

Les récepteurs de la vasopressine : structure fonctionnelle et transduction signalétique dans les cellules cibles

par Jessica Robert & Éric Clauser

Département d'Endocrinologie, Métabolisme et Cancer, Institut Cochin, INSERM U567, UMR 8104, CNRS, Université Paris V, Faculté de Médecine Cochin, 24, rue du Faubourg Saint-Jacques, 75014 Paris.

Correspondance : Éric Clauser, Département d'Endocrinologie, Métabolisme et Cancer, Institut Cochin, 24, rue du Faubourg Saint-Jacques, 75014 Paris. Tél. : 01 53 73 27 50. Fax : 01 53 73 27 51.

E-mail : clauser@cochin.inserm.fr

Reçu le 15 novembre 2005

RÉSUMÉ

La vasopressine, hormone hypothalamique exerce ses effets par l'intermédiaire de trois récepteurs couplés aux protéines G. Les récepteurs V1a et V1b, associés à une protéine Gq et la phospholipase C, sont respectivement responsables des effets vasoconstricteur et régulateur de l'axe corticotrope. Le récepteur V2, couplé à une protéine Gs et l'adenylyl cyclase, est responsable de la réabsorption de l'eau au niveau du tube collecteur rénal.

Des mutations de ce dernier récepteur se sont avérées impliquées dans le diabète insipide et le défaut

moléculaire le plus fréquent est un blocage du récepteur muté dans le réticulum endoplasmique (RE). Avec le récepteur V1b comme modèle, nous avons montré qu'une séquence C-terminale proximale était essentielle pour l'adressage membranaire du récepteur. Un mutant de ce domaine s'accumule dans le RE et est dégradé. Le SSR 149415, antagoniste non peptidique du V1bR, perméant aux membranes biologiques, est cependant capable de rétablir le phénotype normal de ce mutant et agit donc comme un chaperon pharmacologique.

SUMMARY Vasopressin receptors: structure/function relationships and signal transduction in target cells

Vasopressin, a hypothalamic hormone, acts on its target tissues *via* three different G protein coupled receptors. The vasopressin V1a and V1b receptors, associated to Gq protein and phospholipase C, are responsible for vasoconstriction and regulation of the corticotroph axis respectively. The V2 vasopressin receptor is coupled to Gs protein and adenylyl cyclase and is responsible for water reabsorption in the renal collecting duct. Mutations of the V2 receptor are involved in diabetes insipidus and most of these muta-

tions result in an endoplasmic reticulum (ER) retention of the mutated receptor. With the V1b receptor model, we have identified a proximal sequence of the C-terminal segment, which is crucial for ER export. Mutations in this short domain result in ER accumulation and degradation of the receptor. SSR 149415, a nonpeptide antagonist of V1bR, which is permeable to cell membrane, is able to rescue the mutant phenotype and acts as a pharmacological chaperone.

INTRODUCTION

La vasopressine est un petit peptide de 9 acides aminés produit par les noyaux hypothalamiques et stocké dans la posthypophyse. Elle est aussi appelée hormone antidiurétique. Avec l'ocytocine, elle appartient à une famille de peptides hormonaux cycliques du fait de l'existence d'un pont disulfure entre les cystéines en positions 1 et 6. Fabriquée sous la forme d'un précurseur dont la séquence comprend un peptide signal, la vasopressine et la neurophysine (159 acides aminés), la vasopressine est maturée dans la cellule hypothalamique par une prohormone convertase (Acher *et al.*, 1955).

Secrétée dans la circulation, l'hormone vasopressine va agir sur ses tissus cibles qui sont essentiellement au nombre de trois :

- les vaisseaux, où elle exerce un effet vasoconstricteur,
- le rein, où elle entraîne une réabsorption de l'eau au niveau du tube collecteur,
- et l'antéhypophyse, où elle exerce un effet co-sécrétagogue de la *corticotropin releasing hormone* (CRH) en réponse au stress, activant ainsi l'axe corticotrope.

Ces actions sont transmises aux cellules cibles par l'intermédiaire de récepteurs membranaires, qui appartiennent à la grande famille des récepteurs couplés aux protéines G.

STRUCTURE ET DIVERSITÉ DES RÉCEPTEURS DE LA VASOPRESSINE

La structure des récepteurs de la vasopressine a été établie de façon définitive par le clonage de leurs ADNc au début des années 1990. Il existe chez les mammifères trois types de récepteurs, dont les gènes sont situés sur des chromosomes différents (Birbaumer, 2000). Il s'agit des récepteurs V1a, V1b (aussi appelé V3) et V2 de la vasopressine. Ces trois récepteurs ont tous sept hélices α formant des domaines transmembranaires reliés par trois boucles extracellulaires et trois boucles intracellulaires. Le segment N-terminal est extracellulaire alors que le segment C-terminal est intracellulaire.

Le récepteur V1a humain, que nous avons été les premiers à cloner (Thibonnier *et al.*, 1994), est une protéine de 394 acides aminés, qui présente trois sites potentiels de N-glycosylation et dont le gène est localisé sur le chromosome 12. Il présente 46 % d'identité de séquence avec le récepteur V1b et 35 % avec le récepteur V2.

Le récepteur V1b humain, que nous avons été les premiers à cloner (de Keyser *et al.*, 1994), est une protéine de 424 acides aminés, qui présente un site de N-glycosylation et dont le gène est localisé sur le chromosome 1. Il présente 37 % d'identité de séquence avec le récepteur V2.

Enfin, le récepteur V2 est une protéine de 371 acides aminés, possédant un seul site de N-glycosylation et localisé sur le chromosome X (Birbaumer *et al.*, 1992).

Ces récepteurs ont des distributions tissulaires différentes et se sont en fait spécialisés dans la transmission de chacun des effets physiologiques de la vasopressine.

Ainsi, le récepteur V2 est pratiquement exclusivement exprimé dans les tubes collecteurs du rein et est responsable de la transmission de l'effet antidiurétique de l'hormone, en activant les mécanismes de réabsorption d'eau (Morello & Bichet, 2001 ; Terada *et al.*, 1993).

Le récepteur V1b est fortement exprimé au niveau des cellules corticotropes antéhypophysaires, où il est responsable de l'effet stimulateur de l'axe corticotrope en réponse au stress (Aguilera & Rabadan-Diehl, 2000 ; Wersinger *et al.*, 2002). Il est aussi exprimé faiblement au niveau du pancréas et de la surrénale où il régule la sécrétion de glucagon, d'insuline et de catécholamines (Grazzini *et al.*, 1996 ; Lee *et al.*, 1995 ; Yibchok-Anun *et al.*, 1999).

Enfin, le récepteur V1a est plus largement exprimé dans le foie, les cellules musculaires lisses, les plaquettes, le cerveau, la rétine et les organes de la reproduction (Ostrowski *et al.*, 1992). Il est responsable de l'effet vasoconstricteur de l'hormone (Byron, 1996).

Ces trois récepteurs lient avec la même affinité la vasopressine (Kd de l'ordre de 1nM). Le site de liaison de la vasopressine a bien été caractérisé pour le récepteur V1a (Mouillac *et al.*, 1995). Il implique différents acides aminés des boucles extracellulaires et des segments superficiels des domaines transmembranaires II, III, IV et VI. Les domaines transmembranaires (TM) perpendiculaires au plan de la membrane forment une couronne délimitant une cavité virtuelle dans laquelle vient se fixer la vasopressine à la surface de la membrane cellulaire (Fig. 1). Il a ainsi été montré que Tyr2 et Gln5 de la

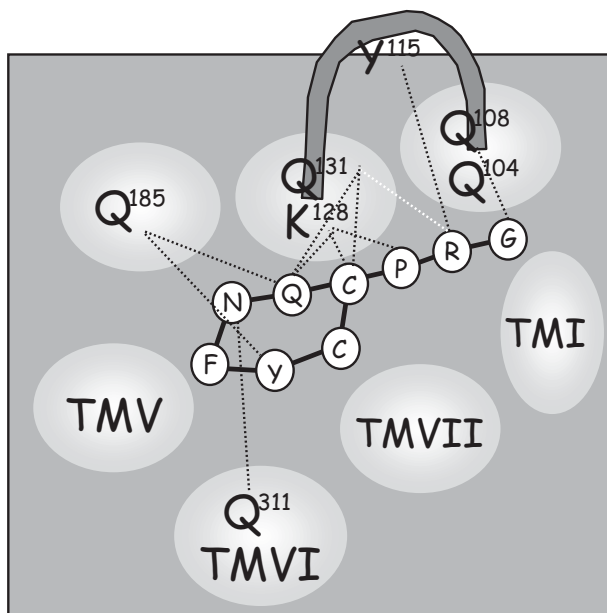


FIG. 1. – Le site de liaison de la vasopressine sur le récepteur V1a. Les domaines transmembranaires (TM) représentés par des cercles clairs qui symbolisent les hélices α vues d'avion à la surface de la membrane, forment une couronne et sont numérotés. La vasopressine dont les acides aminés sont indiqués selon le code à une lettre, s'insère entre les TM. Les interactions entre ces acides aminés et le récepteur sont indiquées.

vasopressine interagissent avec Gln185 (TM IV) du récepteur V1a, Asn4 avec Gln311 (TM VI), Gln5 et Cys6 avec Lys128 et Gln131 (TM III), Pro7 avec Lys128 (TM III), Arg8 avec Gln131 (TM III) et Tyr115 (boucle extracellulaire 1) et Gly9 avec Gln104 et Gln108 (TM II).

Des travaux importants des chimistes et pharmacologues ont permis de caractériser des analogues peptidiques cycliques ou linéaires, qui se comportent d'une part comme des agonistes ou des antagonistes de la vasopressine et d'autre part comme des ligands spécifiques de l'un ou de l'autre des sous-types de récepteurs de la vasopressine (Derick *et al.*, 2002 ; Guillon *et al.*, 2004). Des outils pharmacologiques étaient dès lors disponibles pour caractériser le fonctionnement et la signalisation de ces récepteurs. Plus récemment, des antagonistes non peptidiques et spécifiques de chacun des trois sous-types ont été développés par l'industrie pharmaceutique (Serradeil-Le Gal *et al.*, 2002a et b). Ces composés, absorbables *per os*, sont perméables aux membranes biologiques.

SIGNALISATION ET FONCTIONS PHYSIOLOGIQUES DES RÉCEPTEURS DE LA VASOPRESSINE

Les récepteurs de la vasopressine appartiennent à la grande famille des récepteurs couplés aux protéines G.

Ces récepteurs, une fois activés par leur agoniste, s'associent à une protéine G hétérotrimérique qu'ils activent par échange de GDP par du GTP par la sous-unité α de cette protéine. La sous-unité α liée au GTP se dissocie du récepteur et des sous-unités $\beta\gamma$ et va activer un effecteur enzymatique. Cette enzyme produit différents seconds messagers intracellulaires responsables de l'effet physiologique de l'hormone. Les trois récepteurs de la vasopressine n'activent pas les mêmes protéines G ni donc les mêmes effecteurs, ce qui explique leurs fonctions physiologiques différentes (Fig. 2).

Le récepteur V2 de la vasopressine, exprimé au niveau du rein, active une protéine G contenant une sous-unité α_s (Butlen *et al.*, 1978 ; Jard *et al.*, 1984). L'interaction du récepteur avec cette sous-unité α se fait par l'intermédiaire de la deuxième boucle intracellulaire. La protéine $G\alpha_s$ active une enzyme de la famille des adénylyl cyclases membranaires, responsable de la production intracellulaire de l'AMP cyclique, second messenger soluble et diffusant dans l'ensemble du cytoplasme cellulaire. L'AMPc va activer une protéine kinase AMP cyclique dépendante, la PKA (Orloff & Handler, 1967). Cette sérine/thréonine kinase, une fois activée dans les cellules du tube collecteur, va être responsable de la réabsorption accrue d'eau par deux mécanismes :

- elle phosphoryle les canaux à eau de type aquaporine 2, localisés dans des petites vésicules intracellulaires, ce qui aura pour effet de transloquer ces vésicules à la membrane et d'augmenter le nombre de ces canaux et donc leur fonction ;

- elle phosphoryle le facteur de transcription CREB qui va activer la transcription du gène de l'aquaporine 2.

Les récepteurs V1, qu'il s'agisse des récepteurs V1a ou V1b, ont une voie de signalisation différente du récepteur V2, qui implique une protéine Gq (Thibonnier *et al.*, 1997 ; Wange *et al.*, 1991). La sous-unité α de cette protéine G interagit cette fois avec la troisième boucle intracellulaire du récepteur V1a et probablement V1b. La sous-unité $G\alpha_q$ active un effecteur enzymatique de la famille des phospholipases C β , enzyme membranaire qui clive un phospholipide en deux pour produire deux seconds messagers. Le premier est l'inositol 1,4,5 trisphosphate, un messenger soluble, qui va se fixer sur des récepteurs canaux du réticulum endoplasmique, ce qui libère les stocks intracellulaires de calcium dans le cytosol (Won & Orth, 1994). Le second est un lipide membranaire, le 1,2 diacylglycérol, qui va servir de point d'ancrage membranaire aux protéines kinases C, qui vont être activées. L'activation de ces seconds messagers est

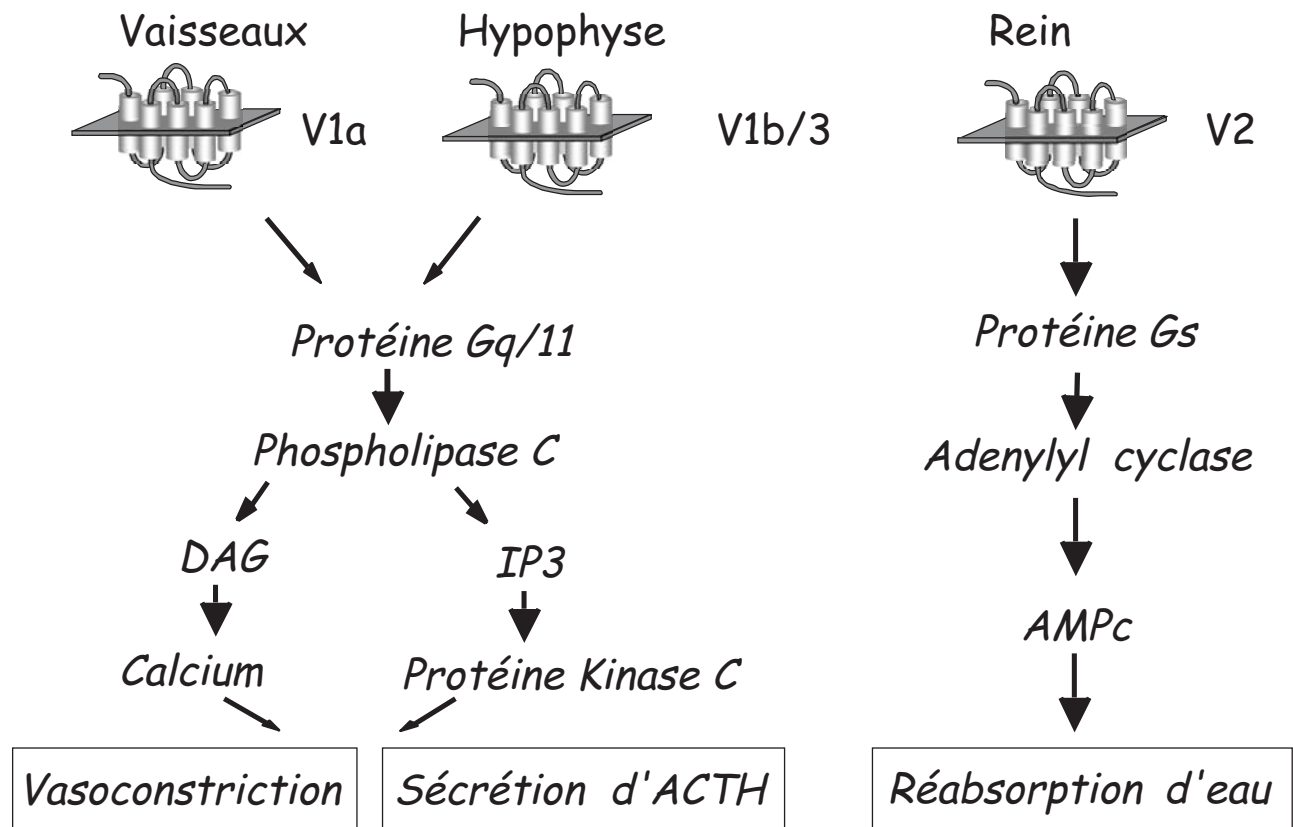


FIG. 2. – Voies de signalisation des récepteurs de la vasopressine. Le lieu d'expression, les voies de signalisation et les actions physiologiques des trois récepteurs de la vasopressine sont indiqués. DAG = diacylglycérol, IP3 = inositol trisphosphate, AMPc = Adénosine monophosphate cyclique et ACTH = *adrenocorticotropin hormone*.

responsable de la contraction des fibres musculaires lisses, de l'activation des plaquettes etc. *via* le récepteur V1a, et de la libération d'ACTH par les cellules antéhypophysaires *via* le récepteur V1b.

MATURATION ET EXPRESSION MEMBRANAIRE DES RÉCEPTEURS DE LA VASOPRESSINE

Le système de contrôle qualité du réticulum endoplasmique et la maturation des récepteurs

Les récepteurs de la vasopressine sont des glycoprotéines destinées à la voie de la sécrétion membranaire et sont donc synthétisés au niveau du réticulum endoplasmique (RE). Dans ce compartiment, les glycoprotéines vont acquérir leur repliement correct et commencer leur maturation. Cette étape est facilitée par la présence de protéines spécifiques appelées chaperons moléculaires du RE dont le rôle est d'assister le repliement correct des glycoprotéines en se liant à elles et de retenir dans le RE les glycoprotéines qui n'arrivent pas à se replier de façon native. Ces chaperons moléculaires sont luminaux (BiP, calréticuline, PDI...), membranaires (calnexine...) et cytosoliques (HSP 70...) et composent le système de contrôle qualité du RE (Ellgaard & Helenius, 2003 ; Trombetta & Parodi, 2003).

A leur entrée dans le RE, les glycoprotéines portent un oligosaccharide composé de 14 résidus glucidiques : 3 glucoses, 9 mannoses et 2 N-acétylglucosamines, $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ (Helenius & Aebi, 2004). Des modifications de ce noyau glycane pour générer une forme monoglucosylée, $\text{Glc}_1\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$, déterminent leur interaction avec deux chaperons moléculaires homologues de la famille des lectines, la calnexine (CNX) (Schrag *et al.*, 2001 ; Ware *et al.*, 1995) et la calréticuline (CRT) (Ellgaard *et al.*, 2001). Les glycoprotéines liées aux lectines sont ainsi retenues dans le RE, sont protégées de l'agrégation, d'une sortie prématurée du RE sous forme non repliée, ou encore de la dégradation, et commencent leur repliement. Elles sont également exposées à d'autres chaperons moléculaires, notamment une thiol-disulfure oxydoréductase ERp57 et une protéine disulfure isomérase PDI qui assistent la formation des ponts disulfures pendant le processus de repliement (Molinari & Helenius, 1999 ; Oliver *et al.*, 1999). Après élimination du dernier résidu glucose, le complexe glycoprotéine-lectine se dissocie et deux alternatives peuvent alors se présenter : la glycoprotéine est correctement repliée et peut sortir du RE, ou la glycoprotéine est mal conformée et dans ce cas elle est reglucosylée et réassociée aux lectines. Ce cycle se répète jusqu'à ce que la glycoprotéine soit correctement repliée ou alors envoyée vers la voie de la dégradation associée au RE, l'ERAD, voie dépendante du système ubiquitine-protéasome (Ahner & Brodsky, 2004 ; Nishikawa *et al.*, 2005) (Fig. 3).

Très peu d'études ont mis en évidence des interactions entre les récepteurs de la vasopressine et des chaperons moléculaires du RE. Nous avons montré que les formes immatures du récepteur V1b de la vasopressine inter-

agissent avec la calnexine (Robert *et al.*, 2005a) et avec la calréticuline mais pas avec la protéine BiP (Robert *et al.*, données non publiées). Par ailleurs, un récepteur V1b mutant incorrectement replié présente une association prolongée avec la calnexine comparé au récepteur sauvage confirmant un rôle des lectines dans la rétention des protéines dans le RE (Robert *et al.*, 2005a). Les récepteurs V2 immatures sont aussi capables de lier la calnexine et des mutants du V2R interagissent plus longtemps avec cette dernière dans le RE (Morello *et al.*, 2001).

La sortie du réticulum endoplasmique nécessite un motif d'export

Une fois correctement repliés, les récepteurs doivent sortir du RE pour être acheminés à l'appareil de Golgi puis à la membrane plasmique, leur destination finale. La sortie du RE nécessite la présence de motifs spécifiques d'export présents sur la séquence protéique des récepteurs. Les mécanismes moléculaires sous-jacents soulignant la fonction réelle de ces motifs restent élusifs. Trois hypothèses sont envisageables :

- ces motifs pourraient fonctionner comme des signaux indépendants d'export du RE en liant des protéines spécifiques de la machinerie d'export ;
- ils seraient impliqués dans le repliement correct des glycoprotéines dans le RE ;
- ou alors, ils seraient impliqués dans le processus d'oligomérisation des récepteurs.

Nous avons établi que le récepteur V1b de la vasopressine délété de sa région C-terminale est présent sous une seule forme correspondant à une protéine immature qui ne lie plus la vasopressine, ne s'exprime plus à la surface cellulaire et est séquestrée dans le RE laissant présager l'existence d'une séquence peptidique d'export (ou motif d'export) dans cette région C-terminale (Robert *et al.*, 2005b). Des résultats similaires ont été obtenus pour le récepteur V2 de la vasopressine (Oksche *et al.*, 1998).

Nous avons montré que la séquence d'export du récepteur V1b est composée de cinq acides aminés hydrophobes : la phénylalanine F³⁴¹, l'asparagine N³⁴², les leucines L³⁴⁵, L³⁴⁶ et L³⁵⁰ qui forment le motif ³⁴¹FN(X)₂LL(X)₃L³⁵⁰ (Robert *et al.*, 2005b). Leurs mutations simples et combinées en résidu thréonine et alanine montrent une diminution de 80 % à 100 % de l'export du récepteur qui est retenu dans le RE. Enfin, ce motif est suffisant à l'export d'une autre protéine comme la glycoprotéine CD8 α . Ainsi, les domaines N-terminal et transmembranaire de cette protéine, normalement non exportés du RE, peuvent être adressés à la membrane plasmique lorsqu'ils sont couplés au domaine C-terminal du récepteur V1b sauvage, mais pas muté sur ses cinq résidus (Robert *et al.*, 2005b). Nous avons par la suite montré que ce motif n'intervient pas dans le processus de dimérisation du récepteur et de fortes évidences suggèrent que ce motif d'export serait impliqué dans le processus de repliement correct du récepteur (Robert *et al.*, 2005b).

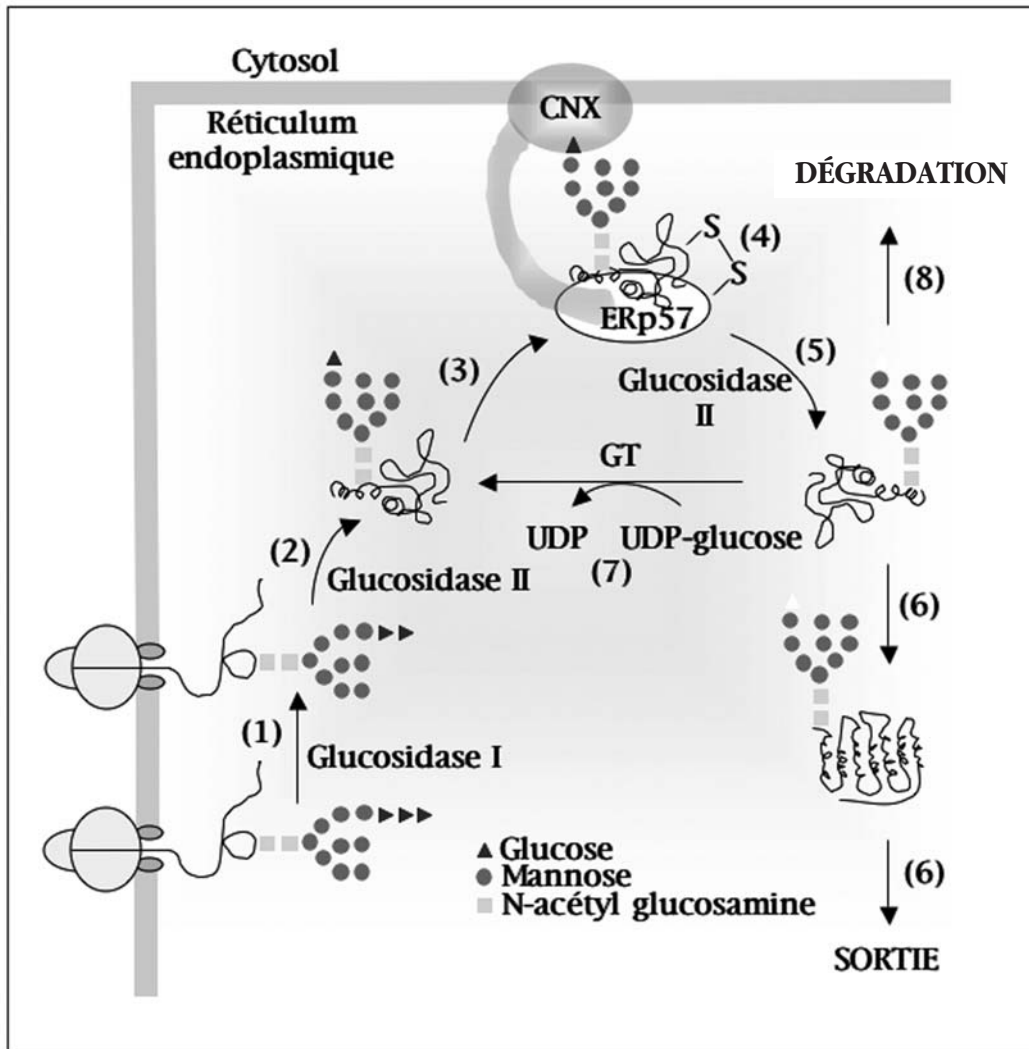


FIG. 3. – Le cycle calnexine (CNX)/calréticuline. Deux des trois résidus glucoses sont rapidement éliminés par les glucosidases I (1) et II (2). La glycoprotéine monoglucosylée lie alors la calnexine et/ou la calréticuline (3) (ici seule la calnexine est représentée pour plus de clarté). Elle est ensuite exposée à ERp57 (4), une thiol-disulfure oxydoréductase associée aux lectines, pour former des ponts disulfures mixtes transitoires (S-S). Le dernier résidu glucose est alors éliminé par la glucosidase II (5) et le complexe lectine/glycoprotéine se dissocie. Si la glycoprotéine est correctement repliée, elle quitte le réticulum endoplasmique (6). Si la glycoprotéine n'est pas correctement repliée, elle est reconnue par un senseur (7), la glucosyltransférase UDP-glucose :glycoprotéine (GT), re-glucosylée et réassociée (3) avec la calnexine (et/ou la calréticuline). Le cycle se poursuit et se répète jusqu'à ce que la protéine soit correctement repliée (6) ou dégradée (8).

La séquence d'export du récepteur V2 est composée de deux résidus leucine L³³⁹ et L³⁴⁰ précédés d'un résidu acide glutamique E³³⁵ et forment le motif ³³⁵E(X)₃LL³⁴⁰. Les mutations de ce motif entraînent la rétention du récepteur V2 dans le RE (Oksche *et al.*, 1998). Il a ensuite été établi que le motif ³³⁵E(X)₃LL³⁴⁰ est important pour un repliement correct du récepteur V2 de la vasopressine et que les résidus leucines sont impliqués dans une interaction hydrophobe avec un autre résidu leucine de la première boucle intracellulaire du récepteur (Krause *et al.*, 2000).

La séquence d'export du RE du récepteur V1a de la vasopressine n'a pas été clairement mise en évidence

même si des études récentes laissent supposer l'implication d'un motif DRY localisé au niveau de la deuxième boucle intracellulaire du récepteur (Hawtin, 2005).

Les motifs d'export des récepteurs V1b et V2 partagent un certain degré d'homologie en terme de propriétés physicochimiques de leurs acides aminés et de leur localisation proximale dans le domaine C-terminal et participent à la formation d'une huitième hélice α à la sortie du TM7. La formation d'une huitième hélice α dans le domaine C-terminal, qui serait impliquée dans la sortie du RE, semble représenter une caractéristique générale partagée par un grand nombre de RCPGs (Bermak *et al.*, 2001 ; Duvernay *et al.*, 2004 ; Krause *et al.*, 2000).

LES CHAPERONS PHARMACOLOGIQUES DES RÉCEPTEURS DE LA VASOPRESSINE

Plus de 150 mutations naturelles dans la séquence codante du récepteur V2 de la vasopressine sont responsables de diabètes insipides néphrogéniques (DIN). Les DIN sont caractérisés par l'excrétion d'une large quantité d'urine hypotonique en présence d'un taux circulant normal de vasopressine. Les patients atteints de DIN ne répondent plus à l'AVP, ne concentrent plus leur urine et sont sujets à des polyuries suivies de polydipsie (Morello & Bichet, 2001). Bien que certaines mutations entraînent une perte de liaison à la vasopressine ou une perte de couplage à la protéine G, la majorité de ces récepteurs mutants (70 %) sont reconnus comme étant incorrectement repliés et sont donc retenus dans le RE par le système de contrôle qualité avant d'être dégradés (Ala *et al.*, 1998 ; Sadeghi *et al.*, 1997 ; Tsukaguchi *et al.*, 1995). Cependant, la plupart de ces mutations sont relativement modestes et ne devraient pas affecter les sites peptidiques fonctionnels des récepteurs. Ces observations ont donné naissance au nouveau concept de maladie de conformation (Kopito & Ron, 2000). En d'autres termes, permettre la sortie du RE de ces protéines et leur expression à la surface cellulaire devrait être suffisant pour restaurer leur réponse à la vasopressine. En se

basant sur des études préalables indiquant que la liaison de composés chimiques non spécifiques comme le DMSO, le TMAO et le glycérol (Brown *et al.*, 1996 ; Sato *et al.*, 1996) pouvait stabiliser la conformation de protéines mutantes, l'équipe du Pr Bouvier, à Montréal, a testé l'idée que la liaison d'un ligand spécifique à un récepteur mutant pourrait jouer un rôle similaire et restaurer à la fois l'expression à la surface cellulaire et les fonctions biologiques de récepteurs V2 de la vasopressine mutants. De ces expériences est né le concept de chaperons pharmacologiques correspondant à des petits ligands sélectifs non peptidiques, agonistes ou antagonistes, perméables aux membranes biologiques et donc capables d'accéder au réticulum endoplasmique où sont séquestrés les récepteurs V2 mutants (Morello *et al.*, 2000a). Ces molécules se lient aux récepteurs mutants V2 dans le RE, favorisent leur repliement correct et leur adressage membranaire. Une fois exprimés à la membrane plasmique, les récepteurs V2 sont alors capables de lier la vasopressine et d'activer les voies de signalisation intracellulaires.

Ainsi, le traitement de cellules avec des antagonistes spécifiques du récepteur V2, le SR121463A/B et le VPA-985, ont conduit à restaurer *in vitro* la maturation, l'expression à la surface cellulaire et les fonctions biologiques de plusieurs mutants naturels du récepteur V2

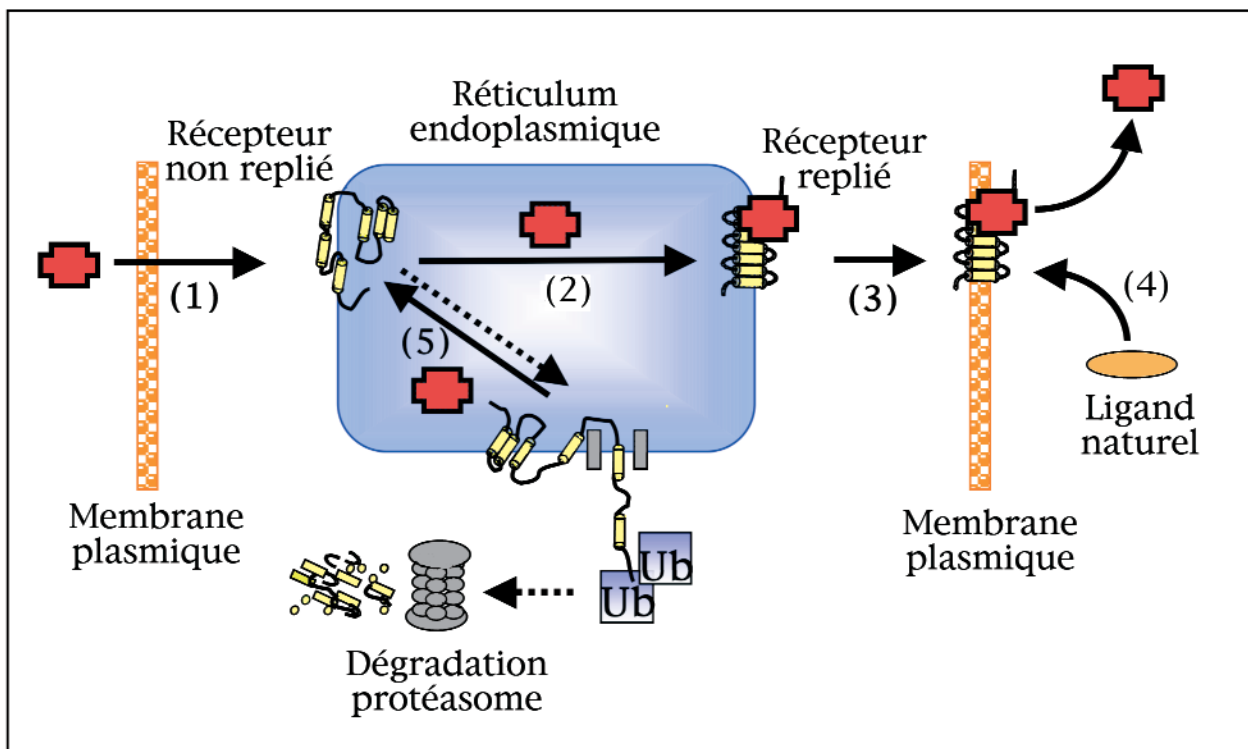


FIG. 4. – Mécanismes d'action des chaperons pharmacologiques. Les chaperons pharmacologiques (■) traversent la membrane plasmique (1) et la membrane du réticulum endoplasmique et lient les récepteurs mutants non repliés favorisant leur repliement correct (2). Les récepteurs repliés sont acheminés à la membrane plasmique (3) où ils peuvent lier leur ligand naturel (4) et activer les voies de signalisation intracellulaires. Les chaperons pharmacologiques agissent aussi en diminuant l'ubiquitination (Ub) et la dégradation par le protéasome des récepteurs (5).

retenus normalement dans le RE (Morello *et al.*, 2000b, Wuller *et al.*, 2004). Un chaperon pharmacologique a également été testé cliniquement sur cinq patients atteints de DIN. Le SR49059 agit en augmentant la réabsorption de l'eau et en diminuant la sécrétion urinaire de ces patients (Bichet *et al.*, 2002, NDI conférence).

Nous avons également décrit que le premier antagoniste non peptidique du récepteur V1b, le SSR149415, synthétisé récemment (Serradeil-Le Gal *et al.*, 2002a) se comporte comme un chaperon pharmacologique pour le premier mutant perte de fonction du récepteur V1b muté sur son motif d'export ($^{341}\text{FN}(\text{X})_2\text{LL}(\text{X})_3\text{L}^{350}$ en thréonine $^{341}\text{TT}(\text{X})_2\text{TT}(\text{X})_3\text{T}^{350}$) en restaurant sa maturation, son expression membranaire et ses fonctions biologiques (Robert *et al.*, 2005a). Notre étude a permis pour la première fois de mettre en évidence les mécanismes d'action des chaperons pharmacologiques sur les récepteurs mutants retenus dans le RE en montrant que le SSR149415 module les processus de dégradation et de conformation du récepteur V1b mutant. En effet, le SSR149415 agit en augmentant l'expression cellulaire totale du récepteur, et en diminuant la quantité de récepteurs complexés à l'ubiquitine, complexes destinés à la dégradation subséquente par le protéasome (Robert *et al.*, 2005a). Parallèlement, la dissociation du complexe récepteur V1b-calnexine est accélérée en présence de SSR149415 et comparable à celle du récepteur sauvage soulignant un rôle de la molécule dans la stabilisation et dans l'acquisition d'une conformation du récepteur mutant susceptible d'échapper au système de contrôle qualité du RE et d'être acheminée à la membrane plasmique (Robert *et al.*, 2005a) (Fig. 4).

Ces observations associées à la spécificité pharmacologique de ces molécules contribuent à l'émergence d'un nouveau concept véhiculant l'idée que les chaperons pharmacologiques assistent le repliement et l'export du RE des récepteurs couplés aux protéines G.

CONCLUSION

Les études intensives réalisées ces dernières années sur les récepteurs de la vasopressine, et particulièrement sur les récepteurs V1b et V2, ont contribué à une meilleure compréhension des mécanismes et des déterminants moléculaires responsables de leur export du réticulum endoplasmique. La mise en évidence de séquences d'export de ces récepteurs ouvre la voie à la recherche des partenaires protéiques de la machinerie d'export ou du système de contrôle qualité du RE susceptibles d'interagir avec ces motifs et de moduler la sortie du RE et/ou la présence à la membrane plasmique de ces récepteurs.

Parallèlement, la découverte des chaperons pharmacologiques représente une avancée extraordinaire pour cerner au mieux la physiopathologie et améliorer les traitements de maladies liées à un défaut d'export comme les diabètes insipides néphrogéniques. Alors que ces molécules représentent un avenir thérapeutique prometteur, les recherches se tournent aussi vers l'identification

de molécules capables d'interagir avec les protéines natives et d'altérer leur cinétique de repliement conduisant à leur repliement incorrect et à leur dégradation. De telles molécules pourraient trouver une application dans le développement de thérapeutiques anti-cancéreuses.

BIBLIOGRAPHIE

- Acher R., Manoussos G. & Olivry G., Relation between oxytocin and Van Dyke's protein and between vasopressin and Van Dyke's protein. *Biochim. Biophys. Acta*, 1955, 16, 155-156.
- Aguilera G. & Rabadan-Diehl C., Vasopressinergic regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis: implications for stress adaptation. *Regul. Pept.*, 2000, 96, 23-29.
- Ahner A. & Brodsky J. L., Checkpoints in ER-associated degradation: excuse me, which way to the proteasome? *Trends Cell Biol.*, 2004, 14, 474-478.
- Ala Y., Morin D., Mouillac B., Sabatier N., Vargas R., Cotte N., Dechaux M., Antignac C., Arthus M. F., Lonergan M., Turner M. S., Balestre M. N., Alonso G., Hibert M., Barberis C., HENDY G. N., Bichet D. G. & Jard S., 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, 1861-1872.
- Bermak J. C., Li M., Bullock C. & Zhou Q. Y., Regulation of transport of the dopamine D1 receptor by a new membrane-associated ER protein. *Nat. Cell. Biol.*, 2001, 3, 492-498.
- Birnbaumer M., Seibold A., Gilbert S., Ishido M., Barberis C., Antaramian A., Brabet P. & Rosenthal W., Molecular cloning of the receptor for human antidiuretic hormone. *Nature*, 1992, 357, 333-335.
- Birnbaumer M., Vasopressin receptors. *Trends Endocrinol. Metab.*, 2000, 11, 406-410.
- Brown C. R., Hong-Brown L. Q., Biwersi J., Verkman A. S. & Welch W. J., Chemical chaperones correct the mutant phenotype of the δ F508 cystic fibrosis transmembrane conductance regulator protein. *Cell. Stress Chaperones*, 1996, 1, 117-125.
- Butlen D., Guillon G., Rajerison R. M., Jard S., Sawyer W. H. & Manning M., Structural requirements for activation of vasopressin-sensitive adenylate cyclase, hormone binding, and antidiuretic actions: effects of highly potent analogues and competitive inhibitors. *Mol. Pharmacol.*, 1978, 14, 1006-1017.
- Byron K. L., Vasopressin stimulates Ca^{2+} spiking activity in A7r5 vascular smooth muscle cells via activation of phospholipase A2. *Circ. Res.*, 1996, 78, 813-820.
- de Keyzer Y., Auzan C., Lenne F., Beldjord C., Thibonnier M., Bertagna X. & Clauser E., Cloning and characterization of the human V3 pituitary vasopressin receptor. *FEBS Lett.*, 1994, 356, 215-220.
- Derick S., Cheng L. L., Voirol M. J., Stoev S., Giacomini M., Wo N. C., Szeto H. H., Ben Mimoun M., Andres M., Gaillard R. C., Guillon G. & Manning M., [1-deamino-4-cyclohexylalanine] arginine vasopressin: a potent and specific agonist for vasopressin V1b receptors. *Endocrinology*, 2002, 143, 4655-4664.
- Duvernay M. T., Zhou F. & Wu G., A conserved motif for the transport of G protein-coupled receptors from the endoplasmic reticulum to the cell surface. *J. Biol. Chem.*, 2004, 279, 30741-30750.
- Ellgaard L., Riek R., Braun D., Herrmann T., Helenius A. & Wuthrich K., Three-dimensional structure topology of the calreticulin P-domain based on NMR assignment. *FEBS Lett.*, 2001, 488, 69-73.

- Ellgaard L. & Helenius A., Quality control in the endoplasmic reticulum. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.*, 2003, 4, 181-191.
- Grazzini E., Lodboerer A. M., Perez-Martin A., Joubert D. & Guillon G., Molecular and functional characterization of V1b vasopressin receptor in rat adrenal medulla. *Endocrinology*, 1996, 137, 3906-3914.
- Guillon G., Derick S., Pena A., Cheng L. L., Stoev S., Seyer R., Morgat J. L., Barberis C., Gal C. S., Wagnon J. & Manning M., The discovery of novel vasopressin V1b receptor ligands for pharmacological, functional and structural investigations. *J. Neuroendocrinol.*, 2004, 16, 356-361.
- Hawtin S. R., Charged residues of the conserved DRY triplet of the vasopressin V1a receptor provide molecular determinants for cell surface delivery and internalization. *Mol. Pharmacol.*, 2005, 68, 1172-1182.
- Helenius A. & Aebi M., Roles of N-linked glycans in the endoplasmic reticulum. *Annu. Rev. Biochem.*, 2004, 73, 1019-1049.
- Jard S., Butlen D., Cantau B., Guillon G., Marie J. & Roy C., The mechanisms of action of antidiuretic hormone. *Adv. Nephrol. Necker Hosp.*, 1984, 13, 163-177.
- Kopito R. R. & Ron D., Conformational disease. *Nat. Cell. Biol.*, 2000, 2, E207-E209.
- Krause G., Hermosilla R., Oksche A., Rutz C., Rosenthal W. & Schulein R., Molecular and conformational features of a transport-relevant domain in the C-terminal tail of the vasopressin V(2) receptor. *Mol. Pharmacol.*, 2000, 57, 232-242.
- Lee B., Yang C., Chen T. H., Al Azawi N. & Hsu W. H., Effect of AVP and oxytocin on insulin release: involvement of V1b receptors. *Am. J. Physiol.*, 1995, 269, E1095-E1100.
- Molinari M. & Helenius A., Glycoproteins form mixed disulphides with oxidoreductases during folding in living cells. *Nature*, 1999, 402, 90-93.
- Morello J. P., Petaja-Repo U. E., Bichet D. G. & Bouvier M., Pharmacological chaperones: a new twist on receptor folding. *Trends Pharmacol. Sci.*, 2000a, 21, 466-469.
- Morello J. P., Salahpour A., Laperriere A., Bernier V., Arthus M. F., Lonergan M., Petaja-Repo U. E., Angers S., Morin D., Bichet D. G. & Bouvier M., Pharmacological chaperones rescue cell-surface expression and function of misfolded V2 vasopressin receptor mutants. *J. Clin. Invest.*, 2000b, 105, 887-895.
- Morello J. P. & Bichet D. G., Nephrogenic diabetes insipidus. *Annu. Rev. Physiol.*, 2001, 63, 607-630.
- Morello J. P., Salahpour A., Petaja-Repo U. E., Laperriere A., Lonergan M., Arthus M. F., Nabi I. R., Bichet D. G. & Bouvier M., Association of calnexin with wild type and mutant AVPR2 that causes nephrogenic diabetes insipidus. *Biochemistry*, 2001, 40, 6766-6775.
- Mouillac B., Chini B., Balestre M. N., Elands J., Trumpp-Kallmeyer S., Hoflack J., Hibert M., Jard S. & Barberis C., The binding site of neuropeptide vasopressin V1a receptor. Evidence for a major localization within transmembrane regions. *J. Biol. Chem.*, 1995, 270, 25771-25777.
- Nishikawa S., Brodsky J. L. & Nakatsukasa K., Roles of molecular chaperones in endoplasmic reticulum (ER) quality control and ER-associated degradation (ERAD). *J. Biochem. (Tokyo)*, 2005, 137, 551-555.
- Oksche A., Dehe M., Schulein R., Wiesner B. & Rosenthal W., Folding and cell surface expression of the vasopressin V2 receptor: requirement of the intracellular C-terminus. *FEBS Lett.*, 1998, 424, 57-62.
- Oliver J. D., Roderick H. L., Llewellyn D. H. & High S., ERp57 functions as a subunit of specific complexes formed with the ER lectins calreticulin and calnexin. *Mol. Biol. Cell*, 1999, 10, 2573-2582.
- Orloff J. & Handler J., The role of adenosine 3',5'-phosphate in the action of antidiuretic hormone. *Am. J. Med.*, 1967, 42, 757-768.
- Ostrowski N. L., Lolait S. J., Bradley D. J., O'Carroll A. M., Brownstein M. J. & Young W. S., Distribution of V1a and V2 vasopressin receptor messenger ribonucleic acids in rat liver, kidney, pituitary and brain. *Endocrinology*, 1992, 131, 533-535.
- Robert J., Auzan C., Ventura M. A. & Clauser E., Mechanisms of cell-surface rerouting of an ER-retained mutant of the vasopressin V1b/V3 receptor by a pharmacological chaperone. *J. Biol. Chem.*, 2005, 280, 42198-42206.
- Robert J., Clauser E., Petit P. & Ventura M. A., A novel C-terminal motif is necessary for the export of the vasopressin V1b/V3 receptor to the plasma membrane. *J. Biol. Chem.*, 2005, 280, 2300-2308.
- Sadeghi H., Robertson G. L., Bichet D. G., Innamorati G. & Birnbaumer M., Biochemical basis of partial nephrogenic diabetes insipidus phenotypes. *Mol. Endocrinol.*, 1997, 11, 1806-1813.
- Sato S., Ward C. L., Krouse M. E., Wine J. J. & Kopito R. R., Glycerol reverses the misfolding phenotype of the most common cystic fibrosis mutation. *J. Biol. Chem.*, 1996, 271, 635-638.
- Schrag J. D., Bergeron J. J., Li Y., Borisova S., Hahn M., Thomas D. Y. & Cygler M., The Structure of calnexin, an ER chaperone involved in quality control of protein folding. *Mol. Cell*, 2001, 8, 633-644.
- Serradeil-Le Gal C., Wagnon J., Simiand J., Griebel G., Lacour C., Guillon G., Barberis C., Brossard G., Soubrie P., Nisato D., Pascal M., Pruss R., Scatton B., Maffrand J. P. & Le Fur G., Characterization of (2S,4R)-1-[5-chloro-1-[(2,4-dimethoxyphenyl)sulfonyl]-3-(2-methoxy-phenyl)-2-oxo-2,3-dihydro-1H-indol-3-yl]-4-hydroxy-N,N-dimethyl-2-pyrrolidine carboxamide (SSR149415), a selective and orally active vasopressin V1b receptor antagonist. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 2002a, 300, 1122-1130.
- Serradeil-Le Gal C., Wagnon J., Valette G., Garcia G., Pascal M., Maffrand J. P. & Le Fur G., Nonpeptide vasopressin receptor antagonists: development of selective and orally active V1a, V2 and V1b receptor ligands. *Prog. Brain Res.*, 2002b, 139, 197-210.
- Terada Y., Tomita K., Nonoguchi H., Yang T. & Marumo F., Different localization and regulation of two types of vasopressin receptor messenger RNA in microdissected rat nephron segments using reverse transcription polymerase chain reaction. *J. Clin. Invest.*, 1993, 92, 2339-2345.
- Thibonnier M., Auzan C., Madhun Z., Wilkins P., Berti-Mattera L. & Clauser E., Molecular cloning, sequencing, and functional expression of a cDNA encoding the human V1a vasopressin receptor. *J. Biol. Chem.*, 1994, 269, 3304-3310.
- Thibonnier M., Preston J. A., Dulin N., Wilkins P., Berti-Mattera L. N. & Mattera R., The human V3 pituitary vasopressin receptor: ligand binding profile and density-dependent signaling pathways. *Endocrinology*, 1997, 138, 4109-4122.
- Trombetta E. S. & Parodi A. J., Quality control and protein folding in the secretory pathway. *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.*, 2003, 19, 649-676.
- Tsukaguchi H., Matsubara H., Taketani S., Mori Y., Seido T. & Inada M., Binding-, intracellular transport-, and biosynthesis-defective mutants of vasopressin type 2 receptor in patients with X-linked nephrogenic diabetes insipidus. *J. Clin. Invest.*, 1995, 96, 2043-2050.
- Wange R. L., Smrcka A., Sternweis P. C. & Exton J. H., Photoaffinity labeling of two rat liver plasma membrane proteins with [32P]gamma-azidoanilido GTP in response to vasopressin. Immunologic identification as alpha subunits of the Gq class of G proteins. *J. Biol. Chem.*, 1991, 266, 11409-11412.
- Ware F. E., Vassilakos A., Peterson P. A., Jackson M. R., Lehman M. A. & Williams D. B., The molecular chaperone calnexin binds Glc1Man9GlcNAc2 oligosaccharide as an initial step in recognizing unfolded glycoproteins. *J. Biol. Chem.*, 1995, 270, 4697-4704.

- Wersinger S. R., Ginns E. I., O'Carroll A. M., Lolait S. J. & Young W. S., 3rd, Vasopressin V1b receptor knockout reduces aggressive behavior in male mice. *Mol. Psychiatry*, 2002, 7, 975-984.
- Won J. G. & Orth D. N., Role of lipoxygenase metabolites of arachidonic acid in the regulation of adrenocorticotropin secretion by perfused rat anterior pituitary cells. *Endocrinology*, 1994, 135, 1496-1503.
- Wuller S., Wiesner B., Loffler A., Furkert J., Krause G., Hermosilla R., Schaefer M., Schulein R., Rosenthal W. & Oksche A., Pharmacochaperones post-translationally enhance cell surface expression by increasing conformational stability of wild-type and mutant vasopressin V2 receptors. *J. Biol. Chem.*, 2004, 279, 47254-47263.
- Yibchok-Anun S., Cheng H., Heine P. A. & Hsu W. H., Characterization of receptors mediating AVP- and OT-induced glucagon release from the rat pancreas. *Am. J. Physiol.*, 1999, 277, 56-62.
-