de récepteur, menant à la formation d'un complexe plus stable et à l'activation du récepteur (Cunningham and Wells 1993). Contrairement aux cytokines qui présentent une structure secondaire bien définie à l'état libre comme à l'état lié au récepteur, les peptides natriurétiques ont une structure désordonnée en solution (Carpenter, Wilkes et al. 1997). Leur conformation « active » est induite par l'interaction avec le récepteur (He, Dukkupati et al. 2005). Ils acquièrent alors une conformation plane pour s'ajuster étroitement dans la fente de liaison et se lier au récepteur avec haute affinité. Le fait que les cytokines aient déjà une conformation stable en solution pourrait expliquer pourquoi elles sont capables de lier un monomère de récepteur avec une affinité nanomolaire, alors que les peptides natriurétiques semblent se lier uniquement à un dimère préformé. Cette hypothèse est appuyée par nos expériences d'autoextinction de fluorescence par transfert d'énergie de résonance (FRET) qui montrent que pour les hautes concentrations en peptide, les courbes dose-réponse atteignent un plateau, indiquant qu'il n'y a pas de monomérisation du hNPRA-ECD donc pas de liaison des peptides natriurétiques à un monomère de récepteur. Ceci contraste avec les récepteurs aux cytokines, pour qui la dimérisation n'est favorisée qu'à faible concentration en cytokine. À haute concentration, 2 molécules de cytokine peuvent se lier au récepteur homodimérique, résultant à une monomérisation et à une perte d'activation (Cunningham, Ultsch et al. 1991). L'absence de renversement de la dimérisation à de hautes concentrations en peptides suggère fortement que les peptides natriurétiques, agonistes ou antagonistes se lient essentiellement à un ECD dimérique préformé. Il reste cependant à confirmer de manière directe que les peptides natriurétiques ne sont pas capables de se lier à un monomère de récepteur. L'immobilisation de l'ECD de NPRA sous sa forme monomérique pourrait permettre d'étudier la liaison de l'ANP au monomère. Pour le GHR, la liaison au monomère a été démontrée grâce à l'utilisation de la technologie BIAcore (Cunningham and Wells 1993).

La cinétique d'association de l'ANP à l'ECD^{WT} est caractérisée par un k_{on} général de $4 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ typique des interactions protéine-protéine (Schlosshauer and Baker 2004). Cependant, cette cinétique d'association ne correspond pas tout à fait à une réaction de second ordre, mais serait plutôt compatible avec un processus en 2 étapes. De plus, la cinétique d'association apparemment plus complexe de l'ANP à l'ECD^{WT} est également plus lente par rapport à l'ECD^{C423S} indiquant que la dimérisation spontanée constitue l'étape limitante du processus de liaison du ligand. Contrairement aux cytokines pour lesquelles la dimérisation de l'ECD augmente l'affinité pour le ligand en diminuant le k_{off} de la cytokine, la dimérisation de l'ECD de NPRA n'a pas d'effet sur la cinétique de dissociation de l'ANP (Cunningham, Ultsch et al. 1991; Lamken, Lata et al. 2004). En effet, l'ECD^{WT} et l'ECD^{C423S} montrent des cinétiques de dissociation très similaires, suggérant encore une fois que l'ANP se lie à un dimère d'ECD préformé. Nous avons par ailleurs fourni ici la première preuve de la formation de dimères spontanés à des concentrations nanomolaires d'ECD, grâce à la technique d'autoextinction de fluorescence que nous avons mise au point. Nos résultats sont en désaccord avec les résultats publiés précédemment (Misono, Sivasubramanian et al. 1999), démontrant, par chromatographie d'exclusion, que l'ECD reste sous forme monomérique même à des concentrations micromolaires. Ces différences de résultats pourraient s'expliquer par le fait que notre système de mesure de l'état dimérique est un système homogène, contrairement à la chromatographie d'exclusion. En effet, les systèmes impliquant des séparations de phase, comme la chromatographie d'exclusion, ne permettent pas de documenter des dimères spontanés dynamiquement instables. De nouvelles études de cinétiques de dimérisation et de liaison plus détaillées sont requises pour pouvoir caractériser le modèle en 2 étapes que nous avons proposé pour la liaison de l'ANP à l'ECD. Il est à noter que l'affinité de l'ANP pour l'ECD^{C423S} spontanément dimérique covalent est équivalente à celle observée pour le NPRA cellulaire pleine longueur ($K_d = 1,3 \times 10^{-10}$ vs $1,6 \times 10^{-10}$), ce qui suggère encore fortement que le NPRA est naturellement dimérique à la surface des cellules (Jewett, Koller et al. 1993).

Tous les peptides natriurétiques naturels et analogues testés induisent une auto-extinction de fluorescence dose-dépendante spécifique de la dimérisation du récepteur. De plus, l'ordre d'affinité des peptides pour le NPRA est hautement corrélé

avec leur capacité à induire la dimérisation, indiquant qu'une liaison de haute affinité implique un état dimérique de l'ECD de NPRA. Tous les peptides se lient donc à l'ECD dans son état dimérique, même l'antagoniste A71915. Ceci contraste avec les antagonistes de la GH qui lient le GHR dans sa forme monomérique et empêchent la dimérisation (Fuh, Cunningham et al. 1992). Nos résultats montrent que les maxima d'autoextinction de fluorescence diffèrent selon les ligands et plus particulièrement entre les agonistes et l'antagoniste. Ainsi, bien que tous les peptides se lient à la forme dimérique de l'ECD, la conformation des dimères d'ECD diffère selon les peptides. Des résultats similaires ont été obtenus pour l'EpoR. En effet, les agonistes et les antagonistes de l'Epo se lient également à la forme dimérique du récepteur, mais stabilisent le dimère dans des conformations différentes (Syed, Reid et al. 1998). L'agoniste pBNP32 induit un maximum d'autoextinction différent des autres agonistes, indiquant que la forme homodimérique « active » stabilisée par ce ligand est différente de celle stabilisée par l'ANP ou le BANP. Pour l'EpoR, il a été proposé que la différence de conformation induite par l'agoniste naturel Epo et l'agoniste mimétique EMP1 serait responsable de la différence d'efficacité des 2 peptides dans des essais de croissance cellulaire (Syed, Reid et al. 1998). Il a été démontré que le pBNP32 était plus efficace que l'ANP à induire la production de GMPc par le hNPR. La conformation dimérique différente stabilisée par le pBNP32 pourrait bien expliquer ce phénomène (Schoenfeld, Sehl et al. 1995). L'antagoniste A71915 induit le maximum d'autoextinction de fluorescence le plus élevé de tous les peptides testés. Cette différence, qui correspond à une distance plus faible entre les 2 sous unités d'ECD, pourrait être associée à une rotation axiale ou latérale des sous unités d'ECD, menant à une conformation inactive du récepteur. Notre modélisation de l'ECD de NPRA en complexe avec l'A71915 indique que malgré sa taille réduite de moitié par rapport à l'ANP, une seule molécule d'antagoniste peut s'ajuster dans la fente de liaison. De plus, les interactions cruciales entre la portion cyclique du peptide et le récepteur semblent conservées pour l'A71915, ce qui expliquerait le fait qu'il soit capable de stabiliser la forme dimérique de l'ECD. Cependant, le résidu D-Tic16 de l'A71915 ne s'ajuste pas correctement dans la poche hydrophobe 2 de l'ECD. Ceci pourrait expliquer les propriétés antagonistes de l'A71915. En effet, la substitution du D-Tic16 par le résidu naturel L-Phe16 dans le A71915 le transforme en un agoniste complet A68828 (von Geldern, Rockway et al. 1992). L'interaction inadéquate du D-

Tic16 avec la poche hydrophobe 2 pourrait également être associée à la conformation dimérique différente documentée par autoextinction de fluorescence. Ensemble, les résultats de cette étude suggèrent que la dimérisation du NPRA est nécessaire, mais non suffisante à l'activation du récepteur. L'association de deux monomères de récepteur induite par le ligand ne peut pas expliquer à elle seule l'activation du NPRA. Le mécanisme d'activation du récepteur semble plutôt impliquer un changement de conformation du dimère de récepteur préformé au niveau du domaine juxtamembranaire.

Nous avons mis au point un système homogène hautement sensible et précis basé sur le transfert d'énergie entre molécules fluorescentes (FRET, pour l'acronyme anglais "Fluorescence resonance energy transfer"), pour évaluer la dimérisation du NPRA, mais aussi l'affinité de liaison des ligands pour l'ECD, puisque la puissance des peptides à induire la dimérisation est hautement corrélée à leur affinité pour le récepteur. Ce système pourrait être un outil puissant pour détailler davantage les étapes de la cinétique de liaison et d'activation des récepteurs aux peptides natriurétiques. Il pourrait également être utile pour étudier les conformations spécifiques du récepteur aux agonistes et aux antagonistes. Enfin, il serait un outil de choix pour le criblage à haut débit de petites molécules agonistes ou antagonistes des récepteurs aux peptides natriurétiques.

Bien qu'observé par Perrin au début du XX^e siècle, le FRET a été décrit pour la première fois par Förster en 1946. Les applications de cette approche à l'étude des interactions protéiques n'apparaîtront que vers la fin du XX^e siècle (Selvin 2000). Puisque la plupart des fonctions cellulaires sont médiées par des complexes protéiques multimériques, la détermination des interactions protéine-protéine est une étape importante dans l'étude des mécanismes cellulaires. Traditionnellement, les interactions protéiques sont mises en évidence par des techniques de microscopie, comme la coimmunolocalisation et des essais d'interactions entre une protéine immobilisée et d'autres protéines, comme la coimmunoprécipitation ou le « GST pull down ». Cependant, la nature invasive de ces techniques altère l'état naturel des cellules et elles peuvent donc ne pas être représentatives d'une structure réelle. Ceci est d'autant plus critique pour les protéines membranaires qui doivent être extraites de la membrane avec un détergent. Durant la dernière décennie, les techniques de

transfert d'énergie par résonance (RET), comme le FRET et le BRET (Bioluminescence resonance energy transfer), ont été adaptées et optimisées pour permettre de mener des expériences d'interactions protéiques *in vivo* et en temps réel et d'ainsi surmonter la nature invasive des méthodes utilisées jusque-là. Le principe général du RET consiste en un transfert d'énergie non radiatif entre un chromophore à l'état excité appelé « donneur » et une molécule « accepteur » (Stryer 1978). En FRET, « donneur » et « accepteur » sont des molécules fluorescentes, alors qu'en BRET, le « donneur » est une enzyme qui catalyse un substrat qui devient fluorescent. L'efficacité de transfert d'énergie est inversement proportionnelle à la distance à la puissance 6 séparant les deux molécules, « donneur » et « accepteur ». La distance donneur - accepteur pour laquelle l'efficacité du transfert d'énergie est de 50% (R_0) dépend de la nature des fluorophores utilisés et est généralement comprise entre 1 et 10 nm (Stryer and Haugland 1967). L'interaction ou la distance entre 2 protéines peut donc être évaluée en mesurant la réduction de l'émission du donneur ou l'augmentation consécutive de la fluorescence de l'accepteur (Chan, Arndt-Jovin et al. 1979; Sokol, Zhang et al. 1998). Généralement, quand l'interaction entre 2 protéines d'intérêt est étudiée, ces dernières sont génétiquement fusionnées aux molécules « donneur » et « accepteur » ou détectées avec des anticorps spécifiques conjugués aux molécules « donneur » et « accepteur ». Le signal de RET peut être mesuré sur une population cellulaire à l'aide d'un fluorimètre ou à l'échelle subcellulaire en microscopie confocale. Cette dernière méthode permet d'ajouter une composante spatiale à l'étude des interactions protéine-protéine. La complémentation de fluorescence bimoléculaire (BiFC) est une autre technique basée sur la fluorescence permettant une visualisation directe des interactions protéine-protéine à l'échelle subcellulaire. La BiFC est basée sur la formation d'un complexe fluorescent à partir de 2 fragments non fluorescents séparés. Les fragments C- et N-terminaux de la protéine fluorescente Venus, sont fusionnées aux partenaires protéiques d'intérêts, l'interaction des 2 partenaires protéiques, qui permet l'association des 2 fragments de la protéine fluorescente, peut alors être suivie en microscopie confocale (Kerppola 2006).

Les techniques de transfert d'énergie de fluorescence, FRET ou BRET, et la BiFC se sont révélées des outils puissants pour étudier des interactions protéine-protéine aussi bien à l'intérieur de la cellule qu'à la surface cellulaire. Dans le

domaine des récepteurs couplés aux protéines G, ces approches ont révélé l'existence de récepteurs membranaires homo- ou hétérodimériques à la surface des cellules et ont contribué à mieux comprendre les mécanismes intervenant au cours de l'activation des protéines G (Gandia, Lluís et al. 2008). Elles ont également servi à étudier l'homo- ou l'hétérodimérisation de certains récepteurs à un seul passage transmembranaire comme EpoR, GHR, EGFR, IR et IGF-1R (Remy, Wilson et al. 1999; Brown, Adams et al. 2005; Blanquart, Achi et al. 2008; Tao and Maruyama 2008). Elles ont contribué à démontrer que l'association de 2 molécules de récepteur à un passage transmembranaire était insuffisante à induire l'activation du récepteur. En effet, certains de ces récepteurs existent sous forme préassociée à la surface des cellules (Brown, Adams et al. 2005; Tao and Maruyama 2008). Ces techniques pourraient être utilisées pour confirmer l'existence de dimères de NPRA préformé dans un contexte cellulaire.

Les techniques de transfert d'énergie de fluorescence intra- ou intermoléculaires sont des approches suffisamment sensibles pour mettre en évidence des changements conformationnels. Ceci est possible en incorporant les fluorophores donneur et accepteur à différentes positions de la protéine d'intérêt. Les points d'insertion sont choisis de manière à ce que les changements conformationnels, en modifiant la distance et/ou l'orientation des fluorophores, entraînent des modifications du transfert d'énergie (augmentation ou diminution). Le transfert d'énergie intramoléculaire a permis d'analyser les changements conformationnels intervenant au cours des processus d'activation des récepteurs membranaires. Ainsi, Vilardaga et collaborateurs ont analysé les réarrangements intracellulaires induits par la fixation de molécules agonistes et antagonistes au niveau des récepteurs β -2A-adrénergiques et des récepteurs aux hormones parathyroïdiennes (Vilardaga, Bunemann et al. 2003). Le même type d'analyses a permis d'étudier les changements conformationnels du récepteur aux androgènes (Schaufele, Carbonell et al. 2005). Le transfert d'énergie intermoléculaire a récemment permis d'étudier la cinétique de changement conformationnel du GHR induit par la GH (Biener-Ramanujan, Ramanujan et al. 2006) ou d'étudier le changement conformationnel ligand-dépendant du récepteur hybride IR/IGF-1R (Blanquart, Gonzalez-Yanes et al. 2006). Il a aussi permis de démontrer que les sous unités du récepteur à la cytokine IL-17 étaient pré-associées à la surface des cellules et que le complexe IL-17R subissait un

changement de conformation après liaison du ligand (Kramer, Yi et al. 2006). Cette approche pourrait être appliquée au NPRA pour étudier les changements de conformations induits par différents agonistes ou antagonistes au niveau du domaine intracellulaire du récepteur. De nombreuses sondes intracellulaires ont aussi été développées sur le principe de transfert d'énergie de fluorescence intramoléculaire. L'objectif de ces systèmes est de pouvoir révéler l'activation d'une voie de signalisation particulière en mesurant les variations de concentrations de différents seconds messagers. La première sonde fluorescente appelée caméléon a été développée par Miyawaki et collègues afin de mesurer les modifications de la concentration calcique à l'intérieur de la cellule (Miyawaki, Llopis et al. 1997). Suite à la fixation de quatre ions calcium au niveau de son domaine calmoduline, la sonde subit des changements conformationnels provoquant un rapprochement des fluorophores. L'augmentation du signal de FRET est dépendante de la production calcique intracellulaire. Il est ainsi possible de mesurer en temps réel, les variations de la concentration calcique à l'échelle subcellulaire. D'autres sondes ont aussi été développées pour mesurer notamment la concentration en GMPc. Ces sondes à GMPc contiennent les sites de liaison aux GMPc de la PKGI ou un site GAF de PDE2 ou PDE5, placés entre 2 fluorophores. La liaison du GMPc à la sonde induit une augmentation du signal de FRET. Le récent développement de protéines fluorescentes circulairement permuetées comme la cpGFP offre la possibilité de visualiser les changements conformationnels dans une protéine en la fusionnant simplement à une molécule de cpGFP. Cette méthode ne nécessite pas de mesure de RET mais est basée sur une augmentation de l'intensité de fluorescence de la cpGFP induite par le changement de conformation de la protéine qui lui est fusionnée (Nikolaev and Lohse 2009). La sonde à GMPc LincGs a été développée selon ce principe. Une molécule de cpGFP a été fusionnée aux 2 sites de liaison au GMPc de PKGI. La liaison du GMPc à ces 2 sites entraîne un changement de conformation qui se traduit alors par une augmentation de l'intensité de fluorescence de la cpGFP (Nausch, Ledoux et al. 2008). Cette sonde a notamment permis de démontrer une distribution spatio-temporelle différente du GMPc produit par les GC membranaires ou solubles. Ainsi, la technologie de transfert d'énergie par résonance n'est pas seulement un outil puissant pour étudier les interactions protéine-protéine, mais elle permet également d'étudier des changements de conformation en temps réel. Ce

serait donc un outil de choix pour étudier plus en détails les mécanismes moléculaires d'activation des récepteurs des peptides natriurétiques.

2. Rôle du domaine juxtamembranaire dans la transduction du signal induit par l'ANP

Une publication d'Ottemann et ses collaborateurs propose plusieurs modèles généraux de transduction de signal basés sur des mouvements hypothétiques au niveau de la région transmembranaire. Leurs modèles incluent des mécanismes d'association, de dissociation, de piston, de rotation, de ciseau et de bascule (**Figure 8.1**). Jusqu'à récemment, le consensus général prônait que la signalisation de la plupart des récepteurs à un seul passage transmembranaire était induite par un mécanisme d'association. La liaison du ligand rapproche les 2 monomères de récepteur, cette proximité induisant alors l'activation de l'enzyme effectrice. Cependant, plusieurs études récentes sur les récepteurs des cytokines et les récepteurs à activité tyrosine kinase ont contesté ce consensus et démontré que la dimérisation était requise, mais non suffisante pour l'activation du récepteur (Jiang and Hunter 1999). Premièrement, il a été démontré, par des techniques de liaison covalente croisée ou de transfert d'énergie de fluorescence (FRET), que beaucoup de ces récepteurs sont présents sous forme de dimère préassocié à la surface des cellules. C'est le cas par exemple de la famille des récepteurs de l'EGF (Moriki, Maruyama et al. 2001; Martin-Fernandez, Clarke et al. 2002; Tao and Maruyama 2008), de l'EpoR (Remy, Wilson et al. 1999; Lu, Gross et al. 2006) et du GHR (Brown, Adams et al. 2005). De plus certains récepteurs dimériques covalents, comme le mutant A653C de ErbB2, le récepteur à l'IGF-1 ou le récepteur à l'insuline sont inactifs en absence de ligand (Burke and Stern 1998; Jiang and Hunter 1999). Enfin, les antagonistes stabilisent la forme dimérique de certains de ces récepteurs, comme il a été observé pour l'antagoniste de l'EpoR EMP33 (Livnah, Johnson et al. 1998). L'activation de la plupart des récepteurs à un seul passage transmembranaire semble donc dépendre de l'orientation des sous-unités dans le dimère plutôt que de leur proximité. Quels sont les avantages pour un récepteur d'être préassemblés en dimère à la surface des cellules et de nécessiter d'une réorientation des sous-unités pour être activé ? La présence de dimères préassociés peut faciliter la formation subséquente de complexe

ligand-récepteur ce qui diminuerait le temps de réponse de la cellule à un stimuli. L'insuffisance d'une simple dimérisation pour l'activation du récepteur peut également servir de mécanisme de sureté pour empêcher l'activation accidentelle quand deux monomères de récepteurs entrent en collision durant leur diffusion à la surface cellulaire (Jiang and Hunter 1999).

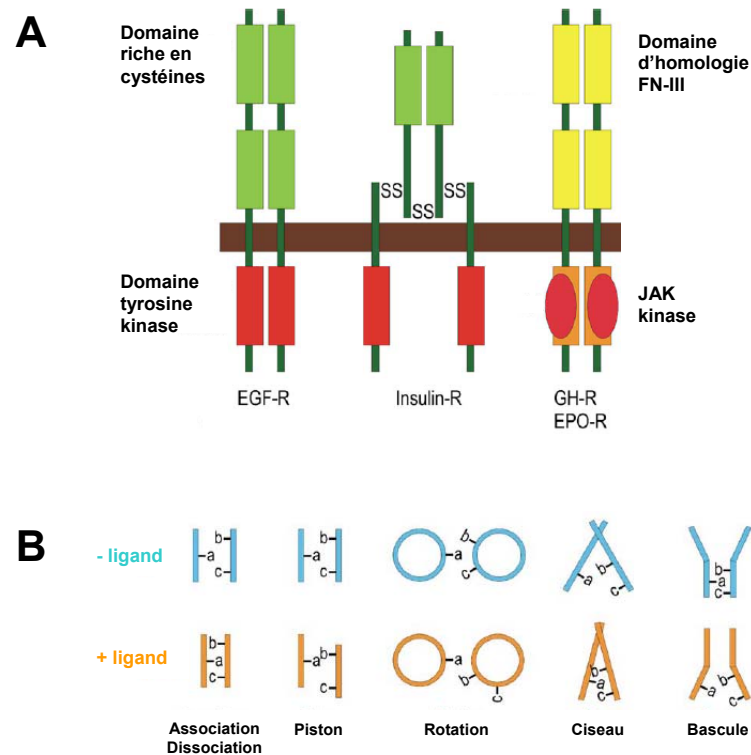


Figure 8.1 : Mécanismes potentiels de transduction du signal des récepteurs à 1 passage transmembranaire. **A**, Les récepteurs à un seul passage transmembranaire. Ils incluent la famille des récepteurs à tyrosine kinase (EGFR et IR) et les récepteurs des cytokines (GHR et EpoR) qui sont associés à la protéine kinase JAK. **B**, Modèles hypothétiques des changements de conformation impliqués dans la transduction du signal à travers la membrane chez les récepteurs à un seul passage transmembranaire. Ces modèles incluent des mécanismes d'association, de dissociation, de piston, de rotation, de ciseaux et de bascules. Modifié de (Misono, Ogawa et al. 2005).

Plusieurs études ont suggéré que le NPRA pleine-longueur était présent sous forme de dimères préassociés à la surface des cellules. Une étude de co-immunoprécipitation, a par exemple démontré que la présence ANP n'affectait pas les quantités de dimères de NPRA, suggérant ainsi que la dimérisation du récepteur

était indépendante du ligand (Chinkers and Wilson 1992). Il a également été démontré que les mutants W74C et C423S qui présentent une cystéine libre dans le lobe proximal et le lobe distal de l'ECD de NPRA, respectivement, étaient spontanément dimériques covalents (Labrecque, Mc Nicoll et al. 1999; De Lean, McNicoll et al. 2003). De plus, nous avons démontré ici que l'ANP se liait à un dimère d'ECD de NPRA préformé et que l'antagoniste A71915 stabilisait également une forme dimérique de l'ECD (Parat, McNicoll et al. 2008). La dimérisation du NPRA est donc requise, mais ne semble pas suffisante pour l'activation du récepteur.

Certaines études ont suggéré que le domaine juxtamembranaire extracellulaire (JM) qui relie l'ECD bilobé du NPRA au domaine transmembranaire (TM) jouait un rôle crucial dans le mécanisme de transduction du signal à travers la membrane plasmique. En effet, il a été rapporté que l'activation de NPRA par l'ANP augmente la sensibilité du domaine juxtamembranaire aux protéases (Huo, Abe et al. 1999). La mutation C423S, qui rompt une boucle intrachaîne reliée par un pont disulfure, mène à la fois à une activation constitutive du récepteur et à une dimérisation covalente via la cystéine libre C432 (Labrecque, Mc Nicoll et al. 1999). Cette activation a été ensuite attribuée au changement conformationnel occasionné par la rupture de la boucle plutôt qu'à la dimérisation covalente, puisque la double mutation C423S/C432S entraîne une activation constitutive du récepteur sans qu'il soit dimérique covalent (Huo, Abe et al. 1999). Cependant, la formation d'un pont disulfure de manière constitutive indique tout de même la proximité des domaines juxtamembranaires dans le dimère de NPRA. De plus, la mutation D435C, qui expose une cystéine libre 3 résidus en aval de la cystéine C432, conduit à la formation d'un dimère covalent seulement après la liaison de l'agoniste, indiquant qu'un changement de conformation, tel qu'une rotation ou une translation, a lieu suite à la liaison de l'ANP (Labrecque, Deschenes et al. 2001). Finalement, nos études de FRET avec l'ECD de NPRA dérivé à la position C423 suggèrent que l'ANP comme l'antagoniste A71915 stabilisent tous les 2 une forme dimérique de l'ECD où les régions juxtamembranaires sont à proximité, mais présentent des conformations différentes (Parat, McNicoll et al. 2008). Ceci supporte l'hypothèse que la conformation du domaine juxtamembranaire détermine l'état d'activation du NPRA.

Nous avons étudié, dans le chapitre 7, le changement de conformation du domaine juxtamembranaire induit par l'ANP en substituant séquentiellement chaque acide aminé du domaine juxtamembranaire par un résidu cystéine. En étudiant la capacité des mutants à former des dimères covalents de manière constitutive ou induite par l'ANP, nous avons pu évaluer la proximité des résidus du domaine juxtamembranaire avant et après activation du récepteur. En effet, la formation d'un pont disulfure implique une distance inférieure à 7 Å entre les C α des résidus cystéines. La formation d'un pont disulfure entre des cystéines distantes de plus de 7 Å nécessite quant à elle un mouvement du squelette de la protéine (Falke, Dernburg et al. 1988). Nous avons également mesuré l'activité guanylate cyclase de ces mutants au niveau de base et en présence d'ANP. Nous avons ainsi démontré qu'il n'y avait pas de corrélation entre la capacité des mutants à former des dimères covalents et leur niveau d'activité guanylate cyclase. Ceci indique que c'est l'orientation relative des 2 domaines juxtamembranaires dans le dimère de NPRA plutôt que leur proximité, qui détermine l'état d'activation du récepteur. De plus, l'étude de la capacité des mutants à former des dimères covalents en présence de l'agoniste A71915 nous a permis de confirmer dans un contexte de récepteur pleine longueur, que l'antagoniste stabilise une forme dimérique de NPRA où la conformation des domaines juxtamembranaires est différente de celle observée à l'état de base. Ceci confirme une fois de plus que l'état d'activation du récepteur est déterminé par l'orientation des sous-unités dans le dimère. Nos données d'études de dimérisation et d'activité des mutants cystéines suggèrent que la proximité des résidus D435 et L440 de chaque domaine juxtamembranaire est cruciale dans l'état activé du récepteur. Une étude précédente avait déjà démontré que le mutant D435C avait une activité basale plus élevée que le WT. De plus, le mutant semblait avoir une activation persistante après prétraitement à l'ANP qui entraîne normalement la désensibilisation du récepteur et une diminution de l'activité (Labrecque, Deschenes et al. 2001). Ces résultats suggéraient donc déjà que le pont disulfure entre les résidus D435C stabilisait un arrangement dimérique des 2 monomères correspondant à l'état actif du récepteur. Si le positionnement de la plupart des résidus du domaine juxtamembranaire semble discriminant après stimulation à l'ANP ou à l'antagoniste A71915, les mutants D435C et L440C montrent les mêmes profils de dimérisation avec les 2 peptides. Ces résultats semblent contredire notre hypothèse selon laquelle

la proximité des résidus D435 et L440 est cruciale pour l'activité du récepteur. Cependant, il a été démontré, lors de l'étude effectuée par les laboratoires Abotts pour trouver un antagoniste du NPRA, que l'antagoniste A71915 avait des propriétés d'agoniste partiel à 10 μM (concentration à laquelle nous avons effectué nos expériences de dimérisation covalente) (von Geldern, Budzik et al. 1990). La proximité des résidus D435 et L440 induite par l'A71915 pourrait donc être responsable de son activité agoniste partielle. La technique de balayage de cystéines a été souvent utilisée pour étudier le changement de conformation des récepteurs membranaires. Pour l'EpoR par exemple, cette méthode a permis de montrer que l'activation du récepteur dimérique par l'EPO était induite par une réorientation des domaines transmembranaires et des domaines cytosoliques et que certains dimères covalents étaient représentatifs de la conformation active du récepteur (Lu, Gross et al. 2006). Pour EGFR, elle a permis de conclure que la liaison de l'EGF induisait une rotation des domaines juxtamembranaires, puis des domaines transmembranaires, permettant aux domaines intracellulaires de prendre leur conformation active (Moriki, Maruyama et al. 2001). Cette technique nécessite l'expression de quantité supraphysiologique de récepteurs. On ne peut donc pas exclure, si le récepteur existe dans un équilibre monomère-dimère à un taux d'expression physiologique, que la surexpression ait un effet sur la dimérisation covalente observée (déplacement de l'équilibre vers la conformation dimérique). Dans nos expériences, la concentration du NPRA à la surface des cellules était de 7,5 à 15 fois plus élevée que la concentration physiologique retrouvée dans les cellules glomérulaires (De Lean, Vinay et al. 1985). Il est à noter que la dimérisation covalente de nos mutants a été obtenue sans aucune addition d'agents de liaison chimique. La dimérisation covalente ne dépendait alors que de l'accessibilité des groupements sulfhydryle et de la fréquence des fluctuations structurelles qui causent les collisions entre résidus réactifs (Falke, Dernburg et al. 1988).

Nos résultats d'étude de dimérisation covalente des mutants cystéines suggéraient que la conformation des domaines juxtamembranaires était contrainte à l'état de base et devenait plus flexible après la liaison de l'ANP. Nous avons donc cherché à savoir si le domaine intracellulaire pouvait avoir un rôle dans cette contrainte. L'étude de la dimérisation covalente de certains mutants cystéines

dépourvus de leur domaine intracellulaire nous a permis de montrer que le domaine intracellulaire était responsable de la contrainte conformationnelle exercée sur le domaine juxtamembranaire à l'état de base. Une étude précédente utilisant le mutant Δ ICD-D435C avait déjà suggéré ce phénomène (Labrecque, Deschenes et al. 2001). On pourrait se demander quelle partie du domaine intracellulaire est impliquée dans cette contrainte. Le KHD pourrait bien jouer ce rôle. Il a été démontré que le KHD jouait un rôle de régulateur négatif de l'activité guanylate cyclase à l'état de base. Sa suppression mène en effet à l'activation constitutive du récepteur (Chinkers and Garbers 1989; Koller, de Sauvage et al. 1992). Le KHD pourrait également avoir une influence sur la conformation du domaine extracellulaire. De façon intéressante, il a aussi été démontré que le domaine cytosolique de l'EGFR influence la conformation du domaine extracellulaire. En effet, le domaine cytoplasmique de l'EGFR régulerait négativement la dimérisation du domaine extracellulaire à l'état de base (Tanner and Kyte 1999). Récemment, il a également été suggéré que le domaine juxtamembranaire intracellulaire de l'EGFR jouait un rôle dans la capacité du récepteur à lier son ligand (Macdonald-Obermann and Pike 2009). Ainsi, pour le NPRA comme pour l'EGFR, le domaine cytoplasmique influence la conformation du domaine extracellulaire.

La signalisation transmembranaire de certains récepteurs à un seul passage transmembranaire semble impliquer un mécanisme de rotation (Bell, Tynan et al. 2000; Moriki, Maruyama et al. 2001; Brown, Adams et al. 2005; Lu, Gross et al. 2006). L'EpoR semble être activé par une combinaison de mouvement de ciseaux et de rotation des sous-unités (Jiang and Hunter 1999; Lu, Gross et al. 2006), alors que l'activation du GHR requiert une rotation relative des sous unités et un mouvement vertical (Brown, Adams et al. 2005). Un mécanisme de rotation a également été proposé pour EGFR et ErbB2 (Bell, Tynan et al. 2000; Moriki, Maruyama et al. 2001). Nous pouvons nous attendre à ce que le changement de conformation de l'ECD induit par l'ANP soit plus subtil que les changements de conformations observés pour les récepteurs aux cytokines. En effet, les cytokines sont de grosses protéines qui présentent une structure secondaire bien définie à l'état libre comme à l'état lié. Au contraire, les peptides natriurétiques sont des petits polypeptides avec une conformation désordonnée en solution et qui doivent acquérir une conformation

plane par sélection ou induction lorsque liés au NPRA (Carpenter, Wilkes et al. 1997). De plus, les études de cristallographie n'ont montré que des différences de conformations mineures entre les formes liée et non liée du NPRA, restreignant les options quant au mécanisme de transduction du signal à travers la membrane (Ogawa, Qiu et al. 2004). Ici, nous avons testé l'hypothèse d'un mécanisme de rotation. Pour ce faire, nous avons introduit de 1 à 5 résidus alanines à la fin du domaine transmembranaire du NPRA. En effet, chaque insertion d'alanine résulte en une rotation d'environ 100° puisque les oligomères d'alanines forment naturellement des hélices- α de 3,5 résidus par tour. Nous avons pu démontrer qu'une rotation des domaines transmembranaires de 40° induisait une activation constitutive du récepteur. Cette activation constitutive semble bien spécifique de l'angle de rotation, mais non du nombre d'alanines ajoutées, puisque seule l'insertion de 4 alanines, et non de 1, 2, 3 ou 5 alanines, mène à l'activation constitutive du récepteur. Cependant, cette activation rotation-dépendante n'est que partielle comparée à l'activation du récepteur WT par l'ANP ce qui suggère que la rotation n'est pas le seul mécanisme impliqué dans la transduction du signal. Nous avons aussi démontré que la proximité de certains résidus du domaine juxtamembranaire était cruciale pour l'activation du NPRA. Donc nous pouvons émettre l'hypothèse que la transduction du signal pourrait être la combinaison d'une rotation des sous unités et de mouvements de translation qui mettraient à proximité certains résidus cruciaux. Cette technique d'insertion d'alanines ou de valines pour documenter un mécanisme de rotation des domaines transmembranaires a également été utilisée pour le GHR et l'ErbB2 (Bell, Tynan et al. 2000; Brown, Adams et al. 2005). Pour le GHR, il a été démontré qu'une rotation des domaines transmembranaires de 40° induisait une activation constitutive maximale du récepteur.

Notre laboratoire avait originellement proposé un mécanisme de rotation basé sur l'observation d'une dimérisation covalente du mutant D435C pleine-longueur induite par le ligand (Labrecque, Deschenes et al. 2001). Ogawa et ses collègues ont par la suite confirmé le mécanisme de rotation proposé pour l'ECD de NPRA soluble avec des études de cristallographie (Ogawa, Qiu et al. 2004). Cependant, ce mécanisme de rotation est radicalement différent de celui que nous proposons ici. Dans le modèle d'Ogawa, la proximité des domaines juxtamembranaire n'est pas

prise en compte puisque ces derniers sont quasiment absents de la structure documentée. De plus, les axes centraux des sous unités d'ECD, incluant une partie du domaine juxtamembranaire, semblent s'éloigner l'un de l'autre suite à la liaison de l'ANP avec les résidus D435C distants d'environ 40 Å et pointant dans des directions opposées dans l'état actif du récepteur. Or, nous avons démontré ici que ses résidus étaient situés à une distance inférieure à 7 Å à l'état activé. Cette différence de résultats pourrait être expliquée par le fait que la conformation correcte du domaine juxtamembranaire est dépendante de son ancrage à la membrane. Bien que l'étude structurale du domaine extracellulaire soluble du NPRA soit instructive, elle n'est pas suffisante pour décrire le mécanisme d'activation du NPRA dans un contexte de récepteur membranaire pleine-longueur. Les mécanismes d'activation doivent être étudiés dans un contexte de récepteur pleine longueur, particulièrement pour le NPRA puisqu'il a été démontré que ses domaines extracellulaires et intracellulaires avaient des influences allostériques mutuelles. Nous avons en effet démontré ici que le domaine intracellulaire contraignait la conformation du domaine juxtamembranaire à l'état de base. Les agonistes surmontent cette contrainte, permettant alors l'initiation de l'activation. Le changement de conformation de l'ECD transmet au KHD par le TM, permet la liaison de l'ATP et l'activation de la guanylate cyclase mais augmente également le taux de dissociation de l'ANP (Larose, McNicoll et al. 1991; Duda, Venkataraman et al. 2005). Le jeu de contraintes mutuelles entre les domaines extracellulaire et intracellulaire semble orchestrer le mécanisme d'activation du NPRA.

Notre modèle prend en compte les domaines juxtamembranaires et transmembranaires du NPRA. Nous avons choisi le TM de ErbB2 comme modèle pour la modélisation par homologie du TM de NPRA car ErbB2 présente une topologie similaire au NPRA. De plus, la structure RMN du TM de ErbB2 montre une interface de dimérisation au début du TM à l'état actif ce qui semble également le cas pour le NPRA, comme le suggèrent nos résultats. Enfin, l'alignement des séquences en acides aminés des TM du NPRA et de ErbB2 démontre une homologie suffisante. La validité de ce modèle reste à être vérifiée expérimentalement. Une étude RMN de la structure du TM de NPRA pourrait donner des indices sur la conformation du TM. Le rôle du TM dans la dimérisation du NPRA n'avait jamais

été étudié auparavant. Nous avons utilisé le système simple et robuste ToxR pour évaluer l'habileté des TM de NPRA à dimériser *in vivo*. L'activateur transcriptionnel ToxR peut être utilisé avec succès pour mettre en évidence des interactions TM-TM, même faibles, dans les membranes de *E. Coli*. Les TM étudiés sont insérés entre une protéine de liaison du maltose périplasmique et une protéine ToxR cytoplasmique. La dimérisation des TM induit alors une association des activateurs de transcription ToxR, qui peuvent alors activer la transcription du gène de la β -galactosidase. La quantification du niveau de dimérisation des TM est obtenue en mesurant l'activité β -galactosidase. Grâce à cette méthode, nous avons démontré que les résidus T439, L440 et E441 étaient requis et suffisants pour stabiliser le dimère de TM. Ceci confirme les résultats obtenus avec les mutants cystéines, qui démontraient la proximité de ces résidus dans le dimère de NPRA pleine-longueur. Les autres résidus du TM ne semblent pas intervenir dans la dimérisation du récepteur. Le système ToxR a été utilisé pour étudier le rôle des TM dans la dimérisation d'autres récepteurs à 1 seul passage transmembranaire (EpoR, ErbB2, GHR). Il a également permis d'identifier les résidus spécifiques impliqués dans cette dimérisation (Gerber, Sal-Man et al. 2004; Ruan, Becker et al. 2004; Lichanska and Waters 2008).

Notre modèle illustre la structure active du NPRA. Évidemment, ce modèle n'est qu'une image instantanée, alors que les mécanismes d'activations sont des processus dynamiques. Des études récentes suggèrent que les GPCR existent dans une multitude de conformations actives dépendantes du ligand et qu'il existe de multiples intermédiaires conformationnels entre l'état basal et l'état actif maximal (Kobilka and Deupi 2007). Ce concept pourrait être appliqué aux récepteurs à un seul passage transmembranaire. En effet, il a été démontré par cristallographie que l'agoniste naturel Epo et l'agoniste mimétique EMP1 induisent un changement de conformation différent de l'EpoR (Jiang and Hunter 1999). De même, nos études de FRET ont démontré que la conformation du dimère d'ECD de NPRA diffère selon l'agoniste (Parat, McNicoll et al. 2008). Le concept traditionnel d'une conformation active et d'une conformation inactive est probablement une simplification de ce qu'est en réalité le mécanisme de transduction du signal du NPRA.

Le processus d'activation du NPRA est couramment divisé en 2 étapes. 1) La liaison de l'ANP induit un changement conformationnel au niveau du domaine juxtamembranaire, sans doute transmis à travers la membrane par une rotation des domaines transmembranaires. Cette rotation permet alors la liaison de l'ATP au KHD, peut-être en exposant les sites de liaison de l'ATP. 2) La liaison de l'ATP induit un autre changement de conformation qui est transmis par le domaine de dimérisation en hélice enroulée qui connecte le KHD au domaine guanylate cyclase. Le changement conformationnel qui a lieu au niveau du domaine intracellulaire reste à être élucidé. Ce pourrait être une rotation axiale ou un mouvement latéral, qui induirait une pleine activation de la GC. Une documentation cristallographique de la structure de l'ICD pourrait fournir d'avantage d'indices sur la transduction du signal du NPRA. Ici, nous avons identifié un mécanisme plausible illustrant la transduction du signal à travers la membrane, qui pourrait s'appliquer aux autres GC membranaires et contribuer à une meilleure compréhension des autres récepteurs à un seul passage transmembranaire. La génération d'un modèle moléculaire du NPRA dans son état basal est également requise pour pouvoir mettre en évidence le changement de conformation du domaine juxtamembranaire induit par l'ANP.

B. Conclusion

Depuis la découverte de l'ANP il y a plus de 25 ans, les peptides natriurétiques ont été le centre d'intérêt de nombreux travaux. Leur rôle dans l'homéostasie cardiovasculaire en condition physiologique ou pathologique a fait l'objet de recherches détaillées et a abouti à la mise sur le marché de 2 formes recombinantes de l'ANP et du BNP, Anaritide et Nesiritide, pour le traitement de l'insuffisance cardiaque. Plus récemment, la technologie de ciblage des gènes chez la souris a fourni de nouvelles informations sur les fonctions physiologiques diverses des peptides natriurétiques et de leurs récepteurs et sur leur potentielle implication dans certaines maladies humaines. La technologie Cre/Lox de ciblage tissu-spécifique des gènes a par ailleurs permis de décortiquer le rôle physiologique de chaque membre de cette famille dans un tissu donné. Elle a également permis de montrer que les peptides natriurétiques ne se limitent pas à une action endocrine classique, mais montrent également plusieurs effets paracrine et/ou autocrine en condition

physiologique ou pathologique. Le détail des voies de signalisation impliquées dans les effets physiologiques des peptides natriurétiques reste à être découvert. Un nouveau degré de complexité est venu s'ajouter avec la découverte d'une signalisation indépendante du GMPc médiée par le NPRC. Plusieurs récepteurs transmembranaires utilisent dans certains tissus des voies de signalisation alternatives pour médier une réponse spécifique au stimulus. Il serait envisageable que le NPRA et le NPRB puissent aussi médier certaines réponses cellulaires par l'entremise d'une voie alternative à celle passant par le second messager GMPc.

Le clonage et l'expression des récepteurs des peptides natriurétiques ont permis la caractérisation de leur topologie générale et de leur spécificité de liaison. Les structures des domaines extracellulaires de NPRA et NPRC complexés ou non avec leur ligand ont également été déterminées par cristallographie. Beaucoup d'efforts ont été fournis pour faire la lumière sur les mécanismes d'activation et de régulation de ces récepteurs. Bien qu'un mécanisme général ait été proposé, très peu de choses étaient connues jusqu'à maintenant quant aux mécanismes moléculaires régissant le processus d'activation. Nos études apportent de nouvelles informations sur les mécanismes moléculaires régissant les premières étapes du mécanisme d'activation du NPRA. Nous avons démontré que les ligands du NPRA, agonistes et antagonistes, se lient à une forme dimérique de l'ECD et que la pré-association du dimère est l'étape limitante du processus de liaison. Nous avons par ailleurs établi que la dimérisation du NPRA était nécessaire, mais non suffisante à l'activation du récepteur. L'état d'activation du récepteur dépend de l'orientation des sous unités du récepteur, et plus particulièrement de la conformation du domaine juxtamembranaire, dans le dimère de NPRA. Nous avons confirmé que la liaison du ligand entraîne un changement de conformation du domaine juxtamembranaire et identifié les résidus dont la proximité est cruciale à l'activation du récepteur. Ces résultats nous ont permis d'élaborer le premier modèle moléculaire du NPRA à l'état activé, où les domaines juxtamembranaire et transmembranaire sont représentés. Nous avons de plus mis en évidence que le domaine intracellulaire impose une contrainte conformationnelle au domaine juxtamembranaire à l'état de base et que cette contrainte est levée suite à la liaison du ligand. Enfin, nos résultats suggèrent que le signal d'activation induit par la liaison du ligand pourrait être transmis à travers la

membrane plasmique par un mécanisme de rotation des domaines transmembranaires. Ainsi, nous commençons à avoir une idée plus précise des évènements précoces du mécanisme d'activation du NPRA au niveau extracellulaire, cependant, peu d'informations documentent les étapes intermédiaires et finales qui ont lieu au niveau intracellulaire. Il serait important de connaître l'effet de la liaison de l'ATP sur la conformation globale du récepteur par exemple ou de déterminer le mécanisme de transmission du signal entre le KHD et le domaine guanylate cyclase. Des informations structurales sur le domaine intracellulaire du NPRA sont requises pour pouvoir caractériser les évènements plus tardifs du mécanisme d'activation.

La caractérisation des mécanismes moléculaires d'activation des récepteurs des peptides natriurétiques serait intéressante pour établir un design rationnel de molécules agonistes ou antagonistes. L'identification des kinases et phosphatases impliquées dans le mécanisme de désensibilisation du récepteur pourrait également être d'un grand intérêt thérapeutique. En tant que médiateurs hormonaux et/ou paracrines/autocrines régulant la pression sanguine, le remodelage cardiovasculaire, la lipolyse et la croissance des os longs, les peptides natriurétiques présentent un potentiel thérapeutique prometteur. Ils pourraient être utiles dans le traitement de l'hypertension systémique et pulmonaire, de l'obésité, de l'insuffisance cardiaque ou des désordres de la croissance osseuse. Cependant, le développement thérapeutique de ces peptides pourrait bien être limité par le besoin d'une forme orale ayant une demi-vie augmentée.

Références

- Abbey-Hosch, S. E., A. N. Cody, et al. (2004). "Sphingosine-1-phosphate inhibits C-type natriuretic peptide activation of guanylyl cyclase B (GC-B/NPR-B)." *Hypertension* **43**(5): 1103-9.
- Abbey, S. E. and L. R. Potter (2002). "Vasopressin-dependent inhibition of the C-type natriuretic peptide receptor, NPR-B/GC-B, requires elevated intracellular calcium concentrations." *J Biol Chem* **277**(45): 42423-30.
- Abbey, S. E. and L. R. Potter (2003). "Lysophosphatidic acid inhibits C-type natriuretic peptide activation of guanylyl cyclase-B." *Endocrinology* **144**(1): 240-6.
- Agoston, H., S. Khan, et al. (2007). "C-type natriuretic peptide regulates endochondral bone growth through p38 MAP kinase-dependent and -independent pathways." *BMC Dev Biol* **7**: 18.
- Airhart, N., Y. F. Yang, et al. (2003). "Atrial natriuretic peptide induces natriuretic peptide receptor-cGMP-dependent protein kinase interaction." *J Biol Chem* **278**(40): 38693-8.
- Almeida, F. A., M. Suzuki, et al. (1986). "Atrial natriuretic factor increases hematocrit and decreases plasma volume in nephrectomized rats." *Life Sci* **39**(13): 1193-9.
- Anand-Srivastava, M. B. (2005). "Natriuretic peptide receptor-C signaling and regulation." *Peptides* **26**(6): 1044-59.
- Anand-Srivastava, M. B. and M. Cantin (1986). "Atrial natriuretic factor receptors are negatively coupled to adenylate cyclase in cultured atrial and ventricular cardiocytes." *Biochem Biophys Res Commun* **138**(1): 427-36.
- Anand-Srivastava, M. B., M. R. Sairam, et al. (1990). "Ring-deleted analogs of atrial natriuretic factor inhibit adenylate cyclase/cAMP system. Possible coupling of clearance atrial natriuretic factor receptors to adenylate cyclase/cAMP signal transduction system." *J Biol Chem* **265**(15): 8566-72.
- Anand-Srivastava, M. B., P. D. Sehl, et al. (1996). "Cytoplasmic domain of natriuretic peptide receptor-C inhibits adenylyl cyclase. Involvement of a pertussis toxin-sensitive G protein." *J Biol Chem* **271**(32): 19324-9.
- Anand-Srivastava, M. B., A. K. Srivastava, et al. (1987). "Pertussis toxin attenuates atrial natriuretic factor-mediated inhibition of adenylate cyclase. Involvement of inhibitory guanine nucleotide regulatory protein." *J Biol Chem* **262**(11): 4931-4.
- Antunes-Rodrigues, J., S. M. McCann, et al. (1985). "Atrial natriuretic factor inhibits dehydration- and angiotensin II-induced water intake in the conscious, unrestrained rat." *Proc Natl Acad Sci U S A* **82**(24): 8720-3.
- Aoi, N., M. Soma, et al. (2004). "Variable number of tandem repeat of the 5'-flanking region of type-C human natriuretic peptide receptor gene influences blood pressure levels in obesity-associated hypertension." *Hypertens Res* **27**(10): 711-6.
- Baehr, W., S. Karan, et al. (2007). "The function of guanylate cyclase 1 and guanylate cyclase 2 in rod and cone photoreceptors." *J Biol Chem* **282**(12): 8837-47.
- Banner, D. W., A. D'Arcy, et al. (1993). "Crystal structure of the soluble human 55 kd TNF receptor-human TNF beta complex: implications for TNF receptor activation." *Cell* **73**(3): 431-45.

- Barbee, R. W., B. D. Perry, et al. (1994). "Hemodynamics in transgenic mice with overexpression of atrial natriuretic factor." Circ Res **74**(4): 747-51.
- Barber, M. N., T. A. Gaspari, et al. (2005). "Atrial natriuretic peptide preserves endothelial function during intimal hyperplasia." J Vasc Res **42**(2): 101-10.
- Barrett, P. Q. and C. M. Isales (1988). "The role of cyclic nucleotides in atrial natriuretic peptide-mediated inhibition of aldosterone secretion." Endocrinology **122**(3): 799-808.
- Bartels, C. F., H. Bukulmez, et al. (2004). "Mutations in the transmembrane natriuretic peptide receptor NPR-B impair skeletal growth and cause acromesomelic dysplasia, type Maroteaux." Am J Hum Genet **75**(1): 27-34.
- Beige, J., J. Ringel, et al. (1997). "HpaII-polymorphism of the atrial-natriuretic-peptide gene and essential hypertension in whites." Am J Hypertens **10**(11): 1316-8.
- Bell, C. A., J. A. Tynan, et al. (2000). "Rotational coupling of the transmembrane and kinase domains of the Neu receptor tyrosine kinase." Mol Biol Cell **11**(10): 3589-99.
- Bennett, B. D., G. L. Bennett, et al. (1991). "Extracellular domain-IgG fusion proteins for three human natriuretic peptide receptors. Hormone pharmacology and application to solid phase screening of synthetic peptide antisera." J Biol Chem **266**(34): 23060-7.
- Biel, M. and S. Michalakis (2009). "Cyclic nucleotide-gated channels." Handb Exp Pharmacol(191): 111-36.
- Biener-Ramanujan, E., V. K. Ramanujan, et al. (2006). "Spatio-temporal kinetics of growth hormone receptor signaling in single cells using FRET microscopy." Growth Horm IGF Res **16**(4): 247-57.
- Blanquart, C., J. Achi, et al. (2008). "Characterization of IRA/IRB hybrid insulin receptors using bioluminescence resonance energy transfer." Biochem Pharmacol **76**(7): 873-83.
- Blanquart, C., C. Gonzalez-Yanes, et al. (2006). "Monitoring the activation state of insulin/insulin-like growth factor-1 hybrid receptors using bioluminescence resonance energy transfer." Mol Pharmacol **70**(5): 1802-11.
- Bocciardi, R., R. Giorda, et al. (2007). "Overexpression of the C-type natriuretic peptide (CNP) is associated with overgrowth and bone anomalies in an individual with balanced t(2;7) translocation." Hum Mutat **28**(7): 724-31.
- Bodart, V., W. E. Rainey, et al. (1996). "The H295R human adrenocortical cell line contains functional atrial natriuretic peptide receptors that inhibit aldosterone biosynthesis." Mol Cell Endocrinol **118**(1-2): 137-44.
- Brown, J., Q. Chen, et al. (1997). "An autocrine system for C-type natriuretic peptide within rat carotid neointima during arterial repair." Am J Physiol **272**(6 Pt 2): H2919-31.
- Brown, R. J., J. J. Adams, et al. (2005). "Model for growth hormone receptor activation based on subunit rotation within a receptor dimer." Nat Struct Mol Biol **12**(9): 814-21.
- Bruneau, B. G. and A. J. de Bold (1994). "Selective changes in natriuretic peptide and early response gene expression in isolated rat atria following stimulation by stretch or endothelin-1." Cardiovasc Res **28**(10): 1519-25.
- Bryan, P. M. and L. R. Potter (2002). "The atrial natriuretic peptide receptor (NPR-A/GC-A) is dephosphorylated by distinct microcystin-sensitive and magnesium-dependent protein phosphatases." J Biol Chem **277**(18): 16041-7.

- Bryan, P. M., D. Smirnov, et al. (2006). "A Sensitive Method for Determining the Phosphorylation Status of Natriuretic Peptide Receptors: cGK-I α Does Not Regulate NPR-A." Biochemistry **45**(4): 1295-1303.
- Burke, C. L. and D. F. Stern (1998). "Activation of Neu (ErbB-2) mediated by disulfide bond-induced dimerization reveals a receptor tyrosine kinase dimer interface." Mol Cell Biol **18**(9): 5371-9.
- Burnett, J. C., Jr. (2006). "Novel therapeutic directions for the natriuretic peptides in cardiovascular diseases: what's on the horizon." J Cardiol **48**(5): 235-41.
- Cahill, P. A. and A. Hassid (1991). "Clearance receptor-binding atrial natriuretic peptides inhibit mitogenesis and proliferation of rat aortic smooth muscle cells." Biochem Biophys Res Commun **179**(3): 1606-13.
- Cao, L. and D. G. Gardner (1995). "Natriuretic peptides inhibit DNA synthesis in cardiac fibroblasts." Hypertension **25**(2): 227-34.
- Carpenter, K. A., B. C. Wilkes, et al. (1997). "Hydrophobic forces are responsible for the folding of a highly potent natriuretic peptide analogue at a membrane mimetic surface: an NMR study." Biopolymers **42**(1): 37-48.
- Carstens, J., K. T. Jensen, et al. (1998). "Metabolism and action of urodilatin infusion in healthy volunteers." Clin Pharmacol Ther **64**(1): 73-86.
- Casco, V. H., J. P. Veinot, et al. (2002). "Natriuretic peptide system gene expression in human coronary arteries." J Histochem Cytochem **50**(6): 799-809.
- Cataliotti, A., H. H. Chen, et al. (2008). "Chronic actions of a novel oral B-type natriuretic peptide conjugate in normal dogs and acute actions in angiotensin II-mediated hypertension." Circulation **118**(17): 1729-36.
- Cataliotti, A., J. A. Schirger, et al. (2005). "Oral human brain natriuretic peptide activates cyclic guanosine 3',5'-monophosphate and decreases mean arterial pressure." Circulation **112**(6): 836-40.
- Chan, J. C., O. Knudson, et al. (2005). "Hypertension in mice lacking the proatrial natriuretic peptide convertase corin." Proc Natl Acad Sci U S A **102**(3): 785-90.
- Chan, S. S., D. J. Arndt-Jovin, et al. (1979). "Proximity of lectin receptors on the cell surface measured by fluorescence energy transfer in a flow system." J Histochem Cytochem **27**(1): 56-64.
- Chang, F. J., S. Lemme, et al. (2005). "Nitric oxide-dependent allosteric inhibitory role of a second nucleotide binding site in soluble guanylyl cyclase." J Biol Chem **280**(12): 11513-9.
- Chartier, L., E. Schiffrin, et al. (1984). "Atrial natriuretic factor inhibits the stimulation of aldosterone secretion by angiotensin II, ACTH and potassium in vitro and angiotensin II-induced steroidogenesis in vivo." Endocrinology **115**(5): 2026-8.
- Chauhan, S. D., H. Nilsson, et al. (2003). "Release of C-type natriuretic peptide accounts for the biological activity of endothelium-derived hyperpolarizing factor." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(3): 1426-31.
- Chen, H. H., J. G. Lainchbury, et al. (2002). "Natriuretic peptide receptors and neutral endopeptidase in mediating the renal actions of a new therapeutic synthetic natriuretic peptide dendroaspis natriuretic peptide." J Am Coll Cardiol **40**(6): 1186-91.
- Chen, Z. J., D. L. Song, et al. (2001). "Proteolytic activation of membrane-bound guanylate cyclase." Biochem Pharmacol **61**(7): 915-20.

- Chikuda, H., F. Kugimiya, et al. (2004). "Cyclic GMP-dependent protein kinase II is a molecular switch from proliferation to hypertrophic differentiation of chondrocytes." Genes Dev **18**(19): 2418-29.
- Chinkers, M. (1994). "Targeting of a distinctive protein-serine phosphatase to the protein kinase-like domain of the atrial natriuretic peptide receptor." Proc Natl Acad Sci U S A **91**(23): 11075-9.
- Chinkers, M. and D. L. Garbers (1989). "The protein kinase domain of the ANP receptor is required for signaling." Science **245**(4924): 1392-4.
- Chinkers, M., S. Singh, et al. (1991). "Adenine nucleotides are required for activation of rat atrial natriuretic peptide receptor/guanylyl cyclase expressed in a baculovirus system." J Biol Chem **266**(7): 4088-93.
- Chinkers, M. and E. M. Wilson (1992). "Ligand-independent oligomerization of natriuretic peptide receptors. Identification of heteromeric receptors and a dominant negative mutant." J Biol Chem **267**(26): 18589-97.
- Chun, T. H., H. Itoh, et al. (1997). "Shear stress augments expression of C-type natriuretic peptide and adrenomedullin." Hypertension **29**(6): 1296-302.
- Chusho, H., N. Tamura, et al. (2001). "Dwarfism and early death in mice lacking C-type natriuretic peptide." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(7): 4016-21.
- Chusho, H., N. Tamura, et al. (2001). "Dwarfism and early death in mice lacking C-type natriuretic peptide." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(7): 4016-21.
- Clavell, A. L., A. J. Stingo, et al. (1993). "C-type natriuretic peptide: a selective cardiovascular peptide." Am J Physiol **264**(2 Pt 2): R290-5.
- Cody, R. J., S. A. Atlas, et al. (1986). "Atrial natriuretic factor in normal subjects and heart failure patients. Plasma levels and renal, hormonal, and hemodynamic responses to peptide infusion." J Clin Invest **78**(5): 1362-74.
- Cohen, D., G. Y. Koh, et al. (1996). "Molecular determinants of the clearance function of type C receptors of natriuretic peptides." J Biol Chem **271**(16): 9863-9.
- Collins, E., M. P. Bracamonte, et al. (2000). "Mechanism of relaxations to dendroaspis natriuretic peptide in canine coronary arteries." J Cardiovasc Pharmacol **35**(4): 614-8.
- Colucci, W. S., U. Elkayam, et al. (2000). "Intravenous nesiritide, a natriuretic peptide, in the treatment of decompensated congestive heart failure. Nesiritide Study Group." N Engl J Med **343**(4): 246-53.
- Cornwell, T. L., K. B. Pryzwansky, et al. (1991). "Regulation of sarcoplasmic reticulum protein phosphorylation by localized cyclic GMP-dependent protein kinase in vascular smooth muscle cells." Mol Pharmacol **40**(6): 923-31.
- Cunningham, B. C., D. G. Lowe, et al. (1994). "Production of an atrial natriuretic peptide variant that is specific for type A receptor." EMBO J **13**(11): 2508-15.
- Cunningham, B. C., M. Ultsch, et al. (1991). "Dimerization of the extracellular domain of the human growth hormone receptor by a single hormone molecule." Science **254**(5033): 821-5.
- Cunningham, B. C. and J. A. Wells (1993). "Comparison of a structural and a functional epitope." J Mol Biol **234**(3): 554-63.
- Currie, M. G., K. F. Fok, et al. (1992). "Guanylin: an endogenous activator of intestinal guanylate cyclase." Proc Natl Acad Sci U S A **89**(3): 947-51.
- Currie, M. G., D. M. Geller, et al. (1984). "Purification and sequence analysis of bioactive atrial peptides (atriopeptins)." Science **223**(4631): 67-9.

- D'Souza, S. P., M. Davis, et al. (2004). "Autocrine and paracrine actions of natriuretic peptides in the heart." Pharmacol Ther **101**(2): 113-29.
- de Bold, A. J., H. B. Borenstein, et al. (1981). "A rapid and potent natriuretic response to intravenous injection of atrial myocardial extract in rats." Life Sci **28**(1): 89-94.
- De Lean, A., N. McNicoll, et al. (2003). "Natriuretic peptide receptor A activation stabilizes a membrane-distal dimer interface." J Biol Chem **278**(13): 11159-66.
- De Lean, A., K. Racz, et al. (1984). "Specific receptor-mediated inhibition by synthetic atrial natriuretic factor of hormone-stimulated steroidogenesis in cultured bovine adrenal cells." Endocrinology **115**(4): 1636-8.
- De Lean, A., G. Thibault, et al. (1985). "Structure-activity relationships of atrial natriuretic factor (ANF). III. Correlation of receptor affinity with relative potency on aldosterone production in zona glomerulosa cells." Biochem Biophys Res Commun **132**(1): 360-7.
- De Lean, A., P. Vinay, et al. (1985). "Distribution of atrial natriuretic factor receptors in dog kidney fractions." FEBS Lett **193**(2): 239-42.
- de Vos, A. M., M. Ultsch, et al. (1992). "Human growth hormone and extracellular domain of its receptor: crystal structure of the complex." Science **255**(5042): 306-12.
- Delporte, C., J. Winand, et al. (1992). "Discovery of a potent atrial natriuretic peptide antagonist for ANPA receptors in the human neuroblastoma NB-OK-1 cell line." Eur J Pharmacol **224**(2-3): 183-8.
- Deschenes, J., C. Dupere, et al. (2005). "Development of a selective peptide antagonist for the human natriuretic peptide receptor-B." Peptides **26**(3): 517-24.
- Dickey, D. M., J. C. Burnett, Jr., et al. (2008). "Novel bifunctional natriuretic peptides as potential therapeutics." J Biol Chem **283**(50): 35003-9.
- Dizhoor, A. M. and J. B. Hurley (1999). "Regulation of photoreceptor membrane guanylyl cyclases by guanylyl cyclase activator proteins." Methods **19**(4): 521-31.
- Doi, K., H. Itoh, et al. (1996). "Vascular endothelial growth factor suppresses C-type natriuretic peptide secretion." Hypertension **27**(3 Pt 2): 811-5.
- Doyle, D. D., J. Upshaw-Earley, et al. (2002). "Natriuretic peptide receptor-B in adult rat ventricle is predominantly confined to the nonmyocyte population." Am J Physiol Heart Circ Physiol **282**(6): H2117-23.
- Duda, T. and K. W. Koch (2002). "Calcium-modulated membrane guanylate cyclase in synaptic transmission?" Mol Cell Biochem **230**(1-2): 107-16.
- Duda, T., V. Venkataraman, et al. (2005). "ATP-regulated module (ARM) of the atrial natriuretic factor receptor guanylate cyclase." Peptides **26**(6): 969-84.
- Duda, T., P. Yadav, et al. (2000). "Three dimensional atomic model and experimental validation for the ATP-Regulated Module (ARM) of the atrial natriuretic factor receptor guanylate cyclase." Mol Cell Biochem **214**(1-2): 7-14.
- Edwards, B. S., R. S. Zimmerman, et al. (1988). "Atrial stretch, not pressure, is the principal determinant controlling the acute release of atrial natriuretic factor." Circ Res **62**(2): 191-5.
- Elferink, J. G. and B. M. De Koster (1995). "Atrial natriuretic factor stimulates migration by human neutrophils." Eur J Pharmacol **288**(3): 335-40.

- Endlich, K. and M. Steinhausen (1997). "Natriuretic peptide receptors mediate different responses in rat renal microvessels." Kidney Int **52**(1): 202-7.
- Evrard, A., C. Hober, et al. (1999). "[Atrial natriuretic hormone and endocrine functions]." Ann Biol Clin (Paris) **57**(2): 149-55.
- Falke, J. J., A. F. Dernburg, et al. (1988). "Structure of a bacterial sensory receptor. A site-directed sulfhydryl study." J Biol Chem **263**(29): 14850-8.
- Falke, J. J. and G. L. Hazelbauer (2001). "Transmembrane signaling in bacterial chemoreceptors." Trends Biochem Sci **26**(4): 257-65.
- Fan, D., P. M. Bryan, et al. (2005). "Down-regulation does not mediate natriuretic peptide-dependent desensitization of natriuretic peptide receptor (NPR)-A or NPR-B: guanylyl cyclase-linked natriuretic peptide receptors do not internalize." Mol Pharmacol **67**(1): 174-83.
- Fenrick, R., N. Bouchard, et al. (1997). "Glycosylation of asparagine 24 of the natriuretic peptide receptor-B is crucial for the formation of a competent ligand binding domain." Mol Cell Biochem **173**(1-2): 25-32.
- Fenrick, R., N. McNicoll, et al. (1996). "Glycosylation is critical for natriuretic peptide receptor-B function." Mol Cell Biochem **165**(2): 103-9.
- Ferguson, K. M., M. B. Berger, et al. (2003). "EGF activates its receptor by removing interactions that autoinhibit ectodomain dimerization." Mol Cell **11**(2): 507-17.
- Field, M., L. H. Graf, Jr., et al. (1978). "Heat-stable enterotoxin of Escherichia coli: in vitro effects on guanylate cyclase activity, cyclic GMP concentration, and ion transport in small intestine." Proc Natl Acad Sci U S A **75**(6): 2800-4.
- Fluckiger, J. P., B. Waeber, et al. (1986). "Effect of atriopeptin III on hematocrit and volemia of nephrectomized rats." Am J Physiol **251**(4 Pt 2): H880-3.
- Flynn, T. G., M. L. de Bold, et al. (1983). "The amino acid sequence of an atrial peptide with potent diuretic and natriuretic properties." Biochem Biophys Res Commun **117**(3): 859-65.
- Forssmann, W., M. Meyer, et al. (2001). "The renal urodilatin system: clinical implications." Cardiovasc Res **51**(3): 450-62.
- Forte, L. R., Jr. (2004). "Uroguanylin and guanylin peptides: pharmacology and experimental therapeutics." Pharmacol Ther **104**(2): 137-62.
- Fortin, Y. and A. De Lean (2006). "Role of cyclic GMP and calcineurin in homologous and heterologous desensitization of natriuretic peptide receptor-A." Can J Physiol Pharmacol **84**(5): 539-46.
- Foster, D. C. and D. L. Garbers (1998). "Dual role for adenine nucleotides in the regulation of the atrial natriuretic peptide receptor, guanylyl cyclase-A." J Biol Chem **273**(26): 16311-8.
- Francis, S. H., J. D. Corbin, et al. (2009). "Cyclic GMP-hydrolyzing phosphodiesterases." Handb Exp Pharmacol(191): 367-408.
- Frank, S. J. (2002). "Receptor dimerization in GH and erythropoietin action--it takes two to tango, but how?" Endocrinology **143**(1): 2-10.
- Fuh, G., B. C. Cunningham, et al. (1992). "Rational design of potent antagonists to the human growth hormone receptor." Science **256**(5064): 1677-80.
- Fulle, H. J., R. Vassar, et al. (1995). "A receptor guanylyl cyclase expressed specifically in olfactory sensory neurons." Proc Natl Acad Sci U S A **92**(8): 3571-5.

- Fuller, F., J. G. Porter, et al. (1988). "Atrial natriuretic peptide clearance receptor. Complete sequence and functional expression of cDNA clones." J Biol Chem **263**(19): 9395-401.
- Furuya, M., M. Yoshida, et al. (1991). "C-type natriuretic peptide is a growth inhibitor of rat vascular smooth muscle cells." Biochem Biophys Res Commun **177**(3): 927-31.
- Gambaryan, S., C. Wagner, et al. (1998). "Endogenous or overexpressed cGMP-dependent protein kinases inhibit cAMP-dependent renin release from rat isolated perfused kidney, microdissected glomeruli, and isolated juxtaglomerular cells." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(15): 9003-8.
- Gandia, J., C. Lluís, et al. (2008). "Light resonance energy transfer-based methods in the study of G protein-coupled receptor oligomerization." Bioessays **30**(1): 82-9.
- Ganguly, A., S. Chiou, et al. (1989). "Atrial natriuretic factor inhibits angiotensin-induced aldosterone secretion: not through cGMP or interference with phospholipase C." Biochem Biophys Res Commun **159**(1): 148-54.
- Garbers, D. L., T. D. Chrisman, et al. (2006). "Membrane guanylyl cyclase receptors: an update." Trends Endocrinol Metab **17**(6): 251-8.
- Garcia, R., G. Thibault, et al. (1985). "Structure-activity relationships of atrial natriuretic factor (ANF). II. Effect of chain-length modifications on vascular reactivity." Biochem Biophys Res Commun **126**(1): 178-84.
- Gardner, D. G., S. Chen, et al. (2007). "Molecular biology of the natriuretic peptide system: implications for physiology and hypertension." Hypertension **49**(3): 419-26.
- Garg, R., P. M. Oliver, et al. (2002). "Genomic structure, organization, and promoter region analysis of murine guanylyl cyclase/atrial natriuretic peptide receptor-A gene." Gene **291**(1-2): 123-33.
- Garg, R. and K. N. Pandey (2005). "Regulation of guanylyl cyclase/natriuretic peptide receptor-A gene expression." Peptides **26**(6): 1009-23.
- Gerber, D., N. Sal-Man, et al. (2004). "Two motifs within a transmembrane domain, one for homodimerization and the other for heterodimerization." J Biol Chem **279**(20): 21177-82.
- Goracznik, R. M., T. Duda, et al. (1992). "A structural motif that defines the ATP-regulatory module of guanylate cyclase in atrial natriuretic factor signalling." Biochem J **282** (Pt 2): 533-7.
- Grepin, C., L. Dagnino, et al. (1994). "A hormone-encoding gene identifies a pathway for cardiac but not skeletal muscle gene transcription." Mol Cell Biol **14**(5): 3115-29.
- Guo, D., Y. C. Tan, et al. (2007). "A Rac-cGMP signaling pathway." Cell **128**(2): 341-55.
- Hagiwara, H., A. Inoue, et al. (1996). "cGMP produced in response to ANP and CNP regulates proliferation and differentiation of osteoblastic cells." Am J Physiol **270**(5 Pt 1): C1311-8.
- Hagiwara, H., H. Sakaguchi, et al. (1994). "Autocrine regulation of rat chondrocyte proliferation by natriuretic peptide C and its receptor, natriuretic peptide receptor-B." J Biol Chem **269**(14): 10729-33.
- Hamad, A. M., A. Clayton, et al. (2003). "Guanylyl cyclases, nitric oxide, natriuretic peptides, and airway smooth muscle function." Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol **285**(5): L973-83.

- Hamet, P., J. Tremblay, et al. (1984). "Effect of native and synthetic atrial natriuretic factor on cyclic GMP." Biochem Biophys Res Commun **123**(2): 515-27.
- Hamra, F. K., L. R. Forte, et al. (1993). "Uroguanylin: structure and activity of a second endogenous peptide that stimulates intestinal guanylate cyclase." Proc Natl Acad Sci U S A **90**(22): 10464-8.
- Han, B., R. Fixler, et al. (2003). "The opposing effects of endothelin-1 and C-type natriuretic peptide on apoptosis of neonatal rat cardiac myocytes." Eur J Pharmacol **474**(1): 15-20.
- Haneda, M., R. Kikkawa, et al. (1991). "Dual mechanism of angiotensin II inhibits ANP-induced mesangial cGMP accumulation." Kidney Int **40**(2): 188-94.
- Hanford, D. S., D. J. Thuerauf, et al. (1994). "Brain natriuretic peptide is induced by alpha 1-adrenergic agonists as a primary response gene in cultured rat cardiac myocytes." J Biol Chem **269**(42): 26227-33.
- Harris, P. J., D. Thomas, et al. (1987). "Atrial natriuretic peptide inhibits angiotensin-stimulated proximal tubular sodium and water reabsorption." Nature **326**(6114): 697-8.
- Hashim, S., Y. Li, et al. (2006). "Small cytoplasmic domain peptides of natriuretic peptide receptor-C attenuate cell proliferation through Gialpha protein/MAP kinase/PI3-kinase/AKT pathways." Am J Physiol Heart Circ Physiol **291**(6): H3144-53.
- He, P., M. Zeng, et al. (1998). "cGMP modulates basal and activated microvessel permeability independently of." Am J Physiol **274**(6 Pt 2): H1865-74.
- He, X. l., D. c. Chow, et al. (2001). "Allosteric activation of a spring-loaded natriuretic peptide receptor dimer by hormone." Science **293**(5535): 1657-62.
- He, X. L., A. Dukkipati, et al. (2006). "Structural determinants of natriuretic peptide receptor specificity and degeneracy." J Mol Biol **361**(4): 698-714.
- He, X. L., A. Dukkipati, et al. (2005). "A new paradigm for hormone recognition and allosteric receptor activation revealed from structural studies of NPR-C." Peptides **26**(6): 1035-43.
- Henry, J. P., O. H. Gauer, et al. (1956). "Evidence of the atrial location of receptors influencing urine flow." Circ Res **4**(1): 85-90.
- Henry, J. P. and J. W. Pearce (1956). "The possible role of cardiac atrial stretch receptors in the induction of changes in urine flow." J Physiol **131**(3): 572-85.
- Hirose, M., Y. Furukawa, et al. (1998). "C-type natriuretic peptide increases myocardial contractility and sinus rate mediated by guanylyl cyclase-linked natriuretic peptide receptors in isolated, blood-perfused dog heart preparations." J Pharmacol Exp Ther **286**(1): 70-6.
- Hirose, S., F. Akiyama, et al. (1985). "Solubilization and molecular weight estimation of atrial natriuretic factor receptor from bovine adrenal cortex." Biochem Biophys Res Commun **130**(2): 574-9.
- Hirsch, J. R., N. Skutta, et al. (2003). "Signaling and distribution of NPR-Bi, the human splice form of the natriuretic peptide receptor type B." Am J Physiol Renal Physiol **285**(2): F370-4.
- Hofmann, F. (2005). "The biology of cyclic GMP-dependent protein kinases." J Biol Chem **280**(1): 1-4.
- Hofmann, F., D. Bernhard, et al. (2009). "cGMP regulated protein kinases (cGK)." Handb Exp Pharmacol(191): 137-62.

- Holliday, L. S., A. D. Dean, et al. (1995). "C-type natriuretic peptide increases bone resorption in 1,25-dihydroxyvitamin D₃-stimulated mouse bone marrow cultures." *J Biol Chem* **270**(32): 18983-9.
- Hollister, A. S., I. Tanaka, et al. (1986). "Sodium loading and posture modulate human atrial natriuretic factor plasma levels." *Hypertension* **8**(6 Pt 2): II106-11.
- Holtwick, R., M. Gotthardt, et al. (2002). "Smooth muscle-selective deletion of guanylyl cyclase-A prevents the acute but not chronic effects of ANP on blood pressure." *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**(10): 7142-7.
- Holtwick, R., M. van Eickels, et al. (2003). "Pressure-independent cardiac hypertrophy in mice with cardiomyocyte-restricted inactivation of the atrial natriuretic peptide receptor guanylyl cyclase-A." *J Clin Invest* **111**(9): 1399-407.
- Honing, M. L., P. Smits, et al. (2001). "C-type natriuretic peptide-induced vasodilation is dependent on hyperpolarization in human forearm resistance vessels." *Hypertension* **37**(4): 1179-83.
- Horio, T., T. Tokudome, et al. (2003). "Gene expression, secretion, and autocrine action of C-type natriuretic peptide in cultured adult rat cardiac fibroblasts." *Endocrinology* **144**(6): 2279-84.
- Houweling, A. C., M. M. van Borren, et al. (2005). "Expression and regulation of the atrial natriuretic factor encoding gene *Nppa* during development and disease." *Cardiovasc Res* **67**(4): 583-93.
- Huang, Y. H., C. C. Wei, et al. (2006). "Localization and characterization of an orphan receptor, guanylyl cyclase-G, in mouse testis and sperm." *Endocrinology* **147**(10): 4792-800.
- Hughes, J. M., F. Murad, et al. (1978). "Role of cyclic GMP in the action of heat-stable enterotoxin of *Escherichia coli*." *Nature* **271**(5647): 755-6.
- Huntley, B. K., S. M. Sandberg, et al. (2006). "BNP-induced activation of cGMP in human cardiac fibroblasts: interactions with fibronectin and natriuretic peptide receptors." *J Cell Physiol* **209**(3): 943-9.
- Huo, X., T. Abe, et al. (1999). "Ligand binding-dependent limited proteolysis of the atrial natriuretic peptide receptor: juxtamembrane hinge structure essential for transmembrane signal transduction." *Biochemistry* **38**(51): 16941-51.
- Hutchinson, H. G., P. T. Trindade, et al. (1997). "Mechanisms of natriuretic-peptide-induced growth inhibition of vascular smooth muscle cells." *Cardiovasc Res* **35**(1): 158-67.
- Huxley, V. H., V. L. Tucker, et al. (1987). "Increased capillary hydraulic conductivity induced by atrial natriuretic peptide." *Circ Res* **60**(2): 304-7.
- Igaki, T., H. Itoh, et al. (1996). "Insulin suppresses endothelial secretion of C-type natriuretic peptide, a novel endothelium-derived relaxing peptide." *Diabetes* **45 Suppl 3**: S62-4.
- Iida, H. and Y. Shibata (1994). "Phasic secretion of newly synthesized atrial natriuretic factor from unstimulated atrial myocytes in culture." *Circ Res* **74**(4): 659-68.
- Ikeda, M., M. Kohno, et al. (1997). "Natriuretic peptide family as a novel antimigration factor of vascular smooth muscle cells." *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **17**(4): 731-6.

- Imura, H., K. Nakao, et al. (1992). "The natriuretic peptide system in the brain: implications in the central control of cardiovascular and neuroendocrine functions." *Front Neuroendocrinol* **13**(3): 217-49.
- Inoue, K., K. Naruse, et al. (2003). "Four functionally distinct C-type natriuretic peptides found in fish reveal evolutionary history of the natriuretic peptide system." *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**(17): 10079-84.
- Ishii, J., M. Nomura, et al. (2000). "Plasma concentration of brain natriuretic peptide as a biochemical marker for the evaluation of right ventricular overload and mortality in chronic respiratory disease." *Clin Chim Acta* **301**(1-2): 19-30.
- Itakura, M., M. Iwashina, et al. (1994). "Mutational analysis of disulfide bridges in the type C atrial natriuretic peptide receptor." *J Biol Chem* **269**(11): 8314-8.
- Itoh, H., K. Nakao, et al. (1986). "Centrally infused atrial natriuretic polypeptide attenuates exaggerated salt appetite in spontaneously hypertensive rats." *Circ Res* **59**(3): 342-7.
- Itoh, H., R. E. Pratt, et al. (1992). "Atrial natriuretic polypeptide as a novel antigrowth factor of endothelial cells." *Hypertension* **19**(6 Pt 2): 758-61.
- Izumi, T., Y. Saito, et al. (2001). "Blockade of the natriuretic peptide receptor guanylyl cyclase-A inhibits NF-kappaB activation and alleviates myocardial ischemia/reperfusion injury." *J Clin Invest* **108**(2): 203-13.
- Jeandel, L., H. Okamura, et al. (1989). "Immunocytochemical localization, binding, and effects of atrial natriuretic peptide in rat adipocytes." *Mol Cell Endocrinol* **62**(1): 69-78.
- Jewett, J. R., K. J. Koller, et al. (1993). "Hormonal induction of low affinity receptor guanylyl cyclase." *EMBO J* **12**(2): 769-77.
- Jiang, G. and T. Hunter (1999). "Receptor signaling: when dimerization is not enough." *Curr Biol* **9**(15): R568-71.
- Jin, H., B. Li, et al. (1996). "Novel analog of atrial natriuretic peptide selective for receptor-A produces increased diuresis and natriuresis in rats." *J Clin Invest* **98**(4): 969-76.
- John, S. W., A. T. Veress, et al. (1996). "Blood pressure and fluid-electrolyte balance in mice with reduced or absent ANP." *Am J Physiol* **271**(1 Pt 2): R109-14.
- Johns, D. G., Z. Ao, et al. (2007). "Dendroaspis natriuretic peptide binds to the natriuretic peptide clearance receptor." *Biochem Biophys Res Commun* **358**(1): 145-9.
- Jossart, C., M. Coupal, et al. (2005). "Photolabeling study of the ligand binding domain of natriuretic peptide receptor A: development of a model." *Biochemistry* **44**(7): 2397-408.
- Joubert, S., C. Jossart, et al. (2005). "Atrial natriuretic peptide-dependent photolabeling of a regulatory ATP-binding site on the natriuretic peptide receptor-A." *FEBS J* **272**(21): 5572-83.
- Joubert, S., J. Labrecque, et al. (2001). "Reduced activity of the NPR-A kinase triggers dephosphorylation and homologous desensitization of the receptor." *Biochemistry* **40**(37): 11096-105.
- Joubert, S., N. McNicoll, et al. (2007). "Biochemical and pharmacological characterization of P-site inhibitors on homodimeric guanylyl cyclase domain from natriuretic peptide receptor-A." *Biochem Pharmacol* **73**(7): 954-63.
- Juilfs, D. M., H. J. Fulle, et al. (1997). "A subset of olfactory neurons that selectively express cGMP-stimulated phosphodiesterase (PDE2) and guanylyl cyclase-D

- define a unique olfactory signal transduction pathway." Proc Natl Acad Sci U S A **94**(7): 3388-95.
- Kalra, P. R., J. R. Clague, et al. (2003). "Myocardial production of C-type natriuretic peptide in chronic heart failure." Circulation **107**(4): 571-3.
- Kangawa, K., Y. Tawaragi, et al. (1984). "Identification of rat gamma atrial natriuretic polypeptide and characterization of the cDNA encoding its precursor." Nature **312**(5990): 152-5.
- Kapoun, A. M., F. Liang, et al. (2004). "B-type natriuretic peptide exerts broad functional opposition to transforming growth factor-beta in primary human cardiac fibroblasts: fibrosis, myofibroblast conversion, proliferation, and inflammation." Circ Res **94**(4): 453-61.
- Keating, G. M. and K. L. Goa (2003). "Nesiritide: a review of its use in acute decompensated heart failure." Drugs **63**(1): 47-70.
- Kelsell, R. E., K. Gregory-Evans, et al. (1998). "Mutations in the retinal guanylate cyclase (RETGC-1) gene in dominant cone-rod dystrophy." Hum Mol Genet **7**(7): 1179-84.
- Kenny, A. J., A. Bourne, et al. (1993). "Hydrolysis of human and pig brain natriuretic peptides, urodilatin, C-type natriuretic peptide and some C-receptor ligands by endopeptidase-24.11." Biochem J **291** (Pt 1): 83-8.
- Kerppola, T. K. (2006). "Visualization of molecular interactions by fluorescence complementation." Nat Rev Mol Cell Biol **7**(6): 449-56.
- Kiemer, A. K., T. Hartung, et al. (2000). "cGMP-mediated inhibition of TNF-alpha production by the atrial natriuretic peptide in murine macrophages." J Immunol **165**(1): 175-81.
- Kilic, A., A. Bubikat, et al. (2007). "Local actions of atrial natriuretic peptide counteract angiotensin II stimulated cardiac remodeling." Endocrinology **148**(9): 4162-9.
- Kisch, B. (1956). "Electron microscopy of the atrium of the heart. I. Guinea pig." Exp Med Surg **14**(2-3): 99-112.
- Kishimoto, I., S. K. Dubois, et al. (1996). "The heart communicates with the kidney exclusively through the guanylyl cyclase-A receptor: acute handling of sodium and water in response to volume expansion." Proc Natl Acad Sci U S A **93**(12): 6215-9.
- Kishimoto, I., K. Rossi, et al. (2001). "A genetic model provides evidence that the receptor for atrial natriuretic peptide (guanylyl cyclase-A) inhibits cardiac ventricular myocyte hypertrophy." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(5): 2703-6.
- Kita, S., H. Nishizawa, et al. (2009). "Competitive binding of musclin to natriuretic peptide receptor 3 with atrial natriuretic peptide." J Endocrinol **201**(2): 287-95.
- Kleppisch, T. (2009). "Phosphodiesterases in the central nervous system." Handb Exp Pharmacol(191): 71-92.
- Klinger, J. R., R. D. Petit, et al. (1993). "Cardiopulmonary responses to chronic hypoxia in transgenic mice that overexpress ANP." J Appl Physiol **75**(1): 198-205.
- Klinger, J. R., R. R. Warburton, et al. (1999). "Genetic disruption of atrial natriuretic peptide causes pulmonary hypertension in normoxic and hypoxic mice." Am J Physiol **276**(5 Pt 1): L868-74.

- Knowles, J. W., G. Esposito, et al. (2001). "Pressure-independent enhancement of cardiac hypertrophy in natriuretic peptide receptor A-deficient mice." J Clin Invest **107**(8): 975-84.
- Kobilka, B. K. and X. Deupi (2007). "Conformational complexity of G-protein-coupled receptors." Trends Pharmacol Sci **28**(8): 397-406.
- Koh, G. Y., D. R. Nussenzveig, et al. (1992). "Dynamics of atrial natriuretic factor-guanylate cyclase receptors and receptor-ligand complexes in cultured glomerular mesangial and renomedullary interstitial cells." J Biol Chem **267**(17): 11987-94.
- Koller, K. J., F. J. de Sauvage, et al. (1992). "Conservation of the kinaselike regulatory domain is essential for activation of the natriuretic peptide receptor guanylyl cyclases." Mol Cell Biol **12**(6): 2581-90.
- Koller, K. J., M. T. Lipari, et al. (1993). "Proper glycosylation and phosphorylation of the type A natriuretic peptide receptor are required for hormone-stimulated guanylyl cyclase activity." J Biol Chem **268**(8): 5997-6003.
- Koller, K. J., D. G. Lowe, et al. (1991). "Selective activation of the B natriuretic peptide receptor by C-type natriuretic peptide (CNP)." Science **252**(5002): 120-3.
- Komalavilas, P. and T. M. Lincoln (1996). "Phosphorylation of the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor. Cyclic GMP-dependent protein kinase mediates cAMP and cGMP dependent phosphorylation in the intact rat aorta." J Biol Chem **271**(36): 21933-8.
- Kosuge, K., M. Soma, et al. (2007). "A novel variable number of tandem repeat of the natriuretic peptide precursor B gene's 5'-flanking region is associated with essential hypertension among Japanese females." Int J Med Sci **4**(3): 146-52.
- Kots, A. Y., E. Martin, et al. (2009). "A short history of cGMP, guanylyl cyclases, and cGMP-dependent protein kinases." Handb Exp Pharmacol(191): 1-14.
- Kramer, J. M., L. Yi, et al. (2006). "Evidence for ligand-independent multimerization of the IL-17 receptor." J Immunol **176**(2): 711-5.
- Krejci, P., B. Masri, et al. (2005). "Interaction of fibroblast growth factor and C-natriuretic peptide signaling in regulation of chondrocyte proliferation and extracellular matrix homeostasis." J Cell Sci **118**(Pt 21): 5089-100.
- Kudo, T. and A. Baird (1984). "Inhibition of aldosterone production in the adrenal glomerulosa by atrial natriuretic factor." Nature **312**(5996): 756-7.
- Kuhn, M. (2009). "Function and dysfunction of mammalian membrane guanylyl cyclase receptors: lessons from genetic mouse models and implications for human diseases." Handb Exp Pharmacol(191): 47-69.
- Kuhnl, A., J. Pelisek, et al. (2005). "C-type natriuretic peptide inhibits constrictive remodeling without compromising re-endothelialization in balloon-dilated renal arteries." J Endovasc Ther **12**(2): 171-82.
- Kumar, R., N. Grammatikakis, et al. (2001). "Regulation of the atrial natriuretic peptide receptor by heat shock protein 90 complexes." J Biol Chem **276**(14): 11371-5.
- Kuno, T., J. W. Andresen, et al. (1986). "Co-purification of an atrial natriuretic factor receptor and particulate guanylate cyclase from rat lung." J Biol Chem **261**(13): 5817-23.
- Labrecque, J., J. Deschenes, et al. (2001). "Agonistic induction of a covalent dimer in a mutant of natriuretic peptide receptor-A documents a juxtamembrane

- interaction that accompanies receptor activation." *J Biol Chem* **276**(11): 8064-72.
- Labrecque, J., N. Mc Nicoll, et al. (1999). "A disulfide-bridged mutant of natriuretic peptide receptor-A displays constitutive activity. Role of receptor dimerization in signal transduction." *J Biol Chem* **274**(14): 9752-9.
- Lachance, D., R. Garcia, et al. (1986). "Mechanisms of release of atrial natriuretic factor. I. Effect of several agonists and steroids on its release by atrial minces." *Biochem Biophys Res Commun* **135**(3): 1090-8.
- Lafontan, M. (2008). "Advances in adipose tissue metabolism." *Int J Obes (Lond)* **32 Suppl 7**: S39-51.
- Lafontan, M., C. Moro, et al. (2008). "Control of lipolysis by natriuretic peptides and cyclic GMP." *Trends Endocrinol Metab* **19**(4): 130-7.
- Lalli, M. J., S. Shimizu, et al. (1999). "[Ca²⁺]_i homeostasis and cyclic nucleotide relaxation in aorta of phospholamban-deficient mice." *Am J Physiol* **277**(3 Pt 2): H963-70.
- Lamken, P., S. Lata, et al. (2004). "Ligand-induced assembling of the type I interferon receptor on supported lipid bilayers." *J Mol Biol* **341**(1): 303-18.
- Lang, R. E., H. Tholken, et al. (1985). "Atrial natriuretic factor--a circulating hormone stimulated by volume loading." *Nature* **314**(6008): 264-6.
- Langenickel, T., J. Buttgerit, et al. (2004). "Forced homodimerization by site-directed mutagenesis alters guanylyl cyclase activity of natriuretic peptide receptor B." *Hypertension* **43**(2): 460-5.
- Langenickel, T. H., J. Buttgerit, et al. (2006). "Cardiac hypertrophy in transgenic rats expressing a dominant-negative mutant of the natriuretic peptide receptor B." *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**(12): 4735-40.
- LaPointe, M. C. (2005). "Molecular regulation of the brain natriuretic peptide gene." *Peptides* **26**(6): 944-56.
- Larose, L., N. McNicoll, et al. (1991). "Allosteric modulation by ATP of the bovine adrenal natriuretic factor R1 receptor functions." *Biochemistry* **30**(37): 8990-5.
- Lee, C. Y. and J. C. Burnett, Jr. (2007). "Natriuretic peptides and therapeutic applications." *Heart Fail Rev* **12**(2): 131-42.
- Lee, C. Y., H. H. Chen, et al. (2009). "Pharmacodynamics of a Novel Designer Natriuretic Peptide, CD-NP, in a First-in-Human Clinical Trial in Healthy Subjects." *J Clin Pharmacol* **49**(6): 668-73.
- Leinders-Zufall, T., R. E. Cockerham, et al. (2007). "Contribution of the receptor guanylyl cyclase GC-D to chemosensory function in the olfactory epithelium." *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**(36): 14507-12.
- Leitman, D. C., J. W. Andresen, et al. (1986). "Identification of multiple binding sites for atrial natriuretic factor by affinity cross-linking in cultured endothelial cells." *J Biol Chem* **261**(25): 11650-5.
- Levin, E. R. (1993). "Natriuretic peptide C-receptor: more than a clearance receptor." *Am J Physiol* **264**(4 Pt 1): E483-9.
- Li, B., J. Y. Tom, et al. (1995). "Minimization of a polypeptide hormone." *Science* **270**(5242): 1657-60.
- Li, P., J. E. Lin, et al. (2007). "Homeostatic control of the crypt-villus axis by the bacterial enterotoxin receptor guanylyl cyclase C restricts the proliferating compartment in intestine." *Am J Pathol* **171**(6): 1847-58.

- Lichanska, A. M. and M. J. Waters (2008). "New insights into growth hormone receptor function and clinical implications." Horm Res **69**(3): 138-45.
- Light, D. B., J. D. Corbin, et al. (1990). "Dual ion-channel regulation by cyclic GMP and cyclic GMP-dependent protein kinase." Nature **344**(6264): 336-9.
- Lin, H., C. F. Cheng, et al. (2008). "Disruption of guanylyl cyclase-G protects against acute renal injury." J Am Soc Nephrol **19**(2): 339-48.
- Lisy, O., B. K. Huntley, et al. (2008). "Design, synthesis, and actions of a novel chimeric natriuretic peptide: CD-NP." J Am Coll Cardiol **52**(1): 60-8.
- Lisy, O., M. Jougasaki, et al. (1999). "Renal actions of synthetic dendroaspis natriuretic peptide." Kidney Int **56**(2): 502-8.
- Lisy, O., J. G. Lainchbury, et al. (2001). "Therapeutic actions of a new synthetic vasoactive and natriuretic peptide, dendroaspis natriuretic peptide, in experimental severe congestive heart failure." Hypertension **37**(4): 1089-94.
- Liu, Y., A. E. Ruoho, et al. (1997). "Catalytic mechanism of the adenylyl and guanylyl cyclases: modeling and mutational analysis." Proc Natl Acad Sci U S A **94**(25): 13414-9.
- Livnah, O., D. L. Johnson, et al. (1998). "An antagonist peptide-EPO receptor complex suggests that receptor dimerization is not sufficient for activation." Nat Struct Biol **5**(11): 993-1004.
- Lopez, M. J., D. L. Garbers, et al. (1997). "The guanylyl cyclase-deficient mouse defines differential pathways of natriuretic peptide signaling." J Biol Chem **272**(37): 23064-8.
- Lopez, M. J., S. K. Wong, et al. (1995). "Salt-resistant hypertension in mice lacking the guanylyl cyclase-A receptor for atrial natriuretic peptide." Nature **378**(6552): 65-8.
- Lorenz, J. N., M. Nieman, et al. (2003). "Uroguanylin knockout mice have increased blood pressure and impaired natriuretic response to enteral NaCl load." J Clin Invest **112**(8): 1244-54.
- Lowe, D. G. (1992). "Human natriuretic peptide receptor-A guanylyl cyclase is self-associated prior to hormone binding." Biochemistry **31**(43): 10421-5.
- Lowe, D. G. and B. M. Fendly (1992). "Human natriuretic peptide receptor-A guanylyl cyclase. Hormone cross-linking and antibody reactivity distinguish receptor glycoforms." J Biol Chem **267**(30): 21691-7.
- Lowe, D. G., I. Klisak, et al. (1990). "Chromosomal distribution of three members of the human natriuretic peptide receptor/guanylyl cyclase gene family." Genomics **8**(2): 304-12.
- Lu, B., N. P. Gerard, et al. (1995). "Neutral endopeptidase modulation of septic shock." J Exp Med **181**(6): 2271-5.
- Lu, X., A. W. Gross, et al. (2006). "Active conformation of the erythropoietin receptor: random and cysteine-scanning mutagenesis of the extracellular juxtamembrane and transmembrane domains." J Biol Chem **281**(11): 7002-11.
- Lucas, K. A., G. M. Pitari, et al. (2000). "Guanylyl cyclases and signaling by cyclic GMP." Pharmacol Rev **52**(3): 375-414.
- Maack, T., D. N. Marion, et al. (1984). "Effects of auriculins (atrial natriuretic factor) on blood pressure, renal function, and the renin-aldosterone system in dogs." Am J Med **77**(6): 1069-75.
- Maack, T., M. Suzuki, et al. (1987). "Physiological role of silent receptors of atrial natriuretic factor." Science **238**(4827): 675-8.

- Macdonald-Obermann, J. L. and L. J. Pike (2009). "The intracellular juxtamembrane domain of the epidermal growth factor (EGF) receptor is responsible for the allosteric regulation of EGF binding." *J Biol Chem* **284**(20): 13570-6.
- MacFarland, R. T., B. D. Zelus, et al. (1991). "High concentrations of a cGMP-stimulated phosphodiesterase mediate ANP-induced decreases in cAMP and steroidogenesis in adrenal glomerulosa cells." *J Biol Chem* **266**(1): 136-42.
- Maeder, M., T. Fehr, et al. (2006). "Sepsis-associated myocardial dysfunction: diagnostic and prognostic impact of cardiac troponins and natriuretic peptides." *Chest* **129**(5): 1349-66.
- Makikallio, A. M., T. H. Makikallio, et al. (2005). "Natriuretic peptides and mortality after stroke." *Stroke* **36**(5): 1016-20.
- Marin-Grez, M., J. T. Fleming, et al. (1986). "Atrial natriuretic peptide causes pre-glomerular vasodilatation and post-glomerular vasoconstriction in rat kidney." *Nature* **324**(6096): 473-6.
- Martin-Fernandez, M., D. T. Clarke, et al. (2002). "Preformed oligomeric epidermal growth factor receptors undergo an ectodomain structure change during signaling." *Biophys J* **82**(5): 2415-27.
- Martinez-Rumayor, A., A. M. Richards, et al. (2008). "Biology of the natriuretic peptides." *Am J Cardiol* **101**(3A): 3-8.
- Matsukawa, N., W. J. Grzesik, et al. (1999). "The natriuretic peptide clearance receptor locally modulates the physiological effects of the natriuretic peptide system." *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**(13): 7403-8.
- McGrath, M. F., M. L. de Bold, et al. (2005). "The endocrine function of the heart." *Trends Endocrinol Metab* **16**(10): 469-77.
- McKay, M. K. and V. H. Huxley (1995). "ANP increases capillary permeability to protein independent of perfusate protein composition." *Am J Physiol* **268**(3 Pt 2): H1139-48.
- McNicoll, N., J. Gagnon, et al. (1996). "Localization by photoaffinity labeling of natriuretic peptide receptor-A binding domain." *Biochemistry* **35**(39): 12950-6.
- Meloche, S., N. McNicoll, et al. (1988). "Atrial natriuretic factor R1 receptor from bovine adrenal zona glomerulosa: purification, characterization, and modulation by amiloride." *Biochemistry* **27**(21): 8151-8.
- Meloche, S., H. Ong, et al. (1987). "Functional heterogeneity of atrial natriuretic factor receptor in bovine adrenal zona glomerulosa is explained by an amiloride-sensitive high affinity molecular complex." *J Biol Chem* **262**(21): 10252-8.
- Mericq, V., J. A. Uyeda, et al. (2000). "Regulation of fetal rat bone growth by C-type natriuretic peptide and cGMP." *Pediatr Res* **47**(2): 189-93.
- Mimeault, M., A. Fournier, et al. (1993). "Development of natriuretic peptide analogs selective for the atrial natriuretic factor-R1A receptor subtype." *Mol Pharmacol* **43**(5): 775-82.
- Misono, K. S. (2000). "Atrial natriuretic factor binding to its receptor is dependent on chloride concentration: A possible feedback-control mechanism in renal salt regulation." *Circ Res* **86**(11): 1135-9.
- Misono, K. S., H. Fukumi, et al. (1984). "Rat atrial natriuretic factor: complete amino acid sequence and disulfide linkage essential for biological activity." *Biochem Biophys Res Commun* **119**(2): 524-9.

- Misono, K. S., R. T. Grammer, et al. (1984). "Rat atrial natriuretic factor: isolation, structure and biological activities of four major peptides." Biochem Biophys Res Commun **123**(2): 444-51.
- Misono, K. S., R. T. Grammer, et al. (1985). "Photoaffinity labeling of atrial natriuretic factor receptor in bovine and rat adrenal cortical membranes." Biochem Biophys Res Commun **130**(3): 994-1001.
- Misono, K. S., H. Ogawa, et al. (2005). "Structural studies of the natriuretic peptide receptor: a novel hormone-induced rotation mechanism for transmembrane signal transduction." Peptides **26**(6): 957-68.
- Misono, K. S., N. Sivasubramanian, et al. (1999). "Expression and purification of the extracellular ligand-binding domain of the atrial natriuretic peptide (ANP) receptor: monovalent binding with ANP induces 2:2 complexes." Biochemistry **38**(2): 516-23.
- Mitrovic, V., H. Luss, et al. (2005). "Effects of the renal natriuretic peptide urodilatin (ularitide) in patients with decompensated chronic heart failure: a double-blind, placebo-controlled, ascending-dose trial." Am Heart J **150**(6): 1239.
- Miyagi, M. and K. S. Misono (2000). "Disulfide bond structure of the atrial natriuretic peptide receptor extracellular domain: conserved disulfide bonds among guanylate cyclase-coupled receptors." Biochim Biophys Acta **1478**(1): 30-8.
- Miyagi, M., X. Zhang, et al. (2000). "Glycosylation sites in the atrial natriuretic peptide receptor: oligosaccharide structures are not required for hormone binding." Eur J Biochem **267**(18): 5758-68.
- Miyawaki, A., J. Llopis, et al. (1997). "Fluorescent indicators for Ca²⁺ based on green fluorescent proteins and calmodulin." Nature **388**(6645): 882-7.
- Miyazawa, T., Y. Ogawa, et al. (2002). "Cyclic GMP-dependent protein kinase II plays a critical role in C-type natriuretic peptide-mediated endochondral ossification." Endocrinology **143**(9): 3604-10.
- Moffatt, P., G. Thomas, et al. (2007). "Osteocrin is a specific ligand of the natriuretic Peptide clearance receptor that modulates bone growth." J Biol Chem **282**(50): 36454-62.
- Mohapatra, S. S., R. F. Lockey, et al. (2004). "Natriuretic peptides and genesis of asthma: an emerging paradigm?" J Allergy Clin Immunol **114**(3): 520-6.
- Moriki, T., H. Maruyama, et al. (2001). "Activation of preformed EGF receptor dimers by ligand-induced rotation of the transmembrane domain." J Mol Biol **311**(5): 1011-26.
- Morishita, Y., T. Sano, et al. (1991). "Microbial polysaccharide, HS-142-1, competitively and selectively inhibits ANP binding to its guanylyl cyclase-containing receptor." Biochem Biophys Res Commun **176**(3): 949-57.
- Morita, R., N. Ukyo, et al. (2003). "Atrial natriuretic peptide polarizes human dendritic cells toward a Th2-promoting phenotype through its receptor guanylyl cyclase-coupled receptor A." J Immunol **170**(12): 5869-75.
- Mukoyama, M., K. Nakao, et al. (1991). "Brain natriuretic peptide as a novel cardiac hormone in humans. Evidence for an exquisite dual natriuretic peptide system, atrial natriuretic peptide and brain natriuretic peptide." J Clin Invest **87**(4): 1402-12.
- Mukoyama, M., K. Nakao, et al. (1991). "Brain natriuretic peptide as a novel cardiac hormone in humans. Evidence for an exquisite dual natriuretic peptide system,

- atrial natriuretic peptide and brain natriuretic peptide." J Clin Invest **87**(4): 1402-12.
- Murakami, S., N. Nagaya, et al. (2004). "C-type natriuretic peptide attenuates bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice." Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol **287**(6): L1172-7.
- Murthy, K. S., B. Teng, et al. (1998). "G protein-dependent activation of smooth muscle eNOS via natriuretic peptide clearance receptor." Am J Physiol **275**(6 Pt 1): C1409-16.
- Nakamura, M., K. Ichikawa, et al. (1999). "Effects of the phosphorylation of myosin phosphatase by cyclic GMP-dependent protein kinase." Cell Signal **11**(9): 671-6.
- Nakanishi, M., Y. Saito, et al. (2005). "Role of natriuretic peptide receptor guanylyl cyclase-A in myocardial infarction evaluated using genetically engineered mice." Hypertension **46**(2): 441-7.
- Nakayama, T., M. Soma, et al. (2002). "A novel missense mutation of exon 3 in the type A human natriuretic peptide receptor gene: possible association with essential hypertension." Hypertens Res **25**(3): 395-401.
- Nakayama, T., M. Soma, et al. (2003). "Missense mutation of exon 3 in the type A human natriuretic peptide receptor gene is associated with myocardial infarction." Med Sci Monit **9**(12): CR505-10.
- Nakayama, T., M. Soma, et al. (2000). "Functional deletion mutation of the 5'-flanking region of type A human natriuretic peptide receptor gene and its association with essential hypertension and left ventricular hypertrophy in the Japanese." Circ Res **86**(8): 841-5.
- Nausch, L. W., J. Ledoux, et al. (2008). "Differential patterning of cGMP in vascular smooth muscle cells revealed by single GFP-linked biosensors." Proc Natl Acad Sci U S A **105**(1): 365-70.
- Nikolaev, V. O. and M. J. Lohse (2009). "Novel techniques for real-time monitoring of cGMP in living cells." Handb Exp Pharmacol(191): 229-43.
- Nishizawa, H., M. Matsuda, et al. (2004). "Musclin, a novel skeletal muscle-derived secretory factor." J Biol Chem **279**(19): 19391-5.
- Nussenzveig, D. R., J. A. Lewicki, et al. (1990). "Cellular mechanisms of the clearance function of type C receptors of atrial natriuretic factor." J Biol Chem **265**(34): 20952-8.
- Obineche, E. N., J. Y. Pathan, et al. (2006). "Natriuretic peptide and adrenomedullin levels in chronic renal failure and effects of peritoneal dialysis." Kidney Int **69**(1): 152-6.
- Ogawa, H., Y. Qiu, et al. (2004). "Crystal structure of hormone-bound atrial natriuretic peptide receptor extracellular domain: rotation mechanism for transmembrane signal transduction." J Biol Chem **279**(27): 28625-31.
- Ogawa, Y., H. Itoh, et al. (1994). "Molecular cloning of the complementary DNA and gene that encode mouse brain natriuretic peptide and generation of transgenic mice that overexpress the brain natriuretic peptide gene." J Clin Invest **93**(5): 1911-21.
- Ogihara, T., J. Shima, et al. (1986). "Significant increase in plasma immunoreactive atrial natriuretic polypeptide concentration during head-out water immersion." Life Sci **38**(26): 2413-8.

- Ohta, S., Y. Shimekake, et al. (1993). "Cell-type-specific function of the C-type natriuretic peptide gene promoter in rat anterior pituitary-derived cultured cell lines." Mol Cell Biol **13**(7): 4077-86.
- Ohta, S., Y. Shimekake, et al. (1996). "Molecular cloning and characterization of a transcription factor for the C-type natriuretic peptide gene promoter." Eur J Biochem **242**(3): 460-6.
- Ohta, S., M. Takeuchi, et al. (2000). "A novel transcriptional factor with Ser/Thr kinase activity involved in the transforming growth factor (TGF)-beta signalling pathway." Biochem J **350 Pt 2**: 395-404.
- Okamura, H., P. A. Kelly, et al. (1988). "Atrial natriuretic peptide receptors are present in brown adipose tissue." Biochem Biophys Res Commun **156**(2): 1000-6.
- Oliver, P. M., J. E. Fox, et al. (1997). "Hypertension, cardiac hypertrophy, and sudden death in mice lacking natriuretic peptide receptor A." Proc Natl Acad Sci U S A **94**(26): 14730-5.
- Oliver, P. M., S. W. John, et al. (1998). "Natriuretic peptide receptor 1 expression influences blood pressures of mice in a dose-dependent manner." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(5): 2547-51.
- Olney, R. C., H. Bukulmez, et al. (2005). "Heterozygous Mutations in Natriuretic Peptide Receptor-B (NPR2) are Associated with Short Stature." J Clin Endocrinol Metab.
- Olson, L. J., D. G. Lowe, et al. (1996). "Novel natriuretic peptide receptor/guanylyl cyclase A-selective agonist inhibits angiotensin II- and forskolin-evoked aldosterone synthesis in a human zona glomerulosa cell line." Mol Pharmacol **50**(2): 430-5.
- Ono, K., T. Mannami, et al. (2002). "A single-nucleotide polymorphism in C-type natriuretic peptide gene may be associated with hypertension." Hypertens Res **25**(5): 727-30.
- Onuoha, G. N., D. P. Nicholls, et al. (1998). "Neuropeptide secretion in exercise." Neuropeptides **32**(4): 319-25.
- Otsuka, K., H. Tanaka, et al. (2002). "Functional contribution of voltage-dependent and Ca²⁺ activated K⁺ (BK(Ca)) channels to the relaxation of guinea-pig aorta in response to natriuretic peptides." J Smooth Muscle Res **38**(4-5): 117-29.
- Ottemann, K. M., W. Xiao, et al. (1999). "A piston model for transmembrane signaling of the aspartate receptor." Science **285**(5434): 1751-4.
- Padayatti, P. S., P. Pattanaik, et al. (2004). "Structural insights into the regulation and the activation mechanism of mammalian guanylyl cyclases." Pharmacol Ther **104**(2): 83-99.
- Pagano, M. and M. B. Anand-Srivastava (2001). "Cytoplasmic domain of natriuretic peptide receptor C constitutes Gi activator sequences that inhibit adenylyl cyclase activity." J Biol Chem **276**(25): 22064-70.
- Pagel-Langenickel, I., J. Buttgerit, et al. (2007). "Natriuretic peptide receptor B signaling in the cardiovascular system: protection from cardiac hypertrophy." J Mol Med **85**(8): 797-810.
- Palczewski, K., I. Sokal, et al. (2004). "Guanylate cyclase-activating proteins: structure, function, and diversity." Biochem Biophys Res Commun **322**(4): 1123-30.

- Pandey, K. N. (2005). "Biology of natriuretic peptides and their receptors." Peptides **26**(6): 901-32.
- Pandey, K. N. (2005). "Internalization and trafficking of guanylyl cyclase/natriuretic peptide receptor-A." Peptides **26**(6): 985-1000.
- Pankow, K., Y. Wang, et al. (2007). "Successive action of meprin A and neprilysin catabolizes B-type natriuretic peptide." Circ Res **101**(9): 875-82.
- Parat, M., N. McNicoll, et al. (2008). "Role of extracellular domain dimerization in agonist-induced activation of natriuretic peptide receptor A." Mol Pharmacol **73**(2): 431-40.
- Patel, J. B., M. L. Valencik, et al. (2005). "Cardiac-specific attenuation of natriuretic peptide A receptor activity accentuates adverse cardiac remodeling and mortality in response to pressure overload." Am J Physiol Heart Circ Physiol **289**(2): H777-84.
- Pedro, L., R. Fenrick, et al. (1998). "Characterization of the phosphorylation state of natriuretic peptide receptor-C." Mol Cell Biochem **178**(1-2): 95-101.
- Pfeifer, A., A. Aszodi, et al. (1996). "Intestinal secretory defects and dwarfism in mice lacking cGMP-dependent protein kinase II." Science **274**(5295): 2082-6.
- Pfeifer, A., P. Klatt, et al. (1998). "Defective smooth muscle regulation in cGMP kinase I-deficient mice." EMBO J **17**(11): 3045-51.
- Pfeifer, A., P. Ruth, et al. (1999). "Structure and function of cGMP-dependent protein kinases." Rev Physiol Biochem Pharmacol **135**: 105-49.
- Poirier, H., J. Labrecque, et al. (2002). "Allotopic antagonism of the non-peptide atrial natriuretic peptide (ANP) antagonist HS-142-1 on natriuretic peptide receptor NPR-A." Biochem J **362**(Pt 1): 231-7.
- Potter, L. R. (1998). "Phosphorylation-dependent regulation of the guanylyl cyclase-linked natriuretic peptide receptor B: dephosphorylation is a mechanism of desensitization." Biochemistry **37**(8): 2422-9.
- Potter, L. R., S. Abbey-Hosch, et al. (2006). "Natriuretic peptides, their receptors, and cyclic guanosine monophosphate-dependent signaling functions." Endocr Rev **27**(1): 47-72.
- Potter, L. R. and D. L. Garbers (1992). "Dephosphorylation of the guanylyl cyclase-A receptor causes desensitization." J Biol Chem **267**(21): 14531-4.
- Potter, L. R. and D. L. Garbers (1994). "Protein kinase C-dependent desensitization of the atrial natriuretic peptide receptor is mediated by dephosphorylation." J Biol Chem **269**(20): 14636-42.
- Potter, L. R. and T. Hunter (1998). "Identification and characterization of the major phosphorylation sites of the B-type natriuretic peptide receptor." J Biol Chem **273**(25): 15533-9.
- Potter, L. R. and T. Hunter (1999). "A constitutively "phosphorylated" guanylyl cyclase-linked atrial natriuretic peptide receptor mutant is resistant to desensitization." Mol Biol Cell **10**(6): 1811-20.
- Potter, L. R. and T. Hunter (1999). "Identification and characterization of the phosphorylation sites of the guanylyl cyclase-linked natriuretic peptide receptors A and B." Methods **19**(4): 506-20.
- Potter, L. R. and T. Hunter (2000). "Activation of protein kinase C stimulates the dephosphorylation of natriuretic peptide receptor-B at a single serine residue: a possible mechanism of heterologous desensitization." J Biol Chem **275**(40): 31099-106.

- Potter, L. R. and T. Hunter (2001). "Guanylyl cyclase-linked natriuretic peptide receptors: structure and regulation." *J Biol Chem* **276**(9): 6057-60.
- Potter, L. R., A. R. Yoder, et al. (2009). "Natriuretic peptides: their structures, receptors, physiologic functions and therapeutic applications." *Handb Exp Pharmacol*(191): 341-66.
- Qian, J. Y., A. Haruno, et al. (2002). "Local expression of C-type natriuretic peptide suppresses inflammation, eliminates shear stress-induced thrombosis, and prevents neointima formation through enhanced nitric oxide production in rabbit injured carotid arteries." *Circ Res* **91**(11): 1063-9.
- Qiu, Y., H. Ogawa, et al. (2004). "Constitutive activation and uncoupling of the atrial natriuretic peptide receptor by mutations at the dimer interface. Role of the dimer structure in signalling." *J Biol Chem* **279**(7): 6115-23.
- Rahmutula, D., T. Nakayama, et al. (2002). "Structure and polymorphisms of the human natriuretic peptide receptor C gene." *Endocrine* **17**(2): 85-90.
- Ramamurthy, V., C. Tucker, et al. (2001). "Interactions within the coiled-coil domain of RetGC-1 guanylyl cyclase are optimized for regulation rather than for high affinity." *J Biol Chem* **276**(28): 26218-29.
- Ramarao, C. S. and D. L. Garbers (1985). "Receptor-mediated regulation of guanylate cyclase activity in spermatozoa." *J Biol Chem* **260**(14): 8390-6.
- Rauch, A., M. Leipelt, et al. (2008). "Crystal structure of the guanylyl cyclase Cya2." *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**(41): 15720-5.
- Rehemudula, D., T. Nakayama, et al. (1999). "Structure of the type B human natriuretic peptide receptor gene and association of a novel microsatellite polymorphism with essential hypertension." *Circ Res* **84**(5): 605-10.
- Remy, I., I. A. Wilson, et al. (1999). "Erythropoietin receptor activation by a ligand-induced conformation change." *Science* **283**(5404): 990-3.
- Richards, A. M., J. G. Lainchbury, et al. (2002). "Dendroaspis natriuretic peptide: endogenous or dubious?" *Lancet* **359**(9300): 5-6.
- Richards, A. M., J. G. Lainchbury, et al. (2004). "Clinical applications of B-type natriuretic peptides." *Trends Endocrinol Metab* **15**(4): 170-4.
- Richards, A. M., D. McDonald, et al. (1988). "Atrial natriuretic hormone has biological effects in man at physiological plasma concentrations." *J Clin Endocrinol Metab* **67**(6): 1134-9.
- Richards, A. M., G. Tonolo, et al. (1988). "Low dose infusions of 26- and 28-amino acid human atrial natriuretic peptides in normal man." *J Clin Endocrinol Metab* **66**(3): 465-72.
- Riter, H. G., M. M. Redfield, et al. (2006). "Nonhypotensive low-dose nesiritide has differential renal effects compared with standard-dose nesiritide in patients with acute decompensated heart failure and renal dysfunction." *J Am Coll Cardiol* **47**(11): 2334-5.
- Rondeau, J. J., N. McNicoll, et al. (1995). "Stoichiometry of the atrial natriuretic factor-R1 receptor complex in the bovine zona glomerulosa." *Biochemistry* **34**(7): 2130-6.
- Rose, R. A. and W. R. Giles (2008). "Natriuretic peptide C receptor signalling in the heart and vasculature." *J Physiol* **586**(2): 353-66.
- Rosenkranz, A. C., R. L. Woods, et al. (2003). "Antihypertrophic actions of the natriuretic peptides in adult rat cardiomyocytes: importance of cyclic GMP." *Cardiovasc Res* **57**(2): 515-22.

- Rowlinson, S. W., H. Yoshizato, et al. (2008). "An agonist-induced conformational change in the growth hormone receptor determines the choice of signalling pathway." *Nat Cell Biol* **10**(6): 740-7.
- Ruan, W., V. Becker, et al. (2004). "The interface between self-assembling erythropoietin receptor transmembrane segments corresponds to a membrane-spanning leucine zipper." *J Biol Chem* **279**(5): 3273-9.
- Rubattu, S., G. Bigatti, et al. (2006). "Association of atrial natriuretic peptide and type a natriuretic peptide receptor gene polymorphisms with left ventricular mass in human essential hypertension." *J Am Coll Cardiol* **48**(3): 499-505.
- Rutledge, D. R., Y. Sun, et al. (1995). "Polymorphisms within the atrial natriuretic peptide gene in essential hypertension." *J Hypertens* **13**(9): 953-5.
- Sabbatini, M. E., M. R. Rodriguez, et al. (2005). "C-type natriuretic peptide applied to the brain enhances exocrine pancreatic secretion through a vagal pathway." *Eur J Pharmacol* **524**(1-3): 67-74.
- Sabrane, K., M. N. Kruse, et al. (2005). "Vascular endothelium is critically involved in the hypotensive and hypovolemic actions of atrial natriuretic peptide." *J Clin Invest* **115**(6): 1666-74.
- Sackner-Bernstein, J. D., M. Kowalski, et al. (2005). "Short-term risk of death after treatment with nesiritide for decompensated heart failure: a pooled analysis of randomized controlled trials." *JAMA* **293**(15): 1900-5.
- Sackner-Bernstein, J. D., H. A. Skopicki, et al. (2005). "Risk of worsening renal function with nesiritide in patients with acutely decompensated heart failure." *Circulation* **111**(12): 1487-91.
- Samson, W. K., M. C. Aguila, et al. (1987). "Hypothalamic action of atrial natriuretic factor to inhibit vasopressin secretion." *Peptides* **8**(3): 449-54.
- Sarzani, R., P. Dessi-Fulgheri, et al. (1996). "Expression of natriuretic peptide receptors in human adipose and other tissues." *J Endocrinol Invest* **19**(9): 581-5.
- Sarzani, R., V. M. Paci, et al. (1993). "Comparative analysis of atrial natriuretic peptide receptor expression in rat tissues." *J Hypertens Suppl* **11**(5): S214-5.
- Saxenhofer, H., A. Raselli, et al. (1990). "Urodilatin, a natriuretic factor from kidneys, can modify renal and cardiovascular function in men." *Am J Physiol* **259**(5 Pt 2): F832-8.
- Schaufele, F., X. Carbonell, et al. (2005). "The structural basis of androgen receptor activation: intramolecular and intermolecular amino-carboxy interactions." *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**(28): 9802-7.
- Schenk, D. B., M. N. Phelps, et al. (1987). "Purification and subunit composition of atrial natriuretic peptide receptor." *Proc Natl Acad Sci U S A* **84**(6): 1521-5.
- Schiebinger, R. J., M. Z. Baker, et al. (1987). "Effect of adrenergic and muscarinic cholinergic agonists on atrial natriuretic peptide secretion by isolated rat atria. Potential role of the autonomic nervous system in modulating atrial natriuretic peptide secretion." *J Clin Invest* **80**(6): 1687-91.
- Schirger, J. A., D. M. Heublein, et al. (1999). "Presence of Dendroaspis natriuretic peptide-like immunoreactivity in human plasma and its increase during human heart failure." *Mayo Clin Proc* **74**(2): 126-30.
- Schlosshauer, M. and D. Baker (2004). "Realistic protein-protein association rates from a simple diffusional model neglecting long-range interactions, free energy barriers, and landscape ruggedness." *Protein Sci* **13**(6): 1660-9.

- Schlossmann, J., A. Ammendola, et al. (2000). "Regulation of intracellular calcium by a signalling complex of IRAG, IP3 receptor and cGMP kinase Ibeta." Nature **404**(6774): 197-201.
- Schlossmann, J., R. Feil, et al. (2005). "Insights into cGMP signalling derived from cGMP kinase knockout mice." Front Biosci **10**: 1279-89.
- Schmidt, H., A. Stonkute, et al. (2007). "The receptor guanylyl cyclase Npr2 is essential for sensory axon bifurcation within the spinal cord." J Cell Biol **179**(2): 331-40.
- Schoenfeld, J. R., P. Sehl, et al. (1995). "Agonist selectivity for three species of natriuretic peptide receptor-A." Mol Pharmacol **47**(1): 172-80.
- Schulz-Knappe, P., K. Forssmann, et al. (1988). "Isolation and structural analysis of "urodilatin", a new peptide of the cardiodilatin-(ANP)-family, extracted from human urine." Klin Wochenschr **66**(17): 752-9.
- Schulz, S., C. K. Green, et al. (1990). "Guanylyl cyclase is a heat-stable enterotoxin receptor." Cell **63**(5): 941-8.
- Schulz, S., M. J. Lopez, et al. (1997). "Disruption of the guanylyl cyclase-C gene leads to a paradoxical phenotype of viable but heat-stable enterotoxin-resistant mice." J Clin Invest **100**(6): 1590-5.
- Schulz, S., S. Singh, et al. (1989). "The primary structure of a plasma membrane guanylate cyclase demonstrates diversity within this new receptor family." Cell **58**(6): 1155-62.
- Schulz, S., B. J. Wedel, et al. (1998). "The cloning and expression of a new guanylyl cyclase orphan receptor." J Biol Chem **273**(2): 1032-7.
- Schweitz, H., P. Vigne, et al. (1992). "A new member of the natriuretic peptide family is present in the venom of the green mamba (*Dendroaspis angusticeps*)." J Biol Chem **267**(20): 13928-32.
- Scotland, R. S., A. Ahluwalia, et al. (2005). "C-type natriuretic peptide in vascular physiology and disease." Pharmacol Ther **105**(2): 85-93.
- Scotland, R. S., M. Cohen, et al. (2005). "C-type natriuretic peptide inhibits leukocyte recruitment and platelet-leukocyte interactions via suppression of P-selectin expression." Proc Natl Acad Sci U S A **102**(40): 14452-7.
- Seebacher, T., E. Beitz, et al. (1999). "Expression of membrane-bound and cytosolic guanylyl cyclases in the rat inner ear." Hear Res **127**(1-2): 95-102.
- Selvin, P. R. (2000). "The renaissance of fluorescence resonance energy transfer." Nat Struct Biol **7**(9): 730-4.
- Sengenes, C., M. Berlan, et al. (2000). "Natriuretic peptides: a new lipolytic pathway in human adipocytes." FASEB J **14**(10): 1345-51.
- Sengenes, C., A. Zakaroff-Girard, et al. (2002). "Natriuretic peptide-dependent lipolysis in fat cells is a primate specificity." Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol **283**(1): R257-65.
- Sheppeck, J. E. n., C. M. Gauss, et al. (1997). "Inhibition of the Ser-Thr phosphatases PP1 and PP2A by naturally occurring toxins." Bioorg Med Chem **5**(9): 1739-50.
- Shi, S. J., H. T. Nguyen, et al. (2001). "Genetic disruption of atrial natriuretic peptide receptor-A alters renin and angiotensin II levels." Am J Physiol Renal Physiol **281**(4): F665-73.
- Silberbach, M. and C. T. J. Roberts (2001). "Natriuretic peptide signalling: molecular and cellular pathways to growth regulation." Cell Signal **13**(4): 221-31.

- Singh, G., R. E. Kuc, et al. (2006). "Novel snake venom ligand dendroaspis natriuretic peptide is selective for natriuretic peptide receptor-A in human heart: downregulation of natriuretic peptide receptor-A in heart failure." Circ Res **99**(2): 183-90.
- Singh, S., D. G. Lowe, et al. (1988). "Membrane guanylate cyclase is a cell-surface receptor with homology to protein kinases." Nature **334**(6184): 708-12.
- Skidgel, R. A., S. Engelbrecht, et al. (1984). "Hydrolysis of substance p and neurotensin by converting enzyme and neutral endopeptidase." Peptides **5**(4): 769-76.
- Skryabin, B. V., R. Holtwick, et al. (2004). "Hypervolemic hypertension in mice with systemic inactivation of the (floxed) guanylyl cyclase-A gene by alphaMHC-Cre-mediated recombination." Genesis **39**(4): 288-98.
- Soeki, T., I. Kishimoto, et al. (2005). "C-type natriuretic peptide, a novel antifibrotic and antihypertrophic agent, prevents cardiac remodeling after myocardial infarction." J Am Coll Cardiol **45**(4): 608-16.
- Sokol, D. L., X. Zhang, et al. (1998). "Real time detection of DNA:RNA hybridization in living cells." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(20): 11538-43.
- Soualmia, H., C. Barthelemy, et al. (1997). "Angiotensin II-induced phosphoinositide production and atrial natriuretic peptide release in rat atrial tissue." J Cardiovasc Pharmacol **29**(5): 605-11.
- Stasch, J. P., C. Hirth-Dietrich, et al. (1989). "Endothelin stimulates release of atrial natriuretic peptides in vitro and in vivo." Life Sci **45**(10): 869-75.
- Steinbrecher, K. A., S. A. Wowk, et al. (2002). "Targeted inactivation of the mouse guanylin gene results in altered dynamics of colonic epithelial proliferation." Am J Pathol **161**(6): 2169-78.
- Steinhilber, M. E., K. L. Cochran, et al. (1990). "Hypotension in transgenic mice expressing atrial natriuretic factor fusion genes." Hypertension **16**(3): 301-7.
- Stingo, A. J., A. L. Clavell, et al. (1992). "Presence of C-type natriuretic peptide in cultured human endothelial cells and plasma." Am J Physiol **263**(4 Pt 2): H1318-21.
- Stoupakis, G. and M. Klapholz (2003). "Natriuretic peptides: biochemistry, physiology, and therapeutic role in heart failure." Heart Dis **5**(3): 215-23.
- Stryer, L. (1978). "Fluorescence energy transfer as a spectroscopic ruler." Annu Rev Biochem **47**: 819-46.
- Stryer, L. and R. P. Haugland (1967). "Energy transfer: a spectroscopic ruler." Proc Natl Acad Sci U S A **58**(2): 719-26.
- Stults, J. T., K. L. O'Connell, et al. (1994). "The disulfide linkages and glycosylation sites of the human natriuretic peptide receptor-C homodimer." Biochemistry **33**(37): 11372-81.
- Suda, M., Y. Ogawa, et al. (1998). "Skeletal overgrowth in transgenic mice that overexpress brain natriuretic peptide." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(5): 2337-42.
- Sudoh, T., K. Kangawa, et al. (1988). "A new natriuretic peptide in porcine brain." Nature **332**(6159): 78-81.
- Sudoh, T., N. Minamino, et al. (1990). "C-type natriuretic peptide (CNP): a new member of natriuretic peptide family identified in porcine brain." Biochem Biophys Res Commun **168**(2): 863-70.
- Suga, S., H. Itoh, et al. (1993). "Cytokine-induced C-type natriuretic peptide (CNP) secretion from vascular endothelial cells--evidence for CNP as a novel

- autocrine/paracrine regulator from endothelial cells." Endocrinology **133**(6): 3038-41.
- Suga, S., K. Nakao, et al. (1992). "Receptor selectivity of natriuretic peptide family, atrial natriuretic peptide, brain natriuretic peptide, and C-type natriuretic peptide." Endocrinology **130**(1): 229-39.
- Suga, S., K. Nakao, et al. (1992). "Receptor selectivity of natriuretic peptide family, atrial natriuretic peptide, brain natriuretic peptide, and C-type natriuretic peptide." Endocrinology **130**(1): 229-39.
- Suga, S., K. Nakao, et al. (1992). "Endothelial production of C-type natriuretic peptide and its marked augmentation by transforming growth factor-beta. Possible existence of "vascular natriuretic peptide system"." J Clin Invest **90**(3): 1145-9.
- Sugiyama, S., K. Kugiyama, et al. (1995). "Lipoproteins regulate C-type natriuretic peptide secretion from cultured vascular endothelial cells." Arterioscler Thromb Vasc Biol **15**(11): 1968-74.
- Swayze, R. D. and A. P. Braun (2001). "A catalytically inactive mutant of type I cGMP-dependent protein kinase prevents enhancement of large conductance, calcium-sensitive K⁺ channels by sodium nitroprusside and cGMP." J Biol Chem **276**(23): 19729-37.
- Syed, R. S., S. W. Reid, et al. (1998). "Efficiency of signalling through cytokine receptors depends critically on receptor orientation." Nature **395**(6701): 511-6.
- Takahashi, N., Y. Saito, et al. (2003). "Angiotensin II-induced ventricular hypertrophy and extracellular signal-regulated kinase activation are suppressed in mice overexpressing brain natriuretic peptide in circulation." Hypertens Res **26**(10): 847-53.
- Takahashi, Y., T. Nakayama, et al. (1998). "Organization of the human natriuretic peptide receptor A gene." Biochem Biophys Res Commun **246**(3): 736-9.
- Takayanagi, R., R. M. Snajdar, et al. (1987). "Purification and characterization of two types of atrial natriuretic factor receptors from bovine adrenal cortex: guanylate cyclase-linked and cyclase-free receptors." Biochem Biophys Res Commun **144**(1): 244-50.
- Tamura, N., L. K. Doolittle, et al. (2004). "Critical roles of the guanylyl cyclase B receptor in endochondral ossification and development of female reproductive organs." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(49): 17300-5.
- Tamura, N. and D. L. Garbers (2003). "Regulation of the guanylyl cyclase-B receptor by alternative splicing." J Biol Chem **278**(49): 48880-9.
- Tamura, N., Y. Ogawa, et al. (2000). "Cardiac fibrosis in mice lacking brain natriuretic peptide." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(8): 4239-44.
- Tan, A. C., F. G. Russel, et al. (1993). "Atrial natriuretic peptide. An overview of clinical pharmacology and pharmacokinetics." Clin Pharmacokinet **24**(1): 28-45.
- Tanner, K. G. and J. Kyte (1999). "Dimerization of the extracellular domain of the receptor for epidermal growth factor containing the membrane-spanning segment in response to treatment with epidermal growth factor." J Biol Chem **274**(50): 35985-90.
- Tao, R. H. and I. N. Maruyama (2008). "All EGF(ErbB) receptors have preformed homo- and heterodimeric structures in living cells." J Cell Sci **121**(Pt 19): 3207-17.

- Teixeira, C. C., H. Agoston, et al. (2008). "Nitric oxide, C-type natriuretic peptide and cGMP as regulators of endochondral ossification." Dev Biol **319**(2): 171-8.
- Thomas, G., P. Moffatt, et al. (2003). "Osteocrin, a novel bone-specific secreted protein that modulates the osteoblast phenotype." J Biol Chem **278**(50): 50563-71.
- Tokudome, T., T. Horio, et al. (2004). "Inhibitory effect of C-type natriuretic peptide (CNP) on cultured cardiac myocyte hypertrophy: interference between CNP and endothelin-1 signaling pathways." Endocrinology **145**(5): 2131-40.
- Tolsa, J. F., Y. Gao, et al. (2002). "Differential responses of newborn pulmonary arteries and veins to atrial and C-type natriuretic peptides." Am J Physiol Heart Circ Physiol **282**(1): H273-80.
- Tsuneyoshi, H., T. Nishina, et al. (2004). "Atrial natriuretic peptide helps prevent late remodeling after left ventricular aneurysm repair." Circulation **110**(11 Suppl 1): II174-9.
- Tsuruda, T., G. Boerrigter, et al. (2002). "Brain natriuretic Peptide is produced in cardiac fibroblasts and induces matrix metalloproteinases." Circ Res **91**(12): 1127-34.
- Ulici, V., K. D. Hoenselaar, et al. (2008). "The PI3K pathway regulates endochondral bone growth through control of hypertrophic chondrocyte differentiation." BMC Dev Biol **8**: 40.
- Vaandrager, A. B. (2002). "Structure and function of the heat-stable enterotoxin receptor/guanylyl cyclase C." Mol Cell Biochem **230**(1-2): 73-83.
- van den Akker, F. (2001). "Structural insights into the ligand binding domains of membrane bound guanylyl cyclases and natriuretic peptide receptors." J Mol Biol **311**(5): 923-37.
- van den Akker, F., X. Zhang, et al. (2000). "Structure of the dimerized hormone-binding domain of a guanylyl-cyclase-coupled receptor." Nature **406**(6791): 101-4.
- van der Zander, K., A. J. Houben, et al. (1999). "Effects of brain natriuretic peptide on forearm vasculature: comparison with atrial natriuretic peptide." Cardiovasc Res **44**(3): 595-600.
- Vanderheyden, M., J. Bartunek, et al. (2009). "Dipeptidyl-peptidase IV and B-type natriuretic peptide. From bench to bedside." Clin Chem Lab Med **47**(3): 248-52.
- Vandlen, R. L., K. E. Arcuri, et al. (1985). "Identification of a receptor for atrial natriuretic factor in rabbit aorta membranes by affinity cross-linking." J Biol Chem **260**(20): 10889-92.
- Veale, C. A., V. C. Alford, et al. (2000). "The discovery of non-basic atrial natriuretic peptide clearance receptor antagonists. Part 1." Bioorg Med Chem Lett **10**(17): 1949-52.
- Vellaichamy, E., M. L. Khurana, et al. (2005). "Involvement of the NF-kappa B/matrix metalloproteinase pathway in cardiac fibrosis of mice lacking guanylyl cyclase/natriuretic peptide receptor A." J Biol Chem **280**(19): 19230-42.
- Vellaichamy, E., N. K. Sommana, et al. (2005). "Reduced cGMP signaling activates NF-kappaB in hypertrophied hearts of mice lacking natriuretic peptide receptor-A." Biochem Biophys Res Commun **327**(1): 106-11.

- Vieira, M. A., M. Gao, et al. (2001). "Molecular and cellular physiology of the dissociation of atrial natriuretic peptide from guanylyl cyclase a receptors." J Biol Chem **276**(39): 36438-45.
- Villardaga, J. P., M. Bunemann, et al. (2003). "Measurement of the millisecond activation switch of G protein-coupled receptors in living cells." Nat Biotechnol **21**(7): 807-12.
- Villar, I. C., C. M. Panayiotou, et al. (2007). "Definitive role for natriuretic peptide receptor-C in mediating the vasorelaxant activity of C-type natriuretic peptide and endothelium-derived hyperpolarising factor." Cardiovasc Res **74**(3): 515-25.
- Vollmar, A. M. (2005). "The role of atrial natriuretic peptide in the immune system." Peptides **26**(6): 1086-94.
- von Geldern, T. W., G. P. Budzik, et al. (1990). "Atrial natriuretic peptide antagonists: biological evaluation and structural correlations." Mol Pharmacol **38**(6): 771-8.
- von Geldern, T. W., T. W. Rockway, et al. (1992). "Small atrial natriuretic peptide analogues: design, synthesis, and structural requirements for guanylate cyclase activation." J Med Chem **35**(5): 808-16.
- Wada, A., M. Hasegawa, et al. (1996). "The significance of Ser1029 of the heat-stable enterotoxin receptor (STaR): relation of STa-mediated guanylyl cyclase activation and signaling by phorbol myristate acetate." FEBS Lett **384**(1): 75-7.
- Wagner, C., A. Pfeifer, et al. (1998). "Role of cGMP-kinase II in the control of renin secretion and renin expression." J Clin Invest **102**(8): 1576-82.
- Waldman, S. A., R. M. Rapoport, et al. (1984). "Atrial natriuretic factor selectively activates particulate guanylate cyclase and elevates cyclic GMP in rat tissues." J Biol Chem **259**(23): 14332-4.
- Wang, D., S. Oparil, et al. (2003). "Effects of pressure overload on extracellular matrix expression in the heart of the atrial natriuretic peptide-null mouse." Hypertension **42**(1): 88-95.
- Wang, W., Y. Ou, et al. (2004). "AlbuBNP, a recombinant B-type natriuretic peptide and human serum albumin fusion hormone, as a long-term therapy of congestive heart failure." Pharm Res **21**(11): 2105-11.
- Wang, Y., M. C. de Waard, et al. (2007). "Cardiomyocyte-restricted over-expression of C-type natriuretic peptide prevents cardiac hypertrophy induced by myocardial infarction in mice." Eur J Heart Fail **9**(6-7): 548-57.
- Wazni, O. M., D. O. Martin, et al. (2004). "Plasma B-type natriuretic peptide levels predict postoperative atrial fibrillation in patients undergoing cardiac surgery." Circulation **110**(2): 124-7.
- Weber, W., W. Fischli, et al. (1991). "Anantin--a peptide antagonist of the atrial natriuretic factor (ANF). I. Producing organism, fermentation, isolation and biological activity." J Antibiot (Tokyo) **44**(2): 164-71.
- Wei, C. M., S. Hu, et al. (1994). "Vascular actions of C-type natriuretic peptide in isolated porcine coronary arteries and coronary vascular smooth muscle cells." Biochem Biophys Res Commun **205**(1): 765-71.
- Wei, C. M., C. H. Kim, et al. (1993). "Vasonatrin peptide: a unique synthetic natriuretic and vasorelaxing peptide." J Clin Invest **92**(4): 2048-52.
- Weidmann, P., L. Hasler, et al. (1986). "Blood levels and renal effects of atrial natriuretic peptide in normal man." J Clin Invest **77**(3): 734-42.

- Westendorp, R. G., R. Draijer, et al. (1994). "Cyclic-GMP-mediated decrease in permeability of human umbilical and pulmonary artery endothelial cell monolayers." J Vasc Res **31**(1): 42-51.
- Wilson, E. M. and M. Chinkers (1995). "Identification of sequences mediating guanylyl cyclase dimerization." Biochemistry **34**(14): 4696-701.
- Winger, J. A., E. R. Derbyshire, et al. (2008). "The crystal structure of the catalytic domain of a eukaryotic guanylate cyclase." BMC Struct Biol **8**: 42.
- Winquist, R. J., E. P. Faison, et al. (1984). "Atrial natriuretic factor elicits an endothelium-independent relaxation and activates particulate guanylate cyclase in vascular smooth muscle." Proc Natl Acad Sci U S A **81**(23): 7661-4.
- Woodard, G. E. and J. A. Rosado (2007). "Recent advances in natriuretic peptide research." J Cell Mol Med **11**(6): 1263-71.
- Wu, C., F. Wu, et al. (2003). "Furin-mediated processing of Pro-C-type natriuretic peptide." J Biol Chem **278**(28): 25847-52.
- Yan, W., F. Wu, et al. (2000). "Corin, a transmembrane cardiac serine protease, acts as a pro-atrial natriuretic peptide-converting enzyme." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(15): 8525-9.
- Yandle, T. G. (1994). "Biochemistry of natriuretic peptides." J Intern Med **235**(6): 561-76.
- Yandle, T. G., S. O. Brennan, et al. (1989). "Endopeptidase-24.11 in human plasma degrades atrial natriuretic factor (ANF) to ANF(99-105/106-126)." Peptides **10**(4): 891-4.
- Yang, R. B., D. C. Foster, et al. (1995). "Two membrane forms of guanylyl cyclase found in the eye." Proc Natl Acad Sci U S A **92**(2): 602-6.
- Yang, R. B., S. W. Robinson, et al. (1999). "Disruption of a retinal guanylyl cyclase gene leads to cone-specific dystrophy and paradoxical rod behavior." J Neurosci **19**(14): 5889-97.
- Yap, L. B., D. Mukerjee, et al. (2004). "Natriuretic peptides, respiratory disease, and the right heart." Chest **126**(4): 1330-6.
- Yasoda, A., H. Kitamura, et al. (2009). "Systemic administration of C-type natriuretic peptide as a novel therapeutic strategy for skeletal dysplasias." Endocrinology.
- Yasoda, A., Y. Komatsu, et al. (2004). "Overexpression of CNP in chondrocytes rescues achondroplasia through a MAPK-dependent pathway." Nat Med **10**(1): 80-6.
- Yasoda, A., Y. Ogawa, et al. (1998). "Natriuretic peptide regulation of endochondral ossification. Evidence for possible roles of the C-type natriuretic peptide/guanylyl cyclase-B pathway." J Biol Chem **273**(19): 11695-700.
- Yasue, H., M. Yoshimura, et al. (1994). "Localization and mechanism of secretion of B-type natriuretic peptide in comparison with those of A-type natriuretic peptide in normal subjects and patients with heart failure." Circulation **90**(1): 195-203.
- Yeung, V. T., S. K. Ho, et al. (1996). "Binding of CNP-22 and CNP-53 to cultured mouse astrocytes and effects on cyclic GMP." Peptides **17**(1): 101-6.
- Yip, C. C., L. P. Laing, et al. (1985). "Photoaffinity labeling of atrial natriuretic factor receptors of rat kidney cortex plasma membranes." J Biol Chem **260**(14): 8229-32.

- Yoshimura, M., H. Yasue, et al. (1993). "Different secretion patterns of atrial natriuretic peptide and brain natriuretic peptide in patients with congestive heart failure." Circulation **87**(2): 464-9.
- Zhang, G., Y. Liu, et al. (1997). "Structure of the adenylyl cyclase catalytic core." Nature **386**(6622): 247-53.
- Zhou, H. and K. S. Murthy (2003). "Identification of the G protein-activating sequence of the single-transmembrane natriuretic peptide receptor C (NPR-C)." Am J Physiol Cell Physiol **284**(5): C1255-61.