

L'enzyme de conversion de l'angiotensine : une protéase conservée au cours de l'évolution

Guillaume Rivière

UMR M100 IFREMER/UCBN « Physiologie et Écophysiologie des Mollusques Marins » Université de Caen Basse-Normandie, Bâtiment Sciences C, Campus I, Esplanade de la Paix, 14000 Caen, France

Auteur correspondant : Guillaume Rivière, Guillaume.riviere@unicaen.fr

Reçu le 29 septembre 2009

Résumé – L'Enzyme de Conversion de l'Angiotensine (ECA) est cruciale dans l'homéostasie vasculaire des Mammifères. Chez l'Homme, trois ECAs co-existent. L'ECA somatique (ECAso) produit l'angiotensine II vasoactive. L'ECA testiculaire (ECAt), est indispensable à la fertilité. L'ECA2, codée par un autre gène, possède un rôle antagoniste à celui de l'ECAso. Plusieurs ECAs ont été clonées chez les Insectes, pourtant dépourvus de système circulatoire fermé. Ces enzymes sont impliquées dans le développement et la reproduction. Bien qu'aucune séquence du génome de *Cænorhabditis elegans* ne code pour une ECA fonctionnelle, une enzyme active est néanmoins présente chez un organisme encore plus distant, la sangsue. Cette enzyme est majoritairement exprimée dans le tractus digestif. Sa présence chez les Lophotrochozoaires pose les questions de l'apparition de l'ECA et de ses fonctions originelles. En outre, l'apport récent de nombreuses données génomiques a révélé la présence surprenante d'orthologues chez des groupes encore plus distants, dont les Cnidaires, les Placozoaires, et même de nombreux Procaryotes. Par ailleurs, la caractérisation d'une ECA active chez une Protéobactérie indique que l'enzyme ancestrale serait fonctionnelle. Ainsi, l'ECA est présente des Procaryotes aux Mammifères. Ses propriétés moléculaires, biochimiques et structurales sont incroyablement conservées. L'absence d'ECA dans tous les génomes d'Eucaryotes biconques séquencés à ce jour pourrait alors résulter d'une perte secondaire. L'ensemble de ces éléments suggère que l'ECA serait apparue très tôt au cours de la phylogenèse. Les caractéristiques de l'ECA mammalienne refléteraient la longue évolution d'une enzyme ancestrale peu spécialisée, dont les fonctions restent énigmatiques.

Mots clés : Enzyme de conversion de l'angiotensine / évolution / protéase / conservation

Abstract – Angiotensin-converting enzyme: a protease conserved during evolution.

The Angiotensin-Converting Enzyme (ACE) is crucial for vascular homeostasis in mammals. Three isoforms are present in the human. The somatic ACE (sACE) generates the vasoactive angiotensin II. The testicular isoform (tACE) is required for male fertility. ACE2 was cloned from another gene and displays an antagonistic role. Several ACEs were cloned from insects, despite their lack of a closed circulatory system. Insect isoforms are implied in reproduction and development. No sequence in the *C. elegans* genome is able to encode a functional enzyme. Nevertheless, an active ACE was characterized in an even more distant organism, the leech, in which the enzyme is mainly expressed within the digestive tract. The presence of ACE in lophotrochozoans raises questions about the appearance and original functions of the enzyme. Besides, the recent availability of genomic data unraveled the putative presence of orthologues in even more distant phyla such as cnidaria, placozoa and even many procaryotes. Moreover, the characterization of an active ACE in a proteobacteria indicates that the ancestor isoform was already functional. Thus, ACE is present from bacteria to mammals and exhibits incredibly conserved molecular, biochemical as well as structural

features. The absence of ACE in all eucaryotic bionts could thus result from a secondary loss. Taken together, these data suggest that ACE appeared early during the course of evolution. Mammalian ACE features could thus be a result of the long evolutive specialization of an ancient protease whose physiological functions remain to be elucidated.

Key words: Angiotensin-converting enzyme / evolution / protease / conservation

Introduction

L'enzyme de conversion de l'angiotensine (ECA) est un acteur fondamental de l'homéostasie vasculaire chez les Mammifères (pour revue voir Corvol *et al.*, 1995). Chez l'Homme, trois ECAs co-existent. L'ECA somatique (ECAso), qui possède deux domaines homologues, est cruciale pour la production d'angiotensine (ang) II vasoactive et son inhibition est utilisée dans le traitement de l'hypertension. L'ECA testiculaire (ECAt), codée par le même gène, est indispensable à la fertilité. Plus récemment clonée, l'ECA2, comme l'ECAt, ne possède qu'un site actif. L'ECA2 est codée par un autre gène et possède un rôle antagoniste de celui de l'ECAso. Cependant, les deux enzymes présentent chez le rat une distribution très étendue ainsi que de forts niveaux d'expression dans des organes sans lien apparent avec la pression artérielle, comme l'intestin (Rivière *et al.*, 2005). Ces données suggèrent l'existence d'autres fonctions de l'ECA négligées en raison de son rôle clé dans la régulation de l'homéostasie vasculaire des Mammifères. Plusieurs ECAs ont été clonées chez les Insectes (pour revue voir Macours & Hens, 2004), pourtant dépourvus de système circulatoire fermé. Ces enzymes sont impliquées dans le développement et la reproduction. Aucune séquence du génome de *Caenorhabditis elegans* ne code pour une ECA fonctionnelle, cependant, une ECA est présente et active chez un organisme encore plus distant, la sangsue *Theromyzon tessulatum* (Rivière *et al.*, 2004). Cette enzyme, qui est majoritairement exprimée dans le tractus digestif, ressemble au domaine N-terminal de l'ECAso. Sa présence chez les Lophotrochozoaires pose les questions de l'apparition de l'ECA et de ses fonctions originelles. De plus, l'apport récent de nombreuses données génomiques a révélé la présence tout à fait surprenante d'homologues de l'ECA chez des groupes encore plus distants, dont les Cnidaires, les Placozoaires, et même de très nombreux Procaryotes. Par ailleurs, la caractérisation de l'ECA chez la Protéobactérie *Xanthomonas* prouve que l'enzyme procaryote est fonctionnelle (Rivière *et al.*, 2007). Ainsi, l'ECA est présente des Procaryotes aux Mammifères. Ses propriétés moléculaires, biochimiques et structurales, sont incroyablement conservées, bien que l'ECA soit absente chez les Eucaryotes biontes. Cette absence dans

tous les génomes de végétaux supérieurs séquencés à ce jour pourrait résulter d'une perte secondaire. L'ensemble de ces éléments suggère que l'ECA serait apparue très tôt au cours de la phylogenèse, et que l'ECA mammalienne résulterait de l'évolution et de la spécialisation d'une enzyme ancestrale.

L'ECA chez les Vertébrés

Aspects moléculaires

L'enzyme de conversion de l'angiotensine ou ECA est une métalloprotéase de la famille M2. Elle possède une activité dépendante du zinc et des ions chlorure qui repose sur un site actif caractéristique HEXxH. Elle libère un dipeptide à partir de l'extrémité carboxy-terminale de ses substrats et se comporte à cet égard comme une dicarboxypeptidase. Comme son nom l'indique, l'enzyme de conversion de l'angiotensine a pour substrat caractéristique l'angiotensine I, qu'elle convertit en angiotensine II (pour revue voir Corvol *et al.*, 1995). Chez l'Homme, deux gènes distincts codent pour des ECAs, mais un gène unique code pour les formes somatique et germinale (Hubert *et al.*, 1991). À partir du promoteur situé le plus en 5' du gène, il code pour la forme somatique qui est prépondérante. Elle possède une longue partie aminoterminal extracellulaire qui comporte deux sites actifs homologues, nommés N- et C-domaines selon leur position respective au sein de la molécule (Wei *et al.*, 1991). La partie C-terminale correspond à un domaine transmembranaire et à une courte partie cytosolique. L'ECA germinale ou testiculaire est codée par le même gène à partir d'un promoteur alternatif. Cette isoforme ne possède qu'un seul site actif correspondant au site C-terminal. La partie extracellulaire peut être clivée par une sécrétase (Oppong & Hooper, 1993), ce qui libère les formes solubles de l'enzyme et module ainsi son activité catalytique (Woodman *et al.*, 2005). La structure tridimensionnelle de l'ECA germinale a été résolue par diffraction aux rayons X (Natesh *et al.*, 2003). L'ECA a une forme globale elliptique, un peu comme une « coquille de noix », creusée d'un sillon central, situé sous un couvercle formé par trois hélices α , et qui est le siège de l'activité catalytique.

Le gène comporte deux groupes homologues de huit exons (4 à 11 et 17 à 24) suggérant que le gène actuel de l'ECA humaine provient de la duplication d'un gène ancestral codant pour une ECA à site catalytique unique (Hubert *et al.*, 1991). Par ailleurs, des résultats très récents indiquent que l'expression de l'ECA est soumise à une régulation épigénétique. En effet, des différences dans les profils de méthylation du promoteur proximal induisent une expression différentielle selon le type cellulaire. L'altération de ce profil basal de méthylation augmente l'expression du transcrit *in vivo*, qui est parallèlement sous l'influence de la conformation des histones (Rivière *et al.*, en préparation). La finesse d'une telle régulation suggère également une très forte spécialisation évolutive de l'enzyme.

Le second gène a été décrit plus récemment et nommé ECA2 (Donoghue *et al.*, 2000; Crackower *et al.*, 2002). La protéine ECA2 ressemble à l'ECA germinale (Towler *et al.*, 2004), bien que l'enzyme soit fonctionnellement différente. En effet, l'ECA2 ne clive que le dernier acide aminé de ses substrats, et se comporte donc comme une monocarboxypeptidase. Elle possède un rôle antagoniste à celui de l'ECA, puisqu'elle intervient dans la production d'angiotensine 1-9 (Donoghue *et al.*, 2000) et d'angiotensine 1-7 (Li *et al.*, 2005) à partir des angiotensines I et II, respectivement. En outre l'ECA2 a été identifiée comme récepteur au coronavirus du syndrome respiratoire aigu sévère (SRAS) (Li *et al.*, 2003). Un troisième gène, ace3, a également été identifié chez les mammifères (Rella *et al.*, 2007), mais le pseudogène n'est pas exprimé chez l'Homme, et son produit chez la souris semble dépourvu d'activité ACE.

Aspects physiologiques

L'activité catalytique de l'ECA est responsable de son importance physiologique, notamment dans la régulation de l'homéostasie vasculaire des Mammifères. Au sein du système rénine-angiotensine (ou SRA), un long peptide, l'angiotensinogène, synthétisé par le foie, est clivé par la rénine activée au niveau rénal. Ceci génère l'angiotensine I, un décapeptide sans activité biologique connue. L'angiotensine I est à son tour convertie par l'ECA en angiotensine II, un octapeptide ayant de nombreux effets vasoactifs directs et indirects. De plus, l'ECA inactive la bradykinine, un peptide hypotenseur. Au sein du SRA, l'ECA2 possède un rôle antagoniste puisqu'elle génère respectivement de l'angiotensine 1-9 et de l'angiotensine 1-7 à partir des angiotensines I et II. Par ailleurs, l'ECA est indispensable à la fertilité. Bien que l'ECA semble capable de solubiliser les protéines à ancrage GPI, et que cette fonction ait été suggérée comme participant à la fécondation (Kondoh *et al.*, 2005), il a été

établi que l'activité peptidase est cruciale pour la fertilité (Fuchs *et al.*, 2005; Deguchi *et al.*, 2007).

L'ECA est impliquée dans de nombreux autres processus physiologiques *via* son activité sur des substrats définis. Ces interactions spécifiques, comme par exemple avec l'acétyl-SDKP au niveau des cellules souches hématopoïétiques ou de certaines hormones au niveau central, suggère une forte spécialisation évolutive (Figure 1).

Aspects évolutionnistes

Ainsi, il est remarquable de constater la très large distribution du messenger de l'ECA. En effet, chez le rat, l'ECA et l'ECA2 sont fortement exprimées dans les organes qui sont connus pour être d'importants régulateurs de la pression artérielle, comme le cœur, le rein et le poumon. Néanmoins, une cartographie de la localisation de l'expression de l'ARN messenger des deux enzymes chez l'Homme (Harmer *et al.*, 2002) et chez le rat a révélé que non seulement elle n'est pas limitée à ces organes, mais qu'elle est maximale au niveau du tractus digestif en général et de l'épithélium digestif en particulier, comme l'indique l'hybridation *in situ* (Rivière *et al.*, 2005). Ceci illustre un rôle digestif de l'ECA, en termes de dégradation carboxy-terminale des nutriments peptidiques. Or, ce profil d'expression est établi dès la vie fœtale, suggérant que la fonction digestive de l'ECA pourrait être une fonction importante au cours de l'évolution. Cette fonction de l'ECA, qui d'ailleurs ne requiert pas nécessairement d'interactions enzyme/substrat spécifiques, serait négligée chez les Vertébrés en raison du rôle pivot de l'enzyme dans la pression artérielle.

L'ECA est présente chez les Mammifères, comme l'Homme et le rat. Elle a également été caractérisée de façon générale chez les Vertébrés, comme par exemple chez les Oiseaux, bien que l'ECA testiculaire soit absente chez le poulet (Esther *et al.*, 1994). Des homologues de l'ECA et de l'ECA2 sont également présents chez les Poissons téléostéens, comme le poisson-zèbre (Genbank Accession number : XP_694336 et NM_001007297).

De façon encore plus distante, l'ECA est également présente et très conservée chez le lancelet (*Branchiostoma floridae* Genbank accession number XP_002239429). Des séquences codant pour des ECAs putatives sont également annotées chez la cione ou l'oursin. Cela indique que, englobant l'ensemble des Vertébrés, la présence de l'ECA est générale chez les Deutérostomiens, et qu'elle serait donc apparue il y a environ 540 millions d'années. Or, les Deutérostomiens distants possèdent un système circulatoire peu complexe, sans réelle problématique de

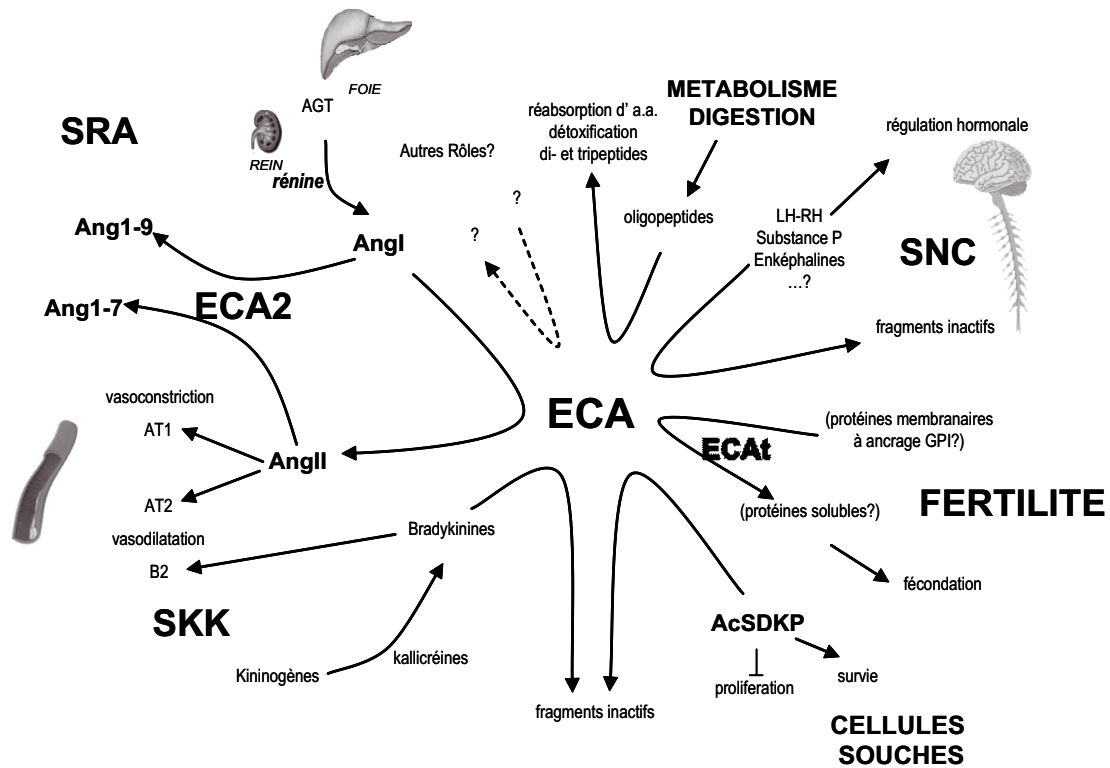


Fig. 1. Les rôles physiologiques de l'ECA. Représentation schématique des rôles physiologiques de l'ECA. SRA : système rénine-angiotensine, SKK : système kallibréine-kinine, SNC : système nerveux central.

pression artérielle. Ainsi, L'ECA pourrait être apparue de façon indépendante de cette fonction. Pour éclaircir ce point, il convient de considérer la situation chez les Arthropodes, des Invertébrés encore plus distants qui possèdent un système circulatoire ouvert.

Les isoformes d'ECA chez les Insectes

Chez la drosophile, six gènes codent pour des ECAs. Cependant, seulement deux d'entre eux, ACEr (Taylor *et al.*, 1996) et AnCE (Cornell *et al.*, 1995), codent pour des enzymes actives exprimées. Ces molécules sont solubles et possèdent un seul site actif. Elles sont toutes deux fonctionnelles en tant que protéases, et respectivement plus proches du site N-terminal et du site C-terminal de l'ECA somatique mammalienne (Houard *et al.*, 1998). La structure tridimensionnelle de l'ECA de drosophile est également tout à fait conservée, que ce soit au niveau de la forme générale de la molécule ou du sillon catalytique (Bingham *et al.*, 2006).

Des ECAs semblables ont été clonées chez la mouche à viande et le papillon *Bombyx mori* (Quan *et al.*, 2001), où l'enzyme est impliquée dans le développement et la reproduction. En effet, chez

la mouche *Neobellieria bullata*, de nombreux indices biochimiques relient l'ECA et la vitellogenèse (Vandingenen *et al.*, 2001, 2002). Par ailleurs, l'utilisation d'inhibiteurs d'ECA chez le moustique perturbe l'oviposition (Ekbote *et al.*, 2003).

L'ensemble de ces études suggère que, chez les Insectes, n'existent que des formes solubles à site catalytique unique. Les autres gènes apparentés à l'ECA pourraient alors refléter la duplication menant à l'apparition de l'ECA somatique des Vertébrés, qui possède deux sites catalytiques et un ancrage membranaire. Pourtant, parmi les neuf isoformes d'ECA codées dans le génome du moustique *Anopheles gambiae*, AnoACE 7 et 9 possèdent un ancrage membranaire. De plus, AnoACE 9 présente également deux sites actifs à l'instar de l'ACE somatique mammalienne (Burnham *et al.*, 2005).

Au moins quatre de ces isoformes sont exprimées, dont les formes transmembranaires. Leur niveau d'expression est augmenté à la suite d'un repas de sang, puis l'enzyme s'accumule dans l'ovaire en développement (Ekbote *et al.*, 1999). Par ailleurs, des inhibiteurs d'ECA réduisant la fécondité (Ekbote *et al.*, 2003), l'ECA de moustique serait un lien entre les fonctions digestives et reproductrices, ce qui est particulièrement intéressant dans le contexte de

l'évolution de l'enzyme chez ce parasite de mammifères.

L'ECA est donc présente, active et physiologiquement importante chez les Arthropodes, chez lesquels aucun autre élément du système rénine-angiotensine n'a été cloné. Cet état de fait soulève la question de l'existence de l'enzyme chez les Cuticulates encore plus distants, comme le Nématode *Cænorhabditis elegans*.

Une ECA dépourvue d'activité protéase chez *C. elegans*

Le séquençage du génome de *C. elegans* a montré qu'un seul gène codait pour une ECA putative, appelée ACN-1 (Brooks *et al.*, 2003). La structure primaire déduite indique qu'ACN-1 est soluble et qu'elle ne comporte qu'un seul domaine. Cependant, cette enzyme n'est pas fonctionnelle en tant que protéase. En effet, des résidus cruciaux pour l'activité catalytique ne sont pas conservés.

Néanmoins, l'utilisation de ribozymes dirigés contre ACN-1 a des effets délétères. Le ver ne peut plus se séparer de son ancienne cuticule lors de la mue, et présente une morphogénèse altérée. Ainsi, cette ECA dépourvue d'activité catalytique n'est pas pour autant dépourvue d'activité physiologique.

La présence d'ACN-1 chez *C. elegans* suggère que l'enzyme serait apparue avant la séparation entre les Arthropodes et les Nématodes. Elle existerait donc généralement chez les Cuticulates. Le fait qu'ACN-1 soit inactive pourrait indiquer qu'il s'agit du représentant actuel de la forme primitive de l'enzyme. L'activité protéase de l'ECA aurait alors pu émerger de façon précoce chez les Arthropodes. À la lumière des données actuellement disponibles, l'absence d'activité protéolytique d'ACN-1 semble en réalité en faire une exception évolutive plutôt que le représentant actuel de l'ECA originelle.

L'ECA chez les Lophotrochozoaires

Structure primaire, activité et fonctions biologiques putatives

En effet, de façon tout à fait intéressante, des données biochimiques suggéraient la présence de l'enzyme chez la sangsue (Laurent & Salzet, 1996; Vandenbulcke *et al.*, 1997). Il s'agit d'une Annélide, un clade considéré comme encore plus distant que les Nématodes puisque faisant partie des Lophotrochozoaires. La sangsue en question, *Theromyzon tessulatum*, est une Annélide parasite qui se nourrit du sang d'oiseaux aquatiques. La sangsue vit environ une année, au cours de laquelle elle ne prend

que trois repas de sang. Le troisième et dernier repas marque le début de la maturation sexuelle, une forte augmentation de la masse de l'animal ainsi que la fin des processus digestifs (Malecha, 1983). Le transcrite de l'ECA de sangsue a été cloné à partir d'une banque d'ADNc par marche sur chromosome grâce à des oligonucléotides dégénérés (Rivière *et al.*, 2004). La séquence primaire déduite révèle que cette enzyme possède un site actif unique et conservé, et qu'elle ne présente pas de domaine transmembranaire carboxy-terminal. En conséquence, l'enzyme mature est une protéine de 78 KD, soluble et à site actif unique, ressemblant à l'ECA des Insectes. Cependant, de manière tout à fait surprenante, elle présente une homologie de séquence maximale avec les enzymes de Vertébrés, et en particulier avec celle du poulet (53 % d'homologie, contre 47 et 41 % avec les domaines N-terminal et C-terminal humains, et environ 40 % avec les ECAs de drosophile).

De nombreuses données biochimiques ont également été collectées grâce à des études sur la protéine recombinante. Comme l'indiquent des tests en HPLC et fluorimétrie, l'ADNc cloné code pour une protéase fonctionnelle. L'enzyme de sangsue (appelée *TtACE*) est capable de cliver un dipeptide carboxy-terminal de divers substrats. En effet, elle libère de l'angiotensine II à partir de l'angiotensine I, de l'acKP à partir de l'acSDKP acétylé, et de l'acide hippurique à partir de l'hippuryl-histidyl-leucine. Dans cette mesure, l'ECA de sangsue, comme l'enzyme mammalienne, possède une activité dipeptidyl-carboxypeptidase. De plus, elle est active sur un substrat amidé, ce qui montre qu'elle possède également une activité endopeptidase. Ces activités sont totalement inhibées par le lisinopril, un inhibiteur spécifique de l'ECA, démontrant que l'enzyme de sangsue est une véritable ECA fonctionnelle. Par ailleurs, *TtACE* présente des caractéristiques d'inhibition semblables à celles du N-domaine de l'ECA somatique en regard de deux inhibiteurs spécifiques, le captopril et le lisinopril. De plus, son activité dépend de la concentration en ions chlorure, de manière similaire au N-domaine de l'ECA mammalienne.

Les fonctions biologiques précises de l'ECA de sangsue restent à définir, puisqu'à ce jour aucun substrat ou inhibiteur endogène n'a été caractérisé au niveau moléculaire. Toutefois, les résultats recueillis ont permis de spéculer sur ses fonctions. L'ECA de sangsue est exprimée tout au long de la vie de l'animal, et son niveau d'expression, qui est déjà maximal aux stades précoces du développement, est fortement réduit après le dernier repas de sang, lorsque les processus digestifs sont terminés. En outre, l'hybridation *in situ* indique que cette expression est restreinte aux cellules épithéliales de l'intestin, contrairement à la situation décrite chez les Vertébrés où

l'ECA est largement distribuée. Comme *TtACE* est une protéase fonctionnelle, ces éléments indiquent que l'enzyme pourrait participer à la dégradation des nutriments protéiques au sein du tractus digestif. Il est intéressant de constater que cette localisation est commune à toutes les espèces qui possèdent une ECA active, de la sangsue jusqu'à l'Homme.

L'ECA chez les Annélides, parasitisme et évolution

La sangsue étant un parasite hématophage des oiseaux aquatiques, la ressemblance entre l'ECA de sangsue et celle du poulet a suscité la question de l'influence du parasitisme dans l'homologie, voire la présence même de l'enzyme. Cependant, des données moléculaires indiquent que toutes les espèces d'Annélides aquatiques examinées, y compris les espèces non-parasites, présentent des enzymes qui sont d'une part toutes distinctes mais d'autre part toutes apparentées à l'ECA. La parfaite conservation de leur site actif HHEMGGH indique que ces enzymes seraient fonctionnelles. Enfin, les fortes homologies dans les alignements de séquence montrent que toutes les ECAs d'Annélides ressemblent à celles des Vertébrés. Ainsi, la présence d'ECA chez la sangsue, comme sa structure primaire, semble indépendante du mode de vie de l'animal, à moins de considérer que l'ensemble des Annélides soit primitivement parasite. Des études antérieures avaient suggéré que l'ECA ancestrale serait apparentée au site C-terminal de l'ECA somatique (Lattion *et al.*, 1989). Cependant, l'ECA originelle, représentée par l'enzyme de sangsue, serait du type N-domaine, en désaccord avec les spéculations précédentes.

En résumé, la structure de l'ECA de sangsue, soluble à site catalytique unique, rappelle celle des ECAs d'Insectes, bien que sa séquence primaire soit plus proche des enzymes de Vertébrés. Il s'agit d'une ECA fonctionnelle, dont l'activité ressemble à celle du N-domaine de l'ECA somatique des Mammifères. Son transcrite est exprimé tout au long de la vie de l'animal; sa distribution tissulaire ainsi que son profil d'expression suggèrent un rôle dans la digestion. De nouveaux éléments pourront être apportés par la caractérisation de l'ECA chez d'autres Lophotrochozoaires. À ce titre, des données moléculaires très récentes conduisent à penser que la situation serait en fait plus complexe. En effet, l'ECA a été récemment clonée chez un Mollusque. Comme l'enzyme de sangsue, elle possède un seul site actif et sa séquence est proche des ECAs de Vertébrés. En revanche, elle comprendrait un ancrage membranaire, et son expression laisse supposer un rôle dans la reproduction (Rivière *et al.*, en préparation).

Sur le plan évolutif, ces données apportent la preuve qu'une ECA de type N-domaine existait déjà avant la

division entre les Arthropodes et les Annélides, et pose donc la question de son apparition.

L'ECA dans les génomes eucaryotes distants

Des ECA putatives chez les Eucaryotes distants

Ainsi, la présence de l'ECA peut être généralisée à l'ensemble des Lophotrochozoaires, et par conséquent à tous les Protostomiens, donc de fait à l'ensemble des Bilatériens. Ceci est tout à fait remarquable et indique que l'ECA serait une enzyme ancestrale apparue très tôt au cours de l'évolution, c'est-à-dire il y a plus de 700 millions d'années, et conduit à l'hypothèse selon laquelle elle serait déjà présente chez des organismes encore plus distants.

Et là encore, des données génomiques prédisent au moins un gène codant pour une ECA putative chez les Cnidaires, à savoir l'anémone *Nematostella*, et même chez le Placozoaire *Trichoplax*, un simple disque composé de deux couches de cellules. Ainsi, l'enzyme pourrait être apparue avec les animaux pluricellulaires, les Métazoaires.

LdDCP : une enzyme apparentée à l'ECA chez la leishmanie

Dans cette situation, qu'en est-il de la présence de l'enzyme chez les animaux unicellulaires? Une équipe a découvert, chez un protozoaire, une dicarboxypeptidase ressemblant à l'ECA (Goyal *et al.*, 2006). Ce protozoaire est la leishmanie, un parasite à hôtes multiples, dont l'Homme, qui provoque la leishmaniose, une maladie particulièrement invalidante qui touche plus de 2 millions de personnes chaque année. Cette dicarboxypeptidase, appelée LdDCP possède une signature de type M2 au niveau du site actif, mais sa séquence primaire est par ailleurs tout à fait différente de celle l'ECA. Néanmoins, LdDCP est active sur HHL et sensible au captopril, des caractéristiques typiques de l'ECA. Au niveau physiologique, LdDCP est localisée dans le cytoplasme des leishmanies. Son expression est extrêmement réduite après la transition entre la phase amastigote et promastigote, et son inhibition a des effets délétères sur la croissance quel que soit le stade. Néanmoins, les concentrations de captopril employées dans l'étude sont très fortes et semblent peu compatibles avec son utilisation comme traitement contre la maladie chez l'Homme.

Quoi qu'il en soit, la présence d'une enzyme apparentée à l'ECA chez une espèce unicellulaire atteste l'importance putative de l'activité protéase de type ECA dans la phylogénèse. L'apparition de ce type

d'activité pourrait alors dater de plus de 700 millions d'années.

Cette dicarboxypeptidase, LdDCP, chez un protozoaire pourrait être interprétée comme le représentant actuel le plus primitif de l'ECA originelle. Ainsi, l'ECA serait présente de façon générale chez tous les Eucaryotes animaux, datant l'apparition de l'enzyme à environ 1 milliard d'années.

L'ECA chez les Procaryotes

Une ECA chez les Bactéries ?

Cependant, et de manière tout à fait surprenante, l'analyse informatique des banques de données révèle que la séquence de l'ECA de sangsue produit des alignements significatifs dans de nombreux génomes bactériens traduits. Au moment de l'étude, l'homologie maximale était retrouvée chez la protéobactérie *Xanthomonas axonopodis pathovar citri*, ou *X. citri*. De manière très intéressante, il se trouve que *Xanthomonas* est un parasite phytopathogène, qui cause la « peste noire » des plantes en envahissant et détruisant les stomates. Il est par ailleurs notable que les végétaux infestés par *Xanthomonas*, comme le soja ou le riz, ne possèdent pas d'ECA, mais produisent en revanche des inhibiteurs de l'enzyme. En revanche, aucune ECA authentique n'avait été caractérisée chez des espèces plus distantes que la sangsue. De plus, aucune enzyme apparentée à l'ECA n'est présente dans les génomes végétaux séquencés à ce jour. Ainsi, la présence d'une séquence génomique codant pour une ECA putative chez les Procaryotes amène à s'interroger sur l'expression de ce gène et l'activité de son produit.

XcACE : une ECA active et conservée

L'analyse informatique montre que la protéine XcACE, l'ECA de *Xanthomonas*, possède un peptide signal, un motif HExxH conservé et unique, et pas de domaine transmembranaire carboxy-terminal. La molécule mature serait une protéine soluble, semblable aux enzymes d'Invertébrés, présentant environ 35 % d'homologie avec les autres ECAs (Rivière *et al.*, 2007). Pour étudier cette ECA bactérienne, la protéine native a été extraite de bactéries en culture et la protéine recombinante a été produite à partir du gène complet codant pour XcACE. Les formes native et recombinante ont ensuite subi parallèlement des études moléculaires et biochimiques. La détection d'ARN messager correspondant à XcACE montre que le gène *Xcace* est transcrit. En outre, les formes native et recombinante de l'enzyme bactérienne sont reconnues par un anticorps dirigé contre l'ECA humaine et

présentent un poids moléculaire apparent identique, correspondant aux prédictions *in silico*. XcACE est donc exprimée et produite *in vivo*. XcACE est capable d'hydrolyser des substrats spécifiques de l'ECA, mais également un substrat amidé, démontrant que l'enzyme bactérienne est fonctionnelle, et qu'elle possède à la fois des activités dicarboxypeptidase et endopeptidase. De plus, des inhibiteurs spécifiques de l'ECA abolissent totalement son activité. Les formes native et recombinante de XcACE possèdent des profils tout à fait comparables, montrant que l'activité ECA des extraits natifs de *Xanthomonas* est imputable à XcACE. Ces résultats attestent que XcACE est une véritable ECA à l'instar de l'enzyme des Vertébrés. Des alignements structuraux et de la modélisation moléculaire ont été entrepris afin de déterminer si des différences de structure pouvaient expliquer les différences néanmoins observables au niveau de l'activité, et notamment de la sensibilité à divers inhibiteurs. Ils suggèrent que la structure globale du site actif de l'ACE est également conservée par rapport à l'ECAt humaine, malgré une homologie de séquence d'environ seulement 35 %. En outre, des différences dans les résidus en interaction avec les inhibiteurs semblent effectivement expliquer les résultats précédemment obtenus par les approches biochimiques. Au niveau physiologique, l'enzyme est sécrétée et localisée dans l'espace périplasmique. Son activité est corrélée à la croissance bactérienne, mais l'inactivation du gène et l'utilisation d'inhibiteurs *in vivo* n'ont pas permis de préciser la fonction exacte de XcACE.

L'ensemble de ces résultats montre que, de manière tout à fait surprenante, un organisme aussi distant qu'une bactérie possède une enzyme apparentée à l'ECA qui est fonctionnelle. Nous avons montré que XcACE est une ECA soluble à site actif unique, qui est donc proche des autres ECAs d'Invertébrés. Les propriétés biochimiques et structurales de l'enzyme bactérienne ressemblent également à celles des autres ECAs connues.

Aspects évolutionnistes concernant l'ECA

Ainsi, de façon aussi étonnante qu'intéressante, les propriétés moléculaires, biochimiques et structurales de l'ECA sont globalement conservées des Procaryotes aux Mammifères. L'ECA serait donc présente dans l'ensemble du monde vivant. Son absence chez les Végétaux pluricellulaires pourrait alors découler d'une perte secondaire. Cependant, il convient de rester prudent quant à cette théorie. En effet, de nombreuses questions restent en suspens, et certains éléments suggèrent que l'histoire évolutive de l'ECA pourrait être en détail plus complexe que la situation globale évoquée ci-dessus.

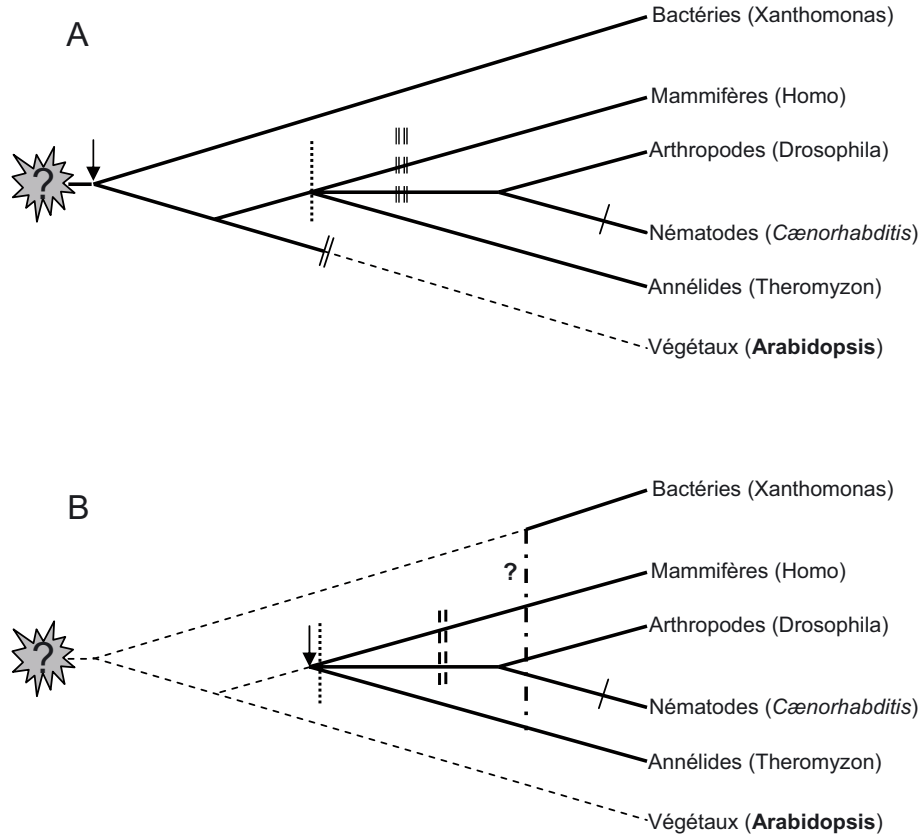


Fig. 2. L'évolution de l'ECA dans le monde vivant. Diagramme simplifié illustrant les hypothèses de l'apparition de l'ECA avant la division Procaryotes/Eucaryotes (A) ou avant la cladogénèse des Bilatériens (B). L'apparition de l'ECA (flèche), du domaine transmembranaire carboxy-terminal (pointillés simples), la duplication du site actif (pointillés doubles), la perte de l'enzyme (barre noire double) ou de son activité catalytique (barre noire simple) sont indiquées. Les noms de genres représentatifs des embranchements possédant une ECA à activité peptidasique, d'une ECA ne possédant pas cette activité (italique), ou à l'absence de l'enzyme (gras), sont mentionnés entre parenthèses. Les hypothèses d'apparition de caractères par convergence et l'échelle de temps ont été omises.

Quand l'ECA est-elle apparue ?

La présence d'orthologues de l'ECA des Procaryotes aux Mammifères soulève la question de l'apparition de l'ECA elle-même dans le monde vivant. Les données disponibles à ce jour suggèrent deux périodes probables pour cette émergence (Figure 2) :

- soit l'ECA serait apparue il y a plusieurs milliards d'années et aurait été perdue au sein des règnes végétaux et fongiques, auquel cas l'ECA chez les bactéries constituerait la représentante actuelle de l'ECA originelle ;
- soit cette apparition daterait d'environ 700 millions d'années et coïnciderait avec la naissance des Bilatériens, auquel cas la présence d'ECA chez les Procaryotes découlerait d'un transfert horizontal de gènes. Celui-ci se serait de toute façon produit il y a très longtemps, comme l'indiquent l'absence d'ECA hôtes actuels

des bactéries parasites qui possèdent l'enzyme, sa présence au sein d'un très large éventail d'unicellulaires très éloignés au niveau phylogénétique, ou bien encore l'absence d'éléments génétiques mobiles au voisinage du gène chez les Procaryotes examinés. Là encore, l'ECA bactérienne représenterait une ECA probablement très proche de l'enzyme originelle.

Quelle structure pour l'ECA ancestrale ?

Structure génomique

Le gène de l'ECA chez l'Homme présente deux groupes homologues de huit exons dont la structure est semblable au niveau de la taille et des « phases codantes » aux jonctions intron/exon. Cette structure suggère fortement que le gène actuel de l'ECA humaine provient de la duplication d'un gène ancestral

codant pour une ECA à site catalytique unique (Hubert *et al.*, 1991). Cette affirmation est corroborée par le clonage des ECAs chez les Invertébrés dont les gènes, plus courts, présentent des structures plus simples avec moins de séquences introniques. La complexité du gène de l'ECA augmente avec la distance évolutive et est maximale chez les Vertébrés.

Apparition de l'ancrage membranaire C-terminal

La présence d'un ancrage membranaire pour l'ECA n'est pas spécifique des Vertébrés, puisqu'au moins deux isoformes chez l'anophèle (AnoACE7 et AnoACE9) (Burnham *et al.*, 2005), et une forme testiculaire chez une langouste (Simunic *et al.*, 2009) en possèdent un. De nombreuses données biochimiques chez d'autres espèces, dont des Chélicérates (*Boophilus microplus*), suggère même que cet ancrage pourrait être apparu tôt dans la cladogénèse des Arthropodes. Toutefois, il convient de rester prudent sur ce point, car aucune donnée moléculaire ne vient à ce jour corroborer ces indices biochimiques. Par ailleurs, l'attachement à la membrane peut résulter de nombreuses modifications post-traductionnelles indépendantes de l'hydrophobicité de la séquence C-terminale de la protéine (myristoylation, sumoylation, farnésylation, ou ancrage GPI). Quoiqu'il en soit, le gène ECA codant pour une protéine à domaine transmembranaire est présent chez les Arthropodes, suggérant que ce domaine aurait été acquis tôt au cours de l'évolution et est peut-être requis pour l'expression d'autres activités « non-peptidasiques » de l'ECA. Néanmoins, en regard de la distance évolutive entre les espèces actuelles où l'ECA est représentée, il est probable que l'ancrage membranaire de l'ECA est un caractère apomorphe.

Duplication du domaine catalytique

De la même façon, la duplication des domaines semble s'être produite chez les Arthropodes, comme l'atteste la présence d'AnoACE9 chez le moustique (Burnham *et al.*, 2005). Par ailleurs, de nombreuses séquences génomiques qui codent pour des enzymes potentielles possédant deux domaines catalytiques homologues existent chez ce groupe, sans que l'expression des protéines correspondantes ait été démontrée. Ces gènes présentent une très forte similarité de séquence comme de structure, suggérant qu'ils sont issus de duplications. En revanche, la cause de ces duplications reste énigmatique. Plus loin dans la phylogénèse, seules des ECAs à site catalytique unique ont été caractérisées au niveau moléculaire. Ainsi, à ce jour, une ECA fonctionnelle à deux sites actifs

n'est connue que chez les Mammifères et les Arthropodes. Cependant, il n'existe aucun représentant actuel d'un ancêtre commun aux Mammifères et aux Arthropodes connu qui possède une séquence codant potentiellement pour une ECA à deux domaines homologues. Par ailleurs, la bactérie *Solibacter usitatus* posséderait deux homologues de l'ECA (GI 67858770 et 66769433), ce qui n'exclut pas une duplication plus ou moins indépendante d'une chronologie évolutive classique. Dans ce cas, la duplication pourrait être interprétée comme un avantage évolutif. Néanmoins, presque toutes les ECAs clonées à ce jour chez les Invertébrés sont des enzymes solubles à site catalytique unique (lorsqu'il est fonctionnel), comme *LdDCP* et *XcACE*. C'est donc une structure de type soluble et à site actif unique qui semble la plus probable pour l'ECA primitive.

Quelle activité pour l'ECA ancestrale ?

La question du mode de fonctionnement biochimique d'une ECA ancestrale reste ouverte. En effet, l'ECA est capable d'exercer deux activités distinctes, puisqu'en plus de son activité peptidasique, l'ECA a été démontrée capable de cliver les ancrages GPI des protéines (Kondoh *et al.*, 2005). Néanmoins, on ignore si les ECAs actuelles des groupes distants (ACN-1, *TtACE*, *XcACE*) possèdent également une activité GPIase. D'autre part, l'ECA a conservé une activité endopeptidasique. En effet, de nombreuses études (Skidgel *et al.*, 1984; Cascieri *et al.*, 1984; Yokosawa *et al.*, 1983) démontrent que l'ECA se comporte comme une endopeptidase à l'égard des substrats possédant une extrémité C-terminale amidée. Etant donné que de nombreuses métalloprotéases proches de l'ECA, comme la neprilysine (NEP) et l'enzyme de conversion de l'endothéline (ECE), sont des endopeptidasases (Turner, 2004; Ahn & Johnson, 2004), il est possible que l'ECA actuelle soit issue d'une endopeptidase ancestrale. Son activité dipeptidyl-carboxypeptidase découlerait ainsi d'une spécialisation évolutive (Naqvi *et al.*, 2005), et en ferait une sorte d'intermédiaire entre les endopeptidasases et les exopeptidasases strictes. L'évolution de son activité en carboxypeptidase ne serait pas due au confinement du site de prise en charge du substrat, qui ne pourrait alors accepter que le dipeptide résultant de son clivage, au détriment de fragments plus imposants. Elle serait plutôt liée au fait que la configuration du site actif stabilise l'état initial de la réaction d'hydrolyse du dipeptide C-terminal aux dépens des autres hydrolyses possibles (Naqvi *et al.*, 2005; Natsh *et al.*, 2003). La présence de cette activité endopeptidase dans l'ECA « moderne » serait donc vestigiale. Par ailleurs, l'activité carboxypeptidase caractéristique de type ECA est déjà présente

chez *XcACE* (et chez toutes les autres ECAs à part ACN-1), suggérant que l'apparition de cette activité est très ancienne, et constitue le trait principal de l'enzyme.

Il semble donc logique de penser que la spécialisation de l'ECA rencontrée aujourd'hui n'est que le résultat d'une longue évolution, et que ses capacités « annexes » (endopeptidase, activité GPI-ase) conservées chez les Mammifères représentent des vestiges d'une activité ancestrale très peu spécialisée.

Quel(s) rôle(s) biologique(s) pour l'ECA originelle ?

Même s'il est probable que le rôle physiologique potentiel d'une ECA primitive soit semblable au rôle de l'ECA actuelle chez des espèces très distantes, ce ne peut être que spéculatif. De plus, la conservation évolutive en termes d'homologie de séquence et/ou de structure n'implique pas nécessairement une préservation de fonction. L'ECAso joue un rôle crucial dans l'homéostasie vasculaire alors que la forme testiculaire est nécessaire à la fertilité. Par ailleurs, l'ECA est une enzyme à la biochimie permissive (large spectre de substrats ; tolérance en terme d'hydrolyse exo- ou endopeptidasique), à l'expression quasiment ubiquiste chez les Mammifères. Dans ce groupe, la spécialisation évolutive de l'ECA dans des implications physiologiques variées semble plutôt procéder d'interactions moléculaires entre l'ECA et ses substrats localement disponibles (ces substrats pouvant être circulants ou sécrétés à proximité, et déclencher des effets locaux ou systémiques), que de l'évolution d'un système de régulation très spécifique cantonné à une molécule ou une fonction précise. Le messenger de l'ECA est très fortement exprimé dans le tube digestif, en particulier au niveau de l'épithélium d'absorption de l'intestin. De plus, l'ECA intestinale est fortement stimulée par un régime riche en protéines chez le rat (Erickson *et al.*, 2001). À cet égard, il est intéressant de remarquer que le captopril inhibe le transport de dipeptides au travers des cellules épithéliales de l'intestin (Thwaites *et al.*, 1995). Chez les Invertébrés, AnCE chez la drosophile (Siviter *et al.*, 2002 ; Tatei *et al.*, 1995), *HieACE* chez *Haemophilus influenzae* (Wijffels *et al.*, 1996) et l'ECA chez le criquet *Locusta migratoria* (Macours *et al.*, 2003) sont également fortement exprimées au niveau de l'intestin. La situation est semblable chez la sangsue, où le tractus digestif est le seul lieu d'expression de l'enzyme détectable en hybridation *in situ*. Chez le moustique *Anopheles stephensi*, l'expression de l'ECA est sous l'influence du repas de sang (Ekbote *et al.*, 1999). En fait, le tractus digestif est un lieu de forte expression de l'ECA, dans toutes les espèces chez lesquelles la localisation de son messenger a été caractérisée, quelle

que soit la distance évolutive entre ces espèces. En outre, chez le rat, l'expression digestive de l'ECA est extrêmement précoce car elle est importante dès la vie fœtale (Rivière *et al.*, données non publiées). Si « l'ontogénèse résume la phylogénèse », la fonction digestive de l'ECA pourrait constituer un lien de parenté entre ses différentes formes et un reliquat de la fonction biologique qu'avait l'enzyme lors de son apparition dans la phylogénèse. Tous ces éléments suggèrent un rôle de l'enzyme dans la dégradation digestive terminale des protéines, conservé au cours de l'évolution. Ce rôle pourrait correspondre à la fonction originelle de l'ECA. Elle serait utilisée dans l'intestin des Métazoaires mais aussi, de façon analogue, au voisinage du périplasma des Bactéries, en tant que protéase sans spécialisation précise, capable de dégrader l'extrémité carboxy-terminale de nombreux nutriments peptidiques. Ainsi, l'ECA originelle participerait à l'approvisionnement de l'organisme en éléments recyclés pour la biosynthèse des protéines. De fait, l'ECA, qui joue chez les animaux actuels un rôle vital, aurait pu contribuer dès son apparition à assurer correctement une fonction basique mais essentielle.

Conclusion

L'ECA est une enzyme ancestrale. Ses propriétés primitives, site actif unique, forme soluble, activité protéase, sont conservées des bactéries aux humains, et semblent donc constituer un avantage évolutif tout à fait significatif, et cela même en dehors du système rénine-angiotensine. Dans ce contexte, si ses propriétés primitives sont conservées, qu'en est-il de ses substrats et inhibiteurs endogènes ? Cette question est fondamentale, car elle pourrait permettre d'envisager la ou les fonctions physiologiques originelles de l'enzyme, mais peut-être également des fonctions encore inconnues chez les espèces actuelles. Cependant, malgré de nombreuses recherches, aucun des ces substrats endogènes n'a encore été caractérisé chez des groupes plus distants que les Arthropodes. On pourrait alors penser que, chez les groupes distants, ces substrats endogènes n'existent tout simplement pas. Auquel cas, l'activité de l'ECA serait cruciale pour l'hydrolyse de substrats exogènes, ce qui pourrait constituer la fonction originelle de l'enzyme. Un certain nombre d'arguments plaide en faveur d'un rôle peu spécialisé de dégradation terminale des protéines. Cette fonction putative pourrait avoir lieu au niveau du périplasma des bactéries, mais également au sein du tractus digestif des Métazoaires, et servirait à l'approvisionnement de l'organisme en constituants de base pour la biosynthèse des protéines. La fonction de l'ECA chez les espèces primitives serait donc tout aussi fondamentale que le maintien de l'homéostasie vasculaire

chez les Mammifères. Ainsi, on peut envisager l'ECA comme une « protéase à tout faire » ancestrale, qui aurait acquis un second site actif et un ancrage membranaire au cours d'une longue évolution, permettant sa spécialisation dans la reproduction, le développement et la pression artérielle. Par ailleurs, il n'est pas exclu que certaines caractéristiques de l'ECA chez des espèces parasites découlent de leur interaction avec l'hôte.

Références

- Ahn K., Johnson G.D., in: Handbook of proteolytic enzymes, Barret A.J., Rawlings N.D., Woessner J.F. (Eds.). Academic Press, New York, 2004, 2nd edn: 429-434.
- Bingham R.J., Dive V., Phillips S.E.V., Shirras A.D., Isaac R.E., Structural diversity of angiotensin-converting enzyme. Insights from structure-activity comparisons of two *Drosophila* enzymes. *FEBS Journal*, 2006, 273, 362-373.
- Brooks D.R., Appleford P.J., Murray L., Isaac R.E., An essential role in moulting and morphogenesis of *Cænorhabditis elegans* for ACN-1: a novel member of the angiotensin-converting enzyme family that lacks a metallopeptidase active site. *J Biol Chem*, 2003, 278, 52340-52346.
- Burnham S., Smith J.A., Lee A.J., Isaac R.E., Shirras A.D., The angiotensin-converting enzyme (ACE) gene family of *Anopheles gambiae*. *BMC Genomics*, 2005, 6, 172.
- Cascieri M.A., Bull H.G., Mumford R.A., Patchett A.A., Thornberry N.A., Liang T., Carboxyl-terminal tripeptidyl hydrolysis of substance P by purified rabbit lung angiotensin-converting enzyme and the potentiation of substance P activity *in vivo* by captopril and MK-422. *Mol Pharmacol*, 1984, 25, 287-293.
- Cornell M.J., Williams T.A., Lamango N.S., Coates D., Corvol P., Soubrier F., Hoheisel J., Lehrach H., Isaac R.E., Cloning and expression of an evolutionary conserved single-domain angiotensin converting enzyme from *Drosophila melanogaster*. *J Biol Chem*, 1995, 270, 13613-13619.
- Corvol P., Williams T.A., Soubrier F., Peptidyl dipeptidase A: Angiotensin-I converting enzyme. In: Methods in enzymology, Barret A.J. (Ed.). Academic Press, London, 1995, 283-305.
- Crackower M.A., Sarao R., Oudit G.Y., Yagil C., Kozieradzki I., Scanga S.E., Oliveira-dos-Santos A.J., da Costa J., Zhang L., Pei Y., Scholey J., Ferrario C.M., Manoukian A.S., Chappell M.C., Backx P.H., Yagil Y., Penninger J.M., Angiotensin-converting enzyme 2 is an essential regulator of heart function. *Nature*, 2002, 417, 822-828.
- Deguchi E., Tani T., Watanabe H., Yamada S., Kondoh G., Dipeptidase-inactivated tACE action *in vivo*: selective inhibition of sperm-zona *pellucida* binding in the mouse. *Biol Reprod*, 2007, 77, 794-802.
- Donoghue M., Hsieh F., Baronas E., Godbout K., Gosselin M., Stagliano N., Donovan M., Woolf B., Robison K., Jeyaseelan R., Breitbart R.E., Acton S., A novel angiotensin-converting enzyme-related carboxypeptidase (ACE2) converts angiotensin I to angiotensin 1-9. *Circ Res*, 2000, 87, E1-E9.
- Ekbote U., Coates D., Isaac R.E., A mosquito (*Anopheles stephensi*) angiotensin I-converting enzyme (ACE) is induced by a blood meal and accumulates in the developing ovary. *FEBS Lett*, 1999, 455, 219-222.
- Ekbote U., Looker M., Isaac R.E., ACE inhibitors reduce fecundity in the mosquito, *Anopheles stephensi*. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol*, 2003, 134, 593-598.
- Erickson R.H., Yoon B.C., Koh D.Y., Kim D.H., Kim Y.S., Dietary induction of angiotensin-converting enzyme in proximal and distal rat small intestine. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2001, 281, G1221-G1227.
- Esther C.R., Jr., Thomas K.E., Bernstein K.E., Chicken lacks the testis specific isozyme of angiotensin converting enzyme found in mammals. *Biochem Biophys Res Commun*, 1994, 205, 1916-1921.
- Fuchs S., Frenzel K., Hubert C., Lyng R., Muller L., Michaud A., Xiao H.D., Adams J.W., Capecchi M.R., Corvol P., Shur B.D., Bernstein K.E., Male fertility is dependent on dipeptidase activity of testis ACE. *Nat Med*, 2005, 11, 1140-1142.
- Goyal N., Duncan R., Selvapandiyani A., Debrabant A., Baig M.S., Nakhasi H.L., Cloning and characterization of angiotensin converting enzyme related dipeptidylcarboxypeptidase from *Leishmania donovani*. *Mol Biochem Parasitol*, 2006, 145, 147-157.
- Harmer D., Gilbert M., Borman R., Clark K.L., Quantitative mRNA expression profiling of ACE 2, a novel homologue of angiotensin converting enzyme. *FEBS Lett*, 2002, 532, 107-110.
- Houard X., Williams T.A., Michaud A., Dani P., Isaac R.E., Shirras A.D., Coates D., Corvol P., The *Drosophila melanogaster*-related angiotensin-I-converting enzymes Acer and Ance-distinct enzymic characteristics and alternative expression during pupal development. *Eur J Biochem*, 1998, 257, 599-606.
- Hubert C., Houot A.M., Corvol P., Soubrier F., Structure of the angiotensin I-converting enzyme gene. Two alternate promoters correspond to evolutionary steps of a duplicated gene. *J Biol Chem*, 1991, 266, 15377-15383.
- Kondoh G., Tojo H., Nakatani Y., Komazawa N., Murata C., Yamagata K., Maeda Y., Kinoshita T., Okabe M., Taguchi R., Takeda J., Angiotensin-converting enzyme is a GPI-anchored protein releasing factor crucial for fertilization. *Nat Med*, 2005, 11, 160-166.
- Lattion A.L., Soubrier F., Allegrini J., Hubert C., Corvol P., Alhenc-Gelas F., The testicular transcript of the angiotensin I-converting enzyme encodes for the ancestral, non-duplicated form of the enzyme. *FEBS Lett*, 1989, 252, 99-104.
- Laurent V., Salzet M., Metabolism of angiotensins by head membranes of the leech *Theromyzon tessulatatum*. *FEBS Lett*, 1996, 384, 123-127.

- Li W., Moore M.J., Vasilieva N., Sui J., Wong S.K., Berne M.A., Somasundaran M., Sullivan J.L., Luzuriaga K., Greenough T.C., Choe H., Farzan M., Angiotensin-converting enzyme 2 is a functional receptor for the SARS coronavirus. *Nature*, 2003, 426, 450-454.
- Li N., Zimpelmann J., Cheng K., Wilkins J.A., Burns K.D., The role of angiotensin converting enzyme 2 in the generation of angiotensin 1-7 by rat proximal tubules. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2005, 288, F353-F362.
- Macours N., Hens K., Zinc-metalloproteases in insects: ACE and ECE. *Insect Biochem Mol Biol*, 2004, 34, 501-510.
- Macours N., Hens K., Francis C., De Loof A., Huybrechts R., Molecular evidence for the expression of angiotensin converting enzyme in hemocytes of *Locusta migratoria*: stimulation by bacterial lipopolysaccharide challenge. *J Insect Physiol*, 2003, 49, 739-746.
- Malecha J., Osmoregulation in *Hirudinea Rhynchobdellida Theromyzon tessulatum* (OFM). Experimental localization of the secretory zone of a regulation factor of water balance. *Gen Comp Endocrinol*, 1983, 49, 344-351.
- Naqvi N., Liu K., Graham R.M., Husain A., Molecular basis of exopeptidase activity in the C-terminal domain of human angiotensin I-converting enzyme: insights into the origins of its exopeptidase activity. *J Biol Chem*, 2005, 280, 6669-6675.
- Natesh R., Schwager S.L., Sturrock E.D., Acharya K.R., Crystal structure of the human angiotensin-converting enzyme-lisinopril complex. *Nature*, 2003, 421, 551-554.
- Oppong S.Y., Hooper N.M., Characterization of a secretase activity which releases angiotensin-converting enzyme from the membrane. *Biochem J*, 1993, 292, 597-603.
- Quan G.X., Mita K., Okano K., Shimada T., Ugajin N., Xia Z., Goto N., Kanke E., Kawasaki H., Isolation and expression of the ecdysteroid-inducible angiotensin-converting enzyme-related gene in wing discs of *Bombyx mori*. *Insect Biochem Mol Biol*, 2001, 31, 97-103.
- Rella M., Elliot J.L., Revett T.J., Lanfear J., Phelan A., Jackson R.M., Turner A.J., Hooper N.M., Identification and characterisation of the angiotensin converting enzyme-3 (ACE3) gene: a novel mammalian homologue of ACE. *BMC Genomics*, 2007, 8, 194.
- Rivière G., Michaud A., Deloffre L., Vandenbulcke F., Levoye A., Breton C., Corvol P., Salzet M., Vieau D., Characterization of the first non-insect invertebrate functional angiotensin-converting enzyme (ACE): leech TtACE resembles the N-domain of mammalian ACE. *Biochem J*, 2004, 382, 565-573.
- Rivière G., Michaud A., Breton C., VanCamp G., Laborie C., Enache M., Lesage J., Deloof S., Corvol P., Vieau D., Angiotensin-converting enzyme 2 (ACE2) and ACE activities display tissue-specific sensitivity to undernutrition-programmed hypertension in the adult rat. *Hypertension*, 2005, 46, 1169-1174.
- Rivière G., Michaud A., Corradi H.R., Sturrock E.D., Ravi A.K., Cogez V., Bohin J.P., Vieau D., Corvol P., Characterization of the first angiotensin-converting like enzyme in bacteria: Ancestor ACE is already active. *Gene*, 2007, 399, 81-90.
- Simunic J., Soye D., Kamech N., Characterization of a membrane-bound angiotensin-converting enzyme isoform in crayfish testis and evidence for its release into the seminal fluid. *FEBS J*, 2009, 276, 4727-4738.
- Siviter R.J., Taylor C.A., Cottam D.M., Denton A., Dani M.P., Milner M.J., Shirras A.D., Isaac R.E., Ance, a *Drosophila* angiotensin-converting enzyme homologue, is expressed in imaginal cells during metamorphosis and is regulated by the steroid, 20-hydroxyecdysone. *Biochem J*, 2002, 367, 187-193.
- Skidgel R.A., Engelbrecht S., Johnson A.R., Erdos E.G., Hydrolysis of substance P and neurotensin by converting enzyme and neutral endopeptidase. *Peptides*, 1984, 5, 769-776.
- Tatei K., Cai H., Ip Y.T., Levine M., Race: a *Drosophila* homologue of the angiotensin converting enzyme. *Mech Dev*, 1995, 51, 157-168.
- Taylor C.A., Coates D., Shirras A.D., The Acer gene of *Drosophila* codes for an angiotensin-converting enzyme homologue. *Gene*, 1996, 181, 191-197.
- Thwaites D.T., Cavet M., Hirst B.H., Simmons N.L., Angiotensin-converting enzyme (ACE) inhibitor transport in human intestinal epithelial (Caco-2) cells. *Br J Pharmacol*, 1995, 114, 981-986.
- Towler P., Staker B., Prasad S.G., Menon S., Tang J., Parsons T., Ryan D., Fisher M., Williams D., Dales N.A., Patane M.A., Pantoliano M.W., ACE2 X-ray structures reveal a large hinge-bending motion important for inhibitor binding and catalysis. *J Biol Chem*, 2004, 279, 17996-18007.
- Turner A.J., in: Handbook of proteolytic enzymes. Barret A.J., Rawlings N.D., Woessner J.F. (Eds.). Academic Press, New York, 2004, 2nd edn: 419-426.
- Vandenbulcke F., Laurent V., Verger-Bocquet M., Stefano G.B., Salzet M., Biochemical identification and ganglionic localization of leech angiotensin-converting enzymes. *Brain Res Mol Brain Res*, 1997, 49, 229-237.
- Vandingenen A., Hens K., Baggerman G., Macours N., Schoofs L., De Loof A., Huybrechts R., Isolation and characterization of an angiotensin converting enzyme substrate from vitellogenic ovaries of *Neobellieria bullata*. *Peptides*, 2002, 23, 1853-1863.
- Vandingenen A., Hens K., Macours N., Zhu W., Janssen I., Breuer M., De Loof A., Huybrechts R., Captopril, a specific inhibitor of angiotensin converting enzyme, enhances both trypsin and vitellogenin titers in the grey fleshfly *Neobellieria bullata*. *Arch Insect Biochem Physiol*, 2001, 47, 161-167.
- Wei L., Alhenc-Gelas F., Corvol P., Clauser E., The two homologous domains of human angiotensin I-converting enzyme are both catalytically active. *J Biol Chem*, 1991, 266, 9002-9008.
- Wijffels G., Fitzgerald C., Gough J., Riding G., Elvin C., Kemp D., Willadsen P., Cloning and characterisation of angiotensin-converting enzyme from the dipteran

species, *Haematobia irritans exigua*, and its expression in the maturing male reproductive system. *Eur J Biochem*, 1996, 237, 414-423.

Woodman Z.L., Schwager S.L., Redelinghuys P., Carmona A.K., Ehlers M.R., Sturrock E.D., The N domain of somatic angiotensin-converting enzyme negatively

regulates ectodomain shedding and catalytic activity. *Biochem J*, 2005, 389, 739-744.

Yokosawa H., Endo S., Ogura Y., Ishii S., A new feature of angiotensin-converting enzyme in the brain: hydrolysis of substance P. *Biochem Biophys Res Commun*, 1983, 116, 735-742.