

Des chaperons pharmacologiques pour corriger le diabète insipide néphrogénique ?

Près de la moitié des maladies héréditaires du génome humain sont dues soit à une mutation faux-sens où un seul acide aminé d'une protéine complexe est remplacé par un autre acide aminé, soit à une délétion de quelques acides aminés (*Human Gene Mutation Database*: <http://www.uwcm.ac.uk/uwcm/mg/hgmd0.html>) [1]. Très souvent, ces mutations ne concernent pas le site actif de la protéine, mais entraînent en fait un mauvais repliement de ces protéines. Celles-ci ne peuvent rejoindre leur site normal d'action et s'accumulent dans le réticulum endoplasmique où elles sont dégradées par un système de contrôle de qualité, ce qui se traduit par une diminution de leur demi-vie [2]. Si l'exemple le mieux caractérisé concerne la mutation $\Delta F508$ du CFTR (*cystic fibrosis transmembrane conductance regulator*), responsable de la majorité des cas de mucoviscidose, de nombreuses autres maladies héréditaires sont secondaires à des défauts de repliement des protéines mutantes [3].

Une stratégie thérapeutique générale permettant la correction du repliement anormal de ces protéines mutées pourrait donc permettre le traitement pharmacologique de plusieurs maladies héréditaires. Cette hypothèse est renforcée par l'observation que le repliement, le ciblage et la fonction de certaines protéines mutantes, peuvent être rétablis en abaissant la température des cellules ou en utilisant des molécules chaperons chimiques telles que le diméthylsulfoxyde, le glycérol, le deutérium ou le triméthylamine-N-oxide [4]. Il est probable que ces effets sont dus à une modification de la cinétique de repliement des protéines

mutantes ou à une stabilisation d'une conformation leur permettant d'échapper à la dégradation. Cependant, les concentrations nécessaires à l'activité de ces molécules *in vivo* semblent incompatibles avec leur éventuelle utilisation thérapeutique. Des études récentes suggèrent que des agents pharmacologiques plus spécifiques puissent favoriser le repliement de protéines mutées. *In vitro*, la fonction de mutants non fonctionnels de la P-glycoprotéine, une protéine de la famille des transporteurs ABC, a été rétablie par des substrats ou modulateurs de la P-glycoprotéine comme la capsaïcine, la cyclosporine, la vinblastine [5]. Dans la maladie de Fabry, un déficit enzymatique héréditaire en α -galactosidase A [6], l'activité enzymatique des fibroblastes de patients porteurs des mutations R301Q et Q279E est restaurée par l'ajout, à des concentrations non inhibitrices, de 1-désoxygalactonojirimycine, un inhibiteur compétitif de l' α -galactosidase A. Ce traitement semble aussi efficace *in vivo* chez des souris transgéniques surexprimant une enzyme α -Gal mutante [7].

Enfin, notre équipe vient de montrer que des antagonistes non peptidiques du récepteur de la vasopressine (V2R), un récepteur à sept domaines transmembranaires couplé aux protéines G, étaient capables de rétablir la fonction de récepteurs mutants, responsables du diabète insipide néphrogénique lié à l'X [8]. Cette maladie se caractérise par une résistance des tubules collecteurs à l'action de la vasopressine, ce qui provoque l'excrétion de grandes quantités d'urine diluée. Plus de 150 mutations du gène du récepteur

de la vasopressine ont été décrites. Si certaines de ces mutations provoquent la synthèse de protéines non fonctionnelles, de nombreuses autres paraissent mineures et seraient plutôt responsables d'une rétention intracellulaire du récepteur [9, 10]. Parmi celles-ci, la mutation del 62-64 est située dans la première boucle cytoplasmique, laquelle n'a jamais été impliquée dans la liaison du ligand ou dans le couplage aux protéines G. Nos résultats montrent que ce récepteur muté n'est plus exprimé à la surface des cellules mais est retenu dans le réticulum endoplasmique [8]. L'ajout d'un antagoniste non peptidique spécifique du récepteur et ayant la capacité de pénétrer dans les cellules, augmente la quantité de récepteurs mutés exprimés à la surface. Ces récepteurs sont de plus fonctionnels comme en témoigne l'augmentation de la concentration intracellulaire d'AMPc en réponse à la vasopressine, et ceci pendant 24 heures après avoir enlevé l'antagoniste du milieu de culture. De façon remarquable, l'adressage membranaire et la fonction de sept autres récepteurs mutés sont également corrigés par l'ajout de cet antagoniste non peptidique. Bien que le niveau de récupération fonctionnelle observé varie selon les protéines mutantes, ces résultats confirment que ces mutations n'affectaient que peu ou pas le site actif du récepteur. Qu'en est-il du mécanisme d'action de cet antagoniste non peptidique ? Nos expériences de marquage métabolique montrent qu'il favorise la maturation normale du récepteur. Celui-ci est en effet synthétisé sous forme d'un précurseur de 38 kDa, la forme mature de 48 kDa étant glyco-

sylée. Alors qu'en l'absence d'antagoniste non peptidique, le récepteur muté est séquestré dans le réticulum endoplasmique sous forme immature, son ajout entraîne l'apparition de récepteurs correctement glycosylés qui deviennent résistants à l'action de l'endoH. On peut envisager que cette molécule antagoniste, dont la structure est semblable à celle de la vasopressine (figure 1), puisse occuper sur le récepteur la poche de reconnaissance de l'hormone, ce qui favoriserait le repliement optimal du récepteur, repliement en forme d'anneau où les sept domaines sont orientés en sens inverse des aiguilles d'une montre [11]. Ceci permettrait la stabilisation du récepteur qui ne serait plus reconnu comme mal replié par les protéines du réticulum endoplasmique, et faciliterait sa maturation et son transport vers la membrane cellulaire.

Il apparaît donc que des petites molécules, agonistes ou antagonistes de protéines natives, et ayant la capacité de pénétrer dans les cellules, peuvent faciliter le repliement de certaines protéines mutantes et favoriser leur fonction, agissant ainsi comme de véritables chaperons pharmacologiques. De telles molécules, modifiées de telle façon qu'elles soient actives à faibles concentrations et n'aient pas de propriétés antagonistes, pourraient à l'évidence s'avérer utiles pour le traitement de certaines maladies génétiques.

1. Cooper DN, Ball EV, Krawczak M. The human gene mutation database. *Nucleic Acids Res* 1998; 26: 285-7.
 2. Bross P, Corydon TJ, Andresen BS, Jorgensen MM, Bolund L, Gregersen N. Protein misfolding and degradation in genetic diseases. *Hum Mutat* 1999; 14: 186-98.

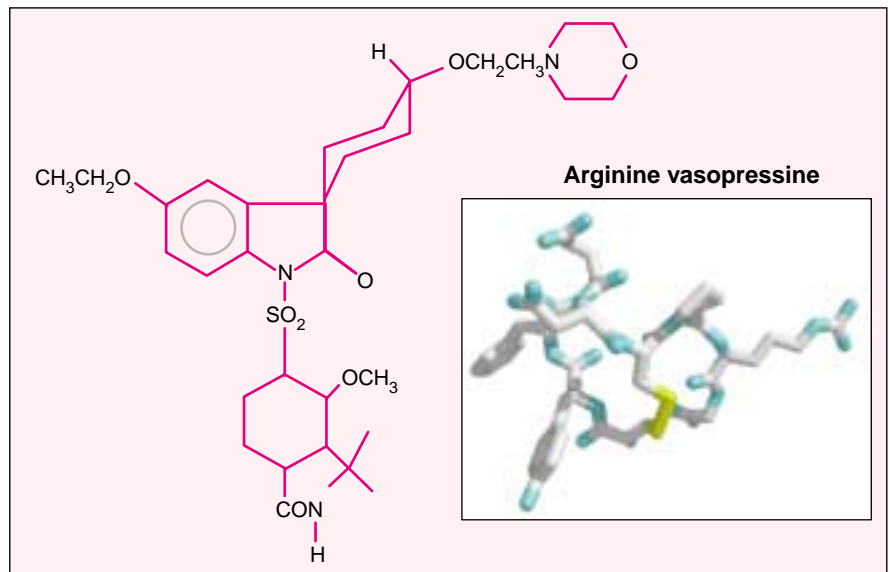


Figure 1. Structures comparées de la vasopressine et de l'inhibiteur non peptidique du récepteur de la vasopressine. L'affinité et la sélectivité des inhibiteurs non peptidiques du récepteur de la vasopressine, ici le SR 121463A, sont probablement dues à une structure imitative des résidus aromatiques TYR2 (Y2) et PHE3 (F3) de la vasopressine.

3. Welch WJ, Howard M: Commentary. Antagonists to the rescue. *J Clin Invest* 2000; 105: 853-4.
 4. Brown CR, Hong-Brown LQ, Biwersi J, Verkman AS, Welch WJ. Chemical chaperones correct the mutant phenotype of the delta F508 cystic fibrosis transmembrane conductance regulator protein. *Cell Stress Chaperones* 1996; 1: 117-25.
 5. Loo TW, Clarke DM. Correction of defective protein kinesis of human P-glycoprotein mutants by substrates and modulators. *J Biol Chem* 1997; 272: 709-12.
 6. Ishii S, Kase R, Okumiya T, Sakuraba H, Suzuki Y: Aggregation of the inactive form of human alpha-galactosidase in the endoplasmic reticulum. *Biochem Biophys Res Commun* 1996; 220: 812-5.
 7. Fan JQ, Ishii S, Asano N, Suzuki Y. Accelerated transport and maturation of lysosomal alpha-galactosidase A in Fabry lymphoblasts by an enzyme inhibitor. *Nat Med* 1999; 5: 112-5.
 8. Morello JP, Salahpour A, Laperrière A, et al. Pharmacological chaperones rescue cell-surface expression and function of misfolded V2 vasopressin receptor mutants. *J Clin Invest* 2000; 105: 887-95.
 9. Bichet DG. Les diabètes insipides néphrogéniques héréditaires. *Med Sci* 1997; 13: 11-7.

10. Ala Y, Morin D, Mouillac B, et al. Functional studies of twelve mutant V2 vasopressin receptors related to nephrogenic diabetes insipidus: molecular basis of a mild clinical phenotype. *J Am Soc Nephrol* 1998; 9: 1861-72.
 11. Barberis C, Mouillac B, Durroux T. Structural bases of vasopressin/oxytocin receptor function. *J Endocrinol* 1998; 156: 223-9.

Jean-Pierre Morello
Virginie Bernier
Michel Bouvier
Daniel G. Bichet

Départements de biochimie et médecine,
 Université de Montréal, Hôpital du Sacré-Cœur,
 5400, boulevard Gouin-Ouest,
 Montréal H4J 1C5, Québec, Canada.