

Université de Montréal

**Conséquences fonctionnelles de mutations affectant le
récepteur de la vasopressine de type 2 et implications
thérapeutiques**

par
Eric Carpentier

Département de Biochimie
Faculté de Médecine

Thèse présentée à la Faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de Doctorat
en Biochimie

Juin, 2011

© Eric Carpentier, 2011

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Cette thèse intitulée:

Conséquences fonctionnelles de mutations affectant le récepteur de la vasopressine de type 2 et
implications thérapeutiques

présentée par:
Eric Carpentier

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes :

Gerardo Feybere, président-rapporteur
Michel Bouvier, directeur de recherche
Yves Durocher, co-directeur
Marc Servant, membre du jury
Bernard Mouillac, examinateur externe
Jean-Yves Lapointe, représentant du doyen de la FES

Résumé

Le récepteur de la vasopressine de type 2 (V2R) joue un rôle crucial dans l'homéostasie hydrique. Exprimé principalement au niveau du rein, son activation par l'hormone antidiurétique arginine-vasopressine (AVP) favorise la réabsorption d'eau, participant ainsi à diminuer la diurèse. Plus de 200 mutations dans le gène du V2R ont été associées au diabète néphrogénique insipide congénital (DINc), une maladie causée par une perte de fonction du récepteur. À l'opposé, trois mutations découvertes récemment induisent un gain de fonction du V2R, et sont la cause du syndrome néphrogénique de l'anti-diurèse inappropriée (NSIAD). Les travaux de cette thèse visent à mieux comprendre les bases moléculaires responsables de la perte ou du gain de fonction des récepteurs mutants associés à ces deux maladies.

Dans plus de 50% des cas, les mutations faux-sens affectent négativement l'adoption d'une conformation native par le V2R, provoquant la reconnaissance et la rétention intracellulaire des mutants par le système de contrôle de qualité du réticulum endoplasmique. Nos résultats ont démontré que l'interaction entre les récepteurs mutants et le chaperon moléculaire calnexine est dépendante de N-glycosylation et que sa durée varie en fonction de la mutation. De plus, l'importance de cette modification co-translationnelle et des interactions lectines-sucre dans le processus de maturation d'un mutant donné s'est avérée une caractéristique intrinsèque, puisque l'absence de N-glycosylation n'a pas affecté le mutant Y128S (phénotype léger) tandis que la maturation du mutant W164S (phénotype sévère) a été totalement abolie. Nos résultats suggèrent aussi que l'action des chaperons pharmacologiques (CP), molécules favorisant la maturation des mutants du V2R, peut survenir à différentes étapes au cours du processus de maturation, selon le mutant réchappé. Ces différences entre mutants suggèrent des processus biosynthétiques 'personnalisés' dictés par la nature de la mutation impliquée et pourraient expliquer la différence de sévérité des manifestations cliniques chez les patients porteurs de ces mutations.

Bien qu'une récupération de fonction ait été obtenue pour les mutants Y128S et W164S par un traitement au CP, il n'en est pas de même pour toutes les mutations occasionnant un défaut conformationnel. C'est ce que nous avons démontré pour le mutant V88M, affligé de deux défauts, soit une faible efficacité de maturation combinée à une basse affinité pour l'AVP. Dans ce cas, et malgré une augmentation du nombre de récepteurs mutants la surface cellulaire, la

diminution de l'affinité apparente du récepteur mutant pour l'AVP a été exacerbée par la présence résiduelle de CP à son site de liaison, rendant impossible l'activation du récepteur aux concentrations physiologiques d'AVP.

Les mutants R137C et R137L ont une activité constitutive élevée et mènent au NSIAD tandis que la substitution de cette même arginine par une histidine (R137H) mène au DINc. Ces trois mutants se sont avérés partager plusieurs caractéristiques, dont une efficacité de maturation réduite et une désensibilisation spontanée élevée. La seule différence identifiée entre ces mutants est leur niveau d'activité constitutive. Le CP utilisé dans nos études possède aussi la propriété d'agoniste inverse, mais n'a pourtant pas diminué l'activité constitutive des mutants R137C/L, suggérant une conformation active 'figée'. Seul l'effet chaperon a été observé, entraînant la hausse de récepteurs à la surface cellulaire, qui se traduit par une augmentation de la production de second messager. Nous avons par contre suggéré l'utilisation d'AVP puisqu'il favorise l'endocytose des récepteurs R137/L sans promouvoir leur activation, diminuant ainsi le nombre de récepteurs actifs à la surface cellulaire. Nous avons identifié la première mutation occasionnant un gain de fonction du V2R qui n'implique pas l'arginine 137. Le mutant F229V a une activité constitutive élevée et, contrairement aux R137C et R137L, il n'est pas sujet à une désensibilisation spontanée accrue. L'observation que des agonistes inverses sont aptes à inhiber l'activité constitutive de ce nouveau mutant est une découverte importante puisque l'insuccès obtenu avec les mutations précédentes suggérait que ces molécules n'étaient pas utiles pour le traitement du NSIAD.

Considérés globalement, ces travaux illustrent le caractère particulier des formes mutantes du V2R et l'importance de bien cerner les conséquences fonctionnelles des mutations afin d'apporter aux patients atteints de DINc ou NSIAD une thérapie personnalisée, et de développer de nouveaux agents thérapeutiques adaptés aux besoins.

Mots-clés : Récepteur couplés aux protéines G (RCPG), récepteur de la vasopressine de type 2 (V2R), diabète insipide néphrogénique congénital (DINc), syndrome néphrogénique de l'anti-diurèse inappropriée (NSIAD), arginine-vasopressine (AVP), chaperon pharmacologique (CP), calnexine (Cnx), N-glycosylation, agoniste inverse.

Abstract

The vasopressin type 2 receptor (V2R) plays an important role in water homeostasis. Mainly expressed in the collecting ducts of the kidney, V2R activation by the antidiuretic hormone arginine-vasopressin (AVP) leads to water reabsorption, resulting in a decrease urine output. More than 200 mutations in the V2R gene have been link to the aetiology of the congenital form of nephrogenic diabetes insipidus (cNDI), resulting from a receptor loss-of-function. In contrast, three recently identified mutations have been shown to cause a gain-of-function of the V2R leading to the nephrogenic syndrome of inappropriate antidiuresis (NSIAD). The work presented herein is focussed on a better understanding of the molecular determinants leading to the loss- or gain-of-function of V2R mutants.

More than 50% of missense mutations affecting the V2R were shown to hamper the receptor's ability to adopt its native conformation and to cause its intracellular retention by the endoplasmic reticulum quality control system. We thus looked at the role of N-glycosylation and calnexin (Cnx) in the maturation process of mutant V2R, and their importance for receptor rescue by pharmacological chaperones (PC). Our results have shown that N-glycosylation is required for Cnx binding to the receptors and that the duration of this interaction is correlated to the severity of the misfolded state of the mutant. The importance of N-glycosylation and to sugar-mediated interactions in the maturation process of a given V2R mutant was found to be intrinsic property, as it had no significant repercussion on the mild phenotype-associated Y128S mutant, while it completely abolished maturation of the W164S mutant, associated with a severe phenotype. Moreover, we have shown that pharmacological chaperoning can occur at different steps during the maturation process, according to the mutant studied. These mutant-specific differences indicate that the biosynthetic processing of mutant V2R is highly influenced by the nature of the mutation itself and could partially explain the variations in the clinical outcome severity among NDI-causing mutant V2Rs.

Although a functionality rescue of W164S and Y128S mutants was obtained upon exposure to PC, it is not the case for all V2R mutants with a maturation defect. The V88M-V2R was found affected both in its maturation and its affinity toward AVP. In this case, and despite a significant increase in maturation and cell surface expression, the PC treatment led to a further

loss in the receptor's affinity for AVP, preventing its activation at physiological AVP concentrations.

The R137C and R137L mutants are endowed with a high constitutive activity leading to NSIAD. Stunningly, substitution of this arginine by histidine (R137H) was associated with cNDI. These three mutant V2R were found to share many characteristics, of which a compromised maturation and elevated spontaneous desensitization. The only difference between these mutants relies on their constitutive activity levels. The PC used in our studies is also an inverse agonist, but failed to reduce the constitutive activity of the R137C/L mutants, entailing a 'locked' active conformation. Instead, the chaperoning property of the compound led to an increase in the number of constitutively active receptor at the cell surface. We have thus proposed the use of AVP as a treatment, as it was shown to cause receptor's endocytosis without promoting their activation, leading to a reduced active receptor number at the cell surface.

We have identified a new gain-of-function mutation affecting the V2R, the first not involving arginine 137. The F229V substitution was shown to confer high constitutive activity to the receptor, but unlike the two other NSIAD-causing mutants, it does not undergo elevated spontaneous desensitization. The observation that inverse agonists are efficient at inhibiting the constitutive activity of the F229V mutant is an important discovery since the unfruitful attempts obtained with the other constitutively active mutants led some investigators to the erroneous conclusion that inverse agonists were not useful for the treatment of NSIAD.

Taken together, these findings underline the 'individuality' of V2R mutants and the importance of their functional characterization in order to bring personalized therapeutic strategies for patients with cNDI or NSIAD, and to develop new therapeutics adapted to the patient's needs.

Key words: G-protein-coupled receptor (GPCR), vasopressin type 2 receptor (V2R), congenital nephrogenic diabetes insipidus (cNDI), nephrogenic syndrome of inappropriate antidiuresis (NSIAD), arginine-vasopressin (AVP), pharmacological chaperone (PC), calnexin, N-glycosylation, inverse agonist.

Table des matières

AVANT-PROPOS	xviii
INTRODUCTION.....	15
Chapitre 1 : Homéostasie de l'eau et physiologie rénale	18
1.1 Filtration glomérulaire :	20
1.2 Réabsorption et sécrétion tubulaire	21
1.3 Aquaporines	26
Chapitre 2 : Le système vasopressinergique	34
2.1 L'arginine-vasopressine	34
Chapitre 3 : Les RCPGs et le récepteur de la vasopressine V2.....	38
3.1 Récepteurs couplés aux protéines G.....	38
3.2 Les protéines G hétéro-trimériques et leurs effecteurs.....	48
3.3 Signalisation indépendante des protéines G.....	51
3.4 Désensibilisation	52
3.5 Le récepteur de la vasopressine V2.....	54
Chapitre 4 : Désordres hydriques associés au système vasopressinergique.....	59
4.1 Le Diabetes Insipidus.....	59
4.2 Le diabète insipide néphrogénique congénital (DINc)	61
4.3 Syndrome de la sécrétion inappropriée de l'hormone antidiurétique	64
4.4 Syndrome néphrogénique de l'anti-diurèse inappropriée	65
Chapitre 5 : Synthèse et maturation des protéines membranaires et sécrétées	67
5.1 Translocation et intégration membranaire des protéines en synthèse au RE	68
5.2 Glycans liés aux asparagines.....	70
5.3 Chaperons moléculaires, senseurs et enzymes de repliement du RE.....	79
5.4 Élimination des glycoprotéines mal repliées.....	82
5.4 Transport antérograde des RCPGs	85
Chapitre 6 : Maladies conformationnelles	87

6.1 Agrégation.....	87
6.2 Dégradation	88
6.3 RCPGs et maladies conformationnelles.....	89
6.4 Chaperons chimiques et pharmacologiques	90
OBJECTIFS DE LA THÈSE	105
RÉSULTATS	106
ARTICLE 1	107
Vasopressin Type 2 Receptor V88M Mutation: Molecular Basis of Partial and Complete Nephrogenic Diabetes Insipidus.....	107
ARTICLE 2.....	135
Functional characterization of vasopressin type 2 receptor substitutions (R137H/C/L) leading to nephrogenic diabetes insipidus and nephrogenic syndrome of inappropriate antidiuresis: implications for treatments.....	135
ARTICLE 3	177
A novel NSIAD-causing mutation leads to a constitutive activation of the vasopressin type 2 receptor that can be inhibited by inverse agonists.....	177
ARTICLE 4.....	200
Role of N-glycosylation on the maturation and trafficking of NDI-causing V2 vasopressin receptor mutants	200
DISCUSSION	237
7.1 Variations phénotypiques chez des patients atteints de DINc et porteurs de la substitution V88M	237
7.2 Conséquences fonctionnelles de substitutions de l'arginine 137 du récepteur V2	244
7.3 Nouvelle mutation dans le gène <i>AVPR2</i> causant le NSIAD	252
7.4 Contrôle de qualité et chaperons pharmacologiques.....	257
LISTE DES RÉFÉRENCES	269

Liste des Tableaux

Tableau I: Maladies conformationnelles et chaperons.....	103
Tableau II: Données cliniques des porteurs de la substitution V88M d'une même famille.....	239

Liste des Figures

Figure 1 : Anatomie du rein et du néphron, unité fonctionnelle du rein.	19
Figure 2 : Régulation de la pression sanguine par le système rénine-angiotensine-aldostérone. ...	21
Figure 3 : Distribution segmentaire des différents transporteurs et canaux au niveau du néphron et tubule collecteur chez le rat.	23
Figure 4: Schématisation de la concentration de l'urine.	24
Figure 5: Modèle de la topologie de l'aquaporine 1.	28
Figure 6: Modèle des voies signalétiques impliquées dans régulation locale de la translocation des AQP2 au niveau des cellules principales du tubule collecteur du rein.	32
Figure 7: Comparaison des hormones vasopressine et oxytocine.	35
Figure 8: Modèle structural de la rhodopsine, récepteur archétype de la famille des RCPGs.	40
Figure 9: Rôles potentiels de l'oligomérisation des RCPGs.	45
Figure 11: Les protéines G hétéro-trimériques.	50
Figure 12: Mécanismes généraux impliqués dans la désensibilisation homologue des RCPGs.	54
Figure 14: Assemblage des protéines formant le translocon Sec61.	70
Figure 15: Structure de la Calnexine.	75
Figure 16: Traitement dans le RE des glycanes liés aux asparagines chez les mammifères.	76
Figure 17: Cycle de la calnexine.	78
Figure 18: Schéma de l'effet thermodynamique des osmolytes sur la stabilité des protéines.	92
Figure 19: Mécanisme d'action suggéré des chaperons pharmacologiques sur la récupération fonctionnelle des RCPGs.	100
Figure 20: Représentation en ruban d'une portion de la structure du récepteur V2, modélisée à partir de la structure du récepteur β 2-adrénergique.	256
Figure 21: Représentation en serpentins de la topologie du récepteur V2 et positionnement des acides aminés substitués à l'étude.	258
Figure 22: Mesure de BRET entre Cnx-YFP et les récepteurs V2 fusionnés à la Rluc.	264
Figure 23: Représentation graphique du mode d'action putatif des chaperons pharmacologiques.	266

Liste des sigles et abréviations

Acides aminés

A	Alanine
C	Cystéine
D	Acide aspartique
F	Phénylalanine
H	Histidine
L	Leucine
M	Méthionine
N	Asparagine
Q	Glutamine
R	Arginine
S	Sérine
V	Valine
W	Tryptophane
Y	Tyrosine

A ₁ R	Récepteur de l'adénosine de type 1
AC	Adénylate cyclase
ACE	Enzyme de conversion de l'angiotensine
ADH	Hormone antidiurétique
AQP	Aquaporine
ADN	Acide déoxyribonucléique
ADNc	ADN complémentaire
AKAP	Protéine d'échafaudage de la protéine kinase A
Akt	Protéine kinase B
AMPc	Adénosine monophosphate cyclique
AP-2	Protéine adaptatrice des clathrines 2
ARN	Acide ribonucléique

ARNc	ARN complémentaire
ARNm	ARN messenger
ATP	Adénosine triphosphate
AVP	Arginine-vasopressine
β 2AR	Récepteur β 2-adrénergique
B-ARK	Kinase des récepteur β -adrénergiques
BAPTA	Acide 1,2-bis(oaminophenoxy)ethane-N,N,N',N'-tetraacétique
BRET	Transfert d'énergie de résonance de bioluminescence
Ca ⁺⁺	Ion calcium
CaSR	Récepteur sensible au calcium
CFTR	Régulateur de la conductance transmembranaire de la fibrose kystique
CHIP28	Protéine membranaire intégrale de 28 kDa formant un canal
CK2	Caséine kinase de type 2
Cnx	Calnexine
COX-1	Cyclo-oxygénase 1
CP	Chaperon pharmacologique
CREB	Protéine de liaison des éléments de réponse à l'AMPc
Crt	Calréticuline
DDAVP	1-desamino-8-D-arginine-vasopressine
DI	Diabetes Insipidus
DINc	Diabète insipide néphrogénique congénital
EFGR	Récepteur du facteur de croissance épidermique
ENaC	Canal sodique épithéliale
EP3R	Récepteur de la prostaglandine E3
ERK	Kinase régulée par les sinaux extracellulaires
ET-1	Endothéline-1
ETBR	Récepteur B de l'endothéline
Fz	Récepteur Frizzled
GABABR	Récepteur de l'acide γ -aminobutyrique
GDP	Guanosine diphosphate
GEF	Facteur d'échange de la guanosine

GIP	Protéine interagissant avec les RCPGs
GRK	Kinase des récepteurs couplés aux protéines G
GTP	Guanosine triphosphate
H ⁺	Ion hydrogène
IMCD	Canal collecteur de la médulla interne
K ⁺	Ion potassium
kDa	Kilo Dalton
MAPK	Protéine kinase activée par les mitogènes
mGluR	Récepteur métabotropiques du glutamate
mOsm	Milliosmole
MRLC	Chaine légère régulatrice de la myosine non-musculaire
MYLK	Kinase des chaines légères de la myosine
Na ⁺	Ion sodium
NHE	Échangeur sodium-hydrogène
NHERF	facteur de régulation de l'échange Na ⁺ -H ⁺
NMDA	N-méthyl-D-aspartate
NSIAD	Syndrôme néphrogénique de l'anti-diurèse inappropriée
OST	Oligosaccharyltransférase
OT	Oxytocine
OTR	Récepteur de l'oxytocine
P2YR	Récepteur purinergique
PDZ	Domaine semblable à la protéine de densité synaptique-95/Discs-large/ZO-1
PGE2	Prostaglandine E2
PI3K	Phosphatidylinositol 3-kinase
PKA	Protéine kinase A
PKC	Protéine kinase C
PKG	Protéine kinase G
PLC	Phospholipase C
PMA	Phorbol 12-myristate 13-acetate
R7TM	Récepteur à sept tronçons transmembranaires
RCPG	Récepteur couplé aux protéines G

RE	Réticulum endoplasmique
RGS	Régulateur de la signalisation des protéines G
RTK	Récepteur tyrosine kinase
RyR1	Récepteur sensible à la ryanodine de type 1
SIADH	Syndrôme de la sécrétion inappropriée de l'hormone antidiurétique
Smo	Récepteur Smoothened
SNARE	Récepteur des protéines d'attachement des facteurs sensibles au N-ethylmaleimide
SP	Signal peptidase
SRP	Particule de reconnaissance du signal
T1R	Récepteur du goût
TM	Domaine transmembranaire
TRAM	Protéine membranaire associée au translocon
VAMP8	Protéine membranaire associée aux vésicules 8
V2R	Récepteur de la vasopressine de type 2

«La science restera toujours la satisfaction du plus haut désir de notre nature, la curiosité ; elle fournira à l'homme le seul moyen qu'il ait pour améliorer son sort».

Ernest Renan

Remerciements

Je voudrais tout d'abord remercier mon directeur de recherche, le Dr Michel Bouvier qui m'a accueilli dans son laboratoire et m'a permis de vivre ces dernières années dans un cadre de recherche extraordinaire, où se croisent des gens extrêmement brillants, fascinants et où la recherche est une histoire d'esprit, mais aussi de cœur. Sa passion, son intégrité, sa dévotion, sa patience ont tous été des traits de caractères qui m'ont beaucoup inspiré et fait de moi un meilleur chercheur.

Je tiens aussi à remercier mon co-directeur et ami, le Dr Yves Durocher, qui m'a aidé au moment opportun à prendre la meilleure décision de ma vie, soit de m'engager comme étudiant au doctorat malgré mon âge avancé. Durant ces années à travailler ensemble, le Dr Durocher a su m'inculquer la rigueur et l'audace nécessaires à la réalisation de tout projet scientifique.

Je ne pourrais passer sous le silence le plaisir que j'ai eu à côtoyer tous les membres du laboratoire, à échanger et argumenter sur des sujets scientifiques variés. Je voudrais remercier particulièrement le Dr Moulay Driss Rochdi qui m'a beaucoup aidé dans la réalisation de mes projets de recherche et à me réaliser moi-même; j'ai pour lui une admiration sans borne.

Je remercie ma famille et mes amis qui ont toujours cru en moi et encouragé tout au long de cette aventure. Je remercie Dominique, ma compagne de vie et mon amour, pour qui aucun obstacle n'est insurmontable. Sa force de caractère est d'inspiration quotidienne.

Finalement, j'aimerais remercier les organismes qui ont financé mes recherches via des bourses d'excellences; le Fond de recherche en santé du Québec FRSQ ainsi que la Faculté des études supérieures de l'Université de Montréal (FES).

AVANT-PROPOS

Les mutations spontanées, généralement rares et aléatoires, constituent la principale source de diversité génétique et sont le moteur de l'évolution. Certaines de ces mutations ont lieu à l'intérieur de gènes codant pour des protéines impliquées dans d'importants processus physiologiques et peuvent avoir de lourdes conséquences chez les individus porteurs. C'est le cas des mutations retrouvées au niveau du gène *AVPR2* dont le produit, le récepteur de la vasopressine de type 2, est impliqué dans l'homéostasie hydrique, un des paramètres physiologiques les plus fortement régulés par l'organisme. Ainsi, plusieurs formes mutantes de ce récepteur ont été associées à différentes pathologies pour lesquelles l'arsenal thérapeutique est encore aujourd'hui très limité. L'objectif de cette thèse est de mieux comprendre l'incidence des mutations sur la biologie du récepteur de la vasopressine de type 2 dans l'optique de permettre l'élaboration de stratégies thérapeutiques ciblées et adaptées aux défauts fonctionnels induits par ces mutations.

INTRODUCTION

Il y a plus de cent ans, le Dr Claude Bernard énonçait que la « fixité du milieu intérieur était une condition essentielle à la vie libre et indépendante » et que « sa constance nécessite un tel degré de perfection de l'organisme que les variations sont immédiatement compensées et ajustées ». Tel qu'il l'avait anticipé, il est maintenant établi que la majorité des mécanismes homéostatiques ont pour but essentiel de maintenir la constance des paramètres physico-chimiques des fluides corporels. La pression osmotique du sérum, représentant la concentration des substances dissoutes dans le sang, figure de façon proéminente parmi les paramètres les plus fortement défendus par l'organisme (Voisin et Bourque, 2002). Les mammifères corrigent les fluctuations osmotiques de façon précoce par des modulations concordantes de la soif et de la diurèse. Cette dernière est principalement régulée par l'efficacité à laquelle les reins retournent le liquide filtré vers la circulation sanguine et est sous le contrôle de l'hypothalamus, qui orchestre la libération de l'hormone antidiurétique en fonction des besoins, suite à l'intégration de signaux provenant de senseurs volumiques et osmotiques. Plusieurs conditions et pathologies peuvent affecter directement ou indirectement ces mécanismes et ont, sans prise en charge, des conséquences sévères.

Au niveau moléculaire, les effets de l'hormone antidiurétique sur le rein sont transmis par le récepteur de la vasopressine de type 2 (V2R) dont les signaux aboutissent à une diminution de la diurèse, en modulant la perméabilité aqueuse de segments de la tubulure rénale. Des désordres affectant la relation hormone/récepteur/effecteurs ont comme conséquence la perte du contrôle de l'homéostasie hydrique. Un événement menant à une perte de fonction de ce système se traduit par l'excrétion d'une grande quantité d'urine diluée, entraînant des risques de déshydratation sévère et d'hypernatrémie avec les conséquences qui s'y rattachent. Inversement, un désordre menant à un gain de fonction engendre une trop grande réabsorption d'eau, avec une production réduite d'urine concentrée, menant à l'hyponatrémie.

Certains de ces désordres sont génétiques et associés à des mutations au niveau du gène codant pour le récepteur V2. Ainsi, le diabète insipide néphrogénique congénital (DINc) est

majoritairement associé à des mutations menant à une perte de fonction du récepteur tandis que le syndrome néphrogénique de l'anti-diurèse inapproprié (NSIAD) résulte de mutations menant à un gain de fonction. Encore aujourd'hui, l'arsenal médical existant ne permet que d'atténuer les symptômes de ses deux pathologies, sans s'attaquer directement à la cause.

Cette thèse s'insère donc dans une dynamique de recherche visant à caractériser l'aspect moléculaire des phénotypes DINc et NSIAD en vue de développer des thérapies adaptées. Elle implique l'étude approfondie de l'impact de différentes mutations à occurrence naturelle sur le fonctionnement du récepteur V2 et à la caractérisation des mécanismes d'action et du potentiel thérapeutique des chaperons pharmacologiques, une nouvelle classe d'agents thérapeutiques, sur ces dernières. Par des analyses de fonctions réalisées *in-vitro* et en collaboration avec des médecins spécialistes en néphrologie, les analyses ont permis de mieux comprendre le fondement moléculaire et la gravité des symptômes associés avec les différentes mutations étudiées et ainsi, d'aider à élaborer des stratégies thérapeutiques adaptées.

Considérés globalement, les résultats obtenus montrent qu'au niveau moléculaire, et malgré une sémiologie semblable, l'étiologie des maladies associées à des mutations dans le gène du récepteur V2 est particulière à la nature de la mutation impliquée, mettant en évidence des concepts de pharmacogénétique. Ces travaux démontrent la diversité des traitements à considérer pour les personnes atteintes de ces maladies et l'importance des analyses génétiques et d'une caractérisation biochimique approfondie des formes mutantes de récepteurs dans ce processus. De plus, les analyses mécanistiques effectuées sur de nouvelles classes d'agents thérapeutiques potentiels ont permis de mieux comprendre leur mode d'action et de mieux cibler leur utilisation pour le traitement des maladies étudiées ici et ces notions sont applicables à plusieurs autres pathologies connues ayant des caractéristiques et fondements semblables. Ainsi, les avancées futures permettront peut-être de ne plus traiter que les symptômes, mais la cause du DINc et NSIAD.

Les prochaines sections de cette introduction font état de l'avancée des connaissances des différents sujets pertinents aux études réalisées dans cette thèse. Ainsi, seront abordés les principes d'homéostasie hydrique et du rôle des reins dans ce processus, et des pathologies associées au système vasopressinergique, qui régule certaines fonctions rénales. Un chapitre est consacré à la famille des récepteurs couplés aux protéines G dont fait partie le récepteur V2,

principal sujet d'étude de cette thèse. Enfin, les notions de synthèse et maturation des protéines membranaires et sécrétées seront abordées afin de mettre en contexte les pathologies de type 'conformationnelle' et les chaperons pharmacologiques, des agents thérapeutiques prometteurs pour le traitement de cette classe de maladie.

Chapitre 1 : Homéostasie de l'eau et physiologie rénale

L'eau est le principal constituant des cellules, des tissus et des organes et est essentielle à toute forme de vie (Lang et Waldegger, 1997). Chez l'humain, elle constitue 60% de la masse corporelle. De cette eau, le tiers forme le fluide extracellulaire, responsable du transport des nutriments et des déchets, du tonus vasculaire et tissulaire, de la thermorégulation, agissant aussi comme lubrifiant et absorbeur de chocs (Jequier et Constant, 2009). Dans des conditions d'activité physique modérée et où la température ambiante est tempérée, la balance hydrique demeure constante par une régulation très précise des entrées et sorties. Les entrées d'eau se font en buvant, en mangeant des aliments et par sa production *in situ*, engendrée par les réactions métaboliques, tandis que les pertes proviennent principalement de la sudation, de la respiration, de l'excrétion de l'urine et du système digestif. Les principaux mécanismes de régulation sont la soif et l'excrétion urinaire. Lorsque la perte d'eau est plus grande que son apport, la pression osmotique du fluide extracellulaire augmente tandis que la pression artérielle diminue, entraînant l'activation d'osmosenseurs hypothalamiques et de barorécepteurs, responsable du relargage de l'hormone antidiurétique arginine-vasopressine (AVP, aussi appelée ADH (*antidiuretic hormone*)) par l'hypophyse postérieure dans la circulation sanguine (Baylis, 1987; Robertson, 1987) (voir section 2.1). L'effet concerté de l'augmentation de l'osmolarité du fluide extracellulaire et du relargage de l'AVP amène à la sensation de soif tandis que l'AVP favorise la réabsorption de l'eau émanant du filtrat rénal par les tubules collecteurs du rein. Inversement, une surcharge en eau entraîne une diminution de la sécrétion d'AVP, favorisant une diminution de la réabsorption de l'eau au niveau du rein et donc, de mictions plus abondantes (Ganong, 2005). La première et la plus importante fonction des reins est donc de maintenir, à l'intérieur de limites physiologiques, à la fois le volume et la composition ionique des liquides extracellulaires et intracellulaires. Ces derniers traitent quotidiennement environ 180 litres de liquide en provenance du sang desquels seulement 1,5 litre sera excrété, le reste étant réabsorbé et retourné à la circulation sanguine.

Le néphron est l'unité fonctionnelle du rein; chaque rein étant composé d'environ un million de ces unités. Chaque néphron est composé d'une capsule glomérulaire (capsule de Bowman), du glomérule rénal (aussi nommé corpuscule de Malpighi) et d'un système tubulaire

(Figure 1). Ce dernier est divisé en sous sections, soit le tubule contourné proximal, l'anse du néphron (nommée anse de Henlé) et le tubule contourné distal qui se jette dans le tubule collecteur (partagé par plusieurs néphrons). L'anse du néphron est elle même divisée en un bras descendant et un bras ascendant. Il existe deux catégories de néphrons; le néphron cortical a une anse courte qui ne pénètre que la partie corticale de la médulla rénale tandis que le néphron juxta-médullaire y pénètre profondément. La formation de l'urine comporte trois étapes, soit la filtration glomérulaire, la réabsorption tubulaire et la sécrétion tubulaire.

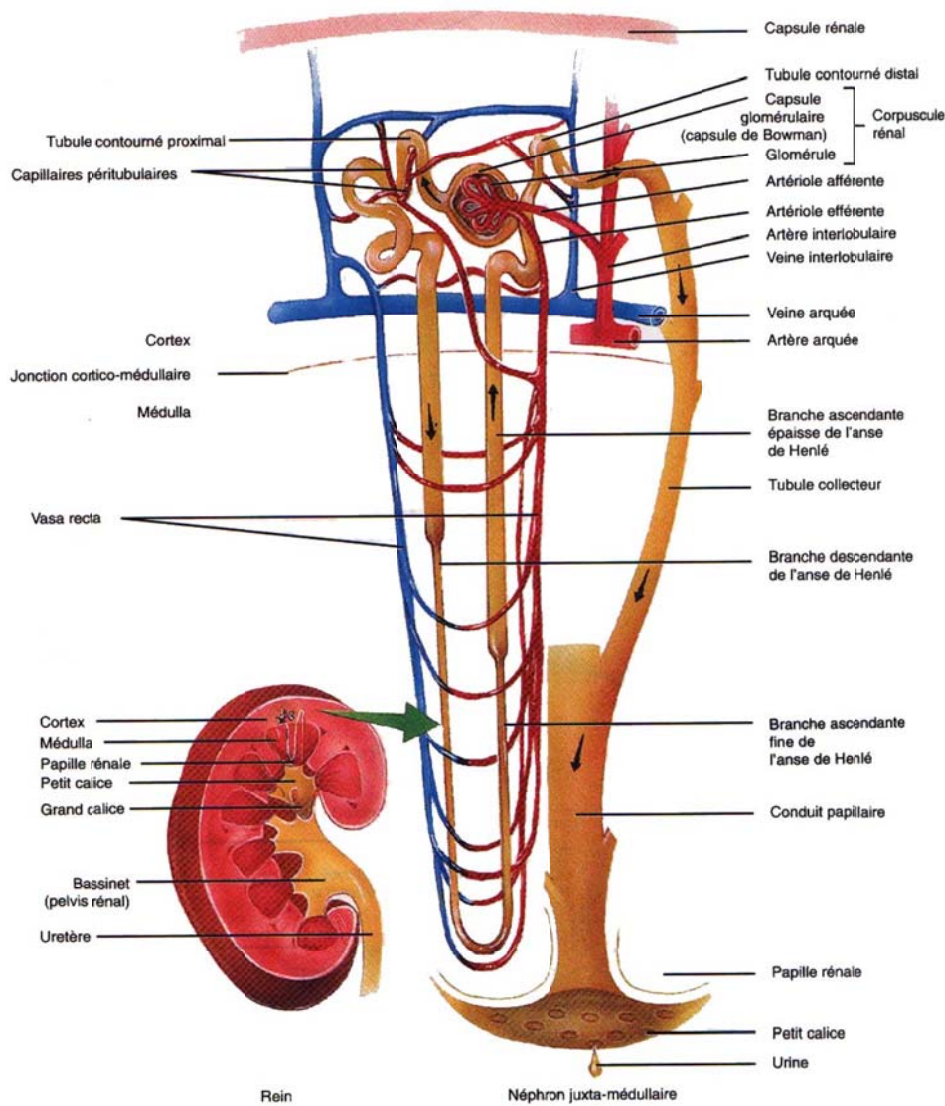


Figure 1 : Anatomie du rein et du néphron, unité fonctionnelle du rein.

Schématisation du corpuscule rénale et de la tubulure transportant le filtrat glomérulaire à la vessie et du système circulatoire qui y est associé. Tiré du site <http://bio.m2osw.com/>.

1.1 Filtration glomérulaire :

La filtration glomérulaire est un processus passif et non sélectif où les liquides et les solutés sont poussés à travers les capillaires fenestrés glomérulaires par la pression hydrostatique. Le glomérule laisse passer les substances sanguines dont le poids moléculaire est inférieur à environ 65-70 kilo Daltons (kDa) et la composition du filtrat glomérulaire est donc, pour la plupart des constituants, identique à celle du plasma. Le volume filtré par minute est d'environ 140 ml, soit le dixième du débit sanguin rénal. La filtration glomérulaire est influencée par la pression artérielle et cette dernière est contrôlée en partie par le rein via le système rénine-angiotensine-aldostérone (Figure 2). Lorsque la volémie diminue (baisse de pression), le rein sécrète la rénine, au niveau de l'appareil juxta-glomérulaire (Hackenthal *et al.*, 1990), qui favorise la conversion de l'angiotensinogène (sécrétée par le foie) en angiotensine I (Menard *et al.*, 1983). À son passage dans les poumons, une métalloprotéinase située à la membrane des cellules endothéliales des capillaires pulmonaire (l'ACE ou *angiotensin converting enzyme*) convertis l'angiotensine I en angiotensine II (Ng et Vane, 1967). Cette dernière induit la vasoconstriction des artérioles, favorisant ainsi une augmentation de la pression sanguine systémique. De plus, l'angiotensine II favorise la sécrétion d'AVP et d'aldostérone, deux hormones qui contribuent à la récupération de l'eau par le rein (voir sections 1.2 et 3.5) (Hollenberg et Williams, 1979). Inversement, une hypervolémie diminue la sécrétion de rénine ce qui a, globalement, un effet hypotenseur.

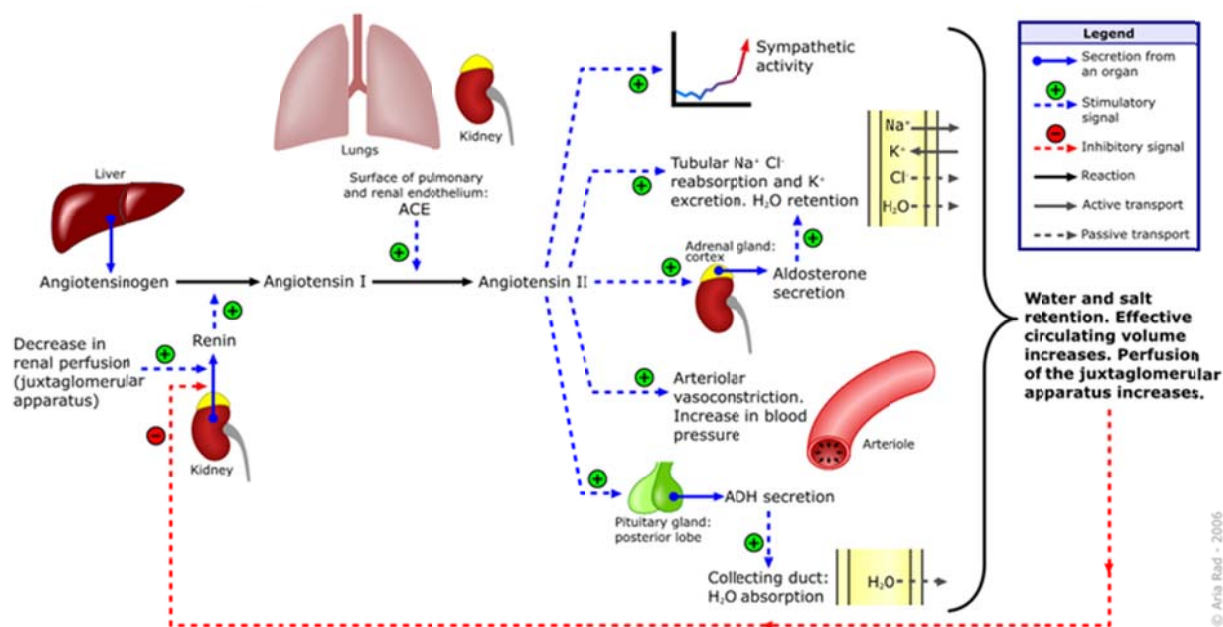


Figure 2 : Régulation de la pression sanguine par le système rénine-angiotensine-aldostérone. Une diminution de la pression sanguine induit la sécrétion de rénine par les reins, ce qui favorise la conversion de l'angiotensinogène (sécrétée par le foie) en angiotensine I. A son passage dans les poumons, une métalloprotéinase convertit l'angiotensine I en angiotensine II. Cette dernière induit la vasoconstriction des artérioles, favorisant ainsi une augmentation de la pression sanguine systémique. De plus, l'angiotensine II favorise la sécrétion d'AVP et d'aldostérone, deux hormones qui contribuent à la rétention de l'eau. Source : <http://www.healthline.com/>. Auteur: A. Rad. 2008

1.2 Réabsorption et sécrétion tubulaire

Le filtrat provenant du glomérule s'accumule dans la capsule glomérulaire puis s'écoule dans le tubule proximal et l'anse de Henlé qui pénètre dans la région médullaire du rein (Figure 1). Chaque anse de Henlé est divisée en une branche descendante et ascendante, elles mêmes subdivisées en portions fines ou épaisses selon l'épaisseur de la paroi tubulaire. Après son passage dans l'anse de Henlé, le filtrat rénal pénètre le tubule distal, puis les canaux collecteurs qui se déversent dans le calice rénal via les papilles, pour rejoindre le bassinnet, connecté à

l'uretère et finalement, la vessie (Figure 1). Lors du passage du filtrat glomérulaire à travers les différents segments de la tubulure, plus de 99% de l'eau filtrée et la majeure partie des solutés sont réabsorbés puis retournés à la circulation sanguine. L'eau restante ainsi que les substances qui y sont dissoutes forment l'urine.

Les mécanismes de concentration de l'urine sont basés sur la pression osmotique élevée retrouvée au niveau de la médulla rénale. L'eau peut ainsi y passer par simple diffusion, dans les régions tubulaires garnies de canaux aqueux nommés aquaporines (AQP). Le processus d'obtention de cette pression osmotique réside dans le transport actif et passif de solutés (principalement les ions sodium, potassium, chlore et l'urée) au niveau des segments distaux du système tubulaire. Au niveau moléculaire, la perméabilité de l'eau et le transport actif des solutés à travers les différents segments du néphron seront déterminés par l'expression de plusieurs transporteurs et pompes, comme le co-transporteur sodium-potassium-chlore, la pompe sodium-potassium et les aquaporines (Figure 3 et 4). La réabsorption de l'urée au niveau du tubule collecteur est un facteur important dans l'établissement de l'osmolarité de la médulla rénale. Cette réabsorption est facilitée par l'AVP qui augmente la perméabilité du tubule collecteur (voir section 1.3.1), entraînant la diffusion passive de l'urée vers le milieu interstitiel, mais aussi par l'activation de transporteurs spécifiques dépendants de l'AVP (Sands *et al.*, 1987).

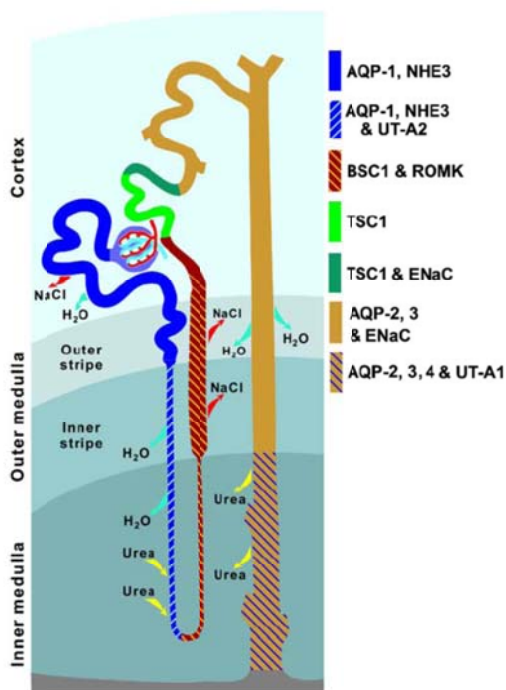


Figure 3 : Distribution segmentaire des différents transporteurs et canaux au niveau du néphron et tubule collecteur chez le rat.

AQP-1 à AQP-4 ; Aquaporines d'isoformes 1 à 4. NHE3 ; échangeur sodium-hydrogène, isoforme 3. UT-A1 et UT-A2 ; transporteur d'urée, de type A1 et A2. BSC1 ; co-transporteur Na-K-2Cl sensible à la bumétamide. ROMK ; canal potassique de la médulla externe rénale. TSC-1 co-transporteur Na-Cl sensible au thiazide. ENaC ; canal sodique épithélial. Tiré de (Kishore *et al.*, 2009).

Bien que le transport actif et la diffusion d'ions permettent une grande concentration d'osmolytes dans l'interstitium médullaire, un système circulatoire spécialisé, responsable de l'apport en nutriments et oxygène au tissu, est requis afin que l'excès de solutés ne soit réabsorbé dans la circulation sanguine. Le système vasculaire de la médulla rénale, nommé vasa recta (Figure 1), comporte donc deux caractéristiques qui aident au maintien de cette osmolarité. En premier lieu, le débit sanguin dans la vasa recta est faible, soit environ 1 à 2% du débit total rénal; ainsi, la réabsorption des solutés est minimale. De plus, lorsque que le sang emprunte la branche descendante de la vasa recta vers les profondeurs de la médulla, le NaCl ainsi que l'urée qui s'y

retrouvent en forte concentration diffusent vers la circulation sanguine et l'eau s'en échappe, causant une augmentation de l'osmolarité sanguine à l'intérieur de ces vaisseaux. À sa remontée vers le cortex rénal, où l'osmolarité du milieu interstitiel diminue progressivement, l'excès de NaCl et d'urée diffuse de nouveau vers le liquide interstitiel tout en étant accompagné d'un retour d'eau vers le système circulatoire. Ainsi, lorsque le sang quitte la médulla rénale, son osmolarité n'est que légèrement supérieure à celle lors de son entrée dans le rein. Le principe d'une double tubulure parallèle dont le débit est inversé, retrouvé au niveau de la vasa recta mais aussi de l'anse de Henlé, est appelé mécanisme d'échange à contre-courant.

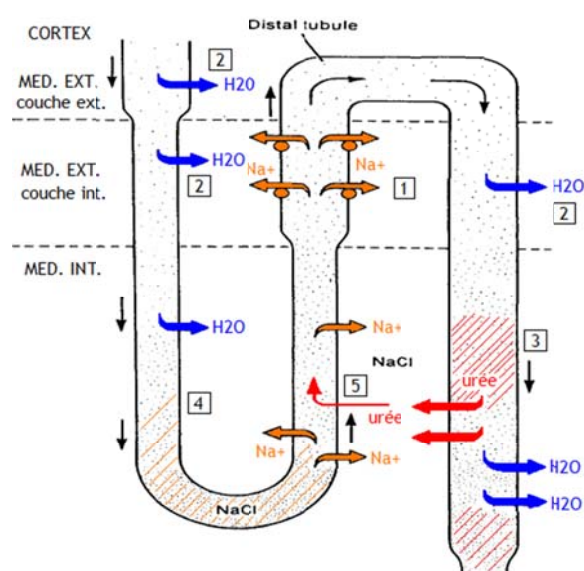


Figure 4: Schématisation de la concentration de l'urine.

1 : Sortie active de Na^+ par des ATPases Na^+/K^+ augmentant l'osmolarité du tissu interstitiel à cet endroit. **2** : L'osmolarité élevée entraîne un appel d'eau des tubes perméables à l'eau (branches fines, tube collecteur et tube proximal). **3** : Augmentation des concentrations des substances qui ne sortent pas du tubule (notamment l'urée). L'urée sort selon son gradient au niveau des cellules principales. L'accumulation de l'urée dans le tissu interstitiel augmente l'osmolarité de ce dernier. **4** : L'osmolarité induit un appel d'eau venant des branches fines descendantes. Le Na^+ se concentre dans les branches fines descendantes. **5** : Après l'épingle à cheveux, les cellules perméables aux solutés laissent sortir le Na^+ selon son gradient donc augmentation de l'osmolarité et appel d'eau. Le Na^+ ne peut plus sortir passivement et les pompes Na^+ actives permettent d'entretenir ce système. Source : <http://www.healthline.com>.

Comme mentionné précédemment, la concentration osmotique du filtrat glomérulaire est la même que celle du plasma, soit environ 300 mOsm/L. Tandis que le filtrat s'écoule le long de la portion proximale d'un tubule rénal, les ions sodium sont transportés activement hors du tubule vers le liquide interstitiel, suivis passivement des ions chlore. De plus, un certain nombre d'autres substances, tel que le glucose et les acides aminés, sont réabsorbées selon divers mécanismes de transport. Le tubule contourné proximal est perméable à l'eau grâce à la présence d'AQP1; l'eau quitte par osmose puisque la perte du sodium, chlore et des autres substances abaissent l'osmolarité du liquide tubulaire au profit du milieu interstitiel. Le transport des solutés et de l'eau depuis le tubule proximal vers le liquide interstitiel réduit d'environ 65 à 70% le volume initial du filtrat glomérulaire sans changer significativement son osmolarité. Les substances et le liquide qui passent au travers de la portion proximale du tubule rénal retournent à la circulation sanguine via les capillaires périrubulaires de la vasa recta.

Le fluide restant s'écoule dans la branche descendante de l'anse de Henlé, qui s'engage dans des zones de concentrations en osmolytes croissantes du liquide interstitiel, vers la médulla rénale. La branche descendante est hautement perméable à l'eau grâce à la présence abondante d'AQP1, permettant ainsi une diminution du volume du filtrat tout en augmentant son osmolarité. Il a été estimé que la densité d'AQP1 pouvait dépasser 20 millions de molécules par cellules dans ce segment du néphron, du moins, chez le rat (Maeda *et al.*, 1995). Au plus profond de la médulla rénale, au niveau du coude de l'anse de Henlé des néphrons juxta-médullaires, l'osmolarité du filtrat rénal peut atteindre 1200-1400 mOsm/L. Lors de son passage dans la branche ascendante de l'anse de Henlé, les ions sodium et chlore du filtrat passent vers le milieu interstitiel, réduisant ainsi son osmolarité puisque ce segment est imperméable à l'eau. Pendant que le liquide complète son passage à travers la branche ascendante et pénètre dans le tubule contourné distal, la réabsorption des ions sodium et chlore génère une osmolarité inférieure à celle du plasma. Dans la partie initiale du tubule distal, la réabsorption de sodium se fait par co-transport sodium-chlore et est régulée par l'aldostérone, tandis que dans sa deuxième moitié, elle se fait par des canaux à sodium, en échange de potassium. Le tube distal est imperméable à l'eau (Figure 4).

Le fluide sortant du tubule contourné distal se jette dans le tubule collecteur et cette dernière étape sera déterminante quant au volume et à la composition finale de l'urine. Les

tubules collecteurs sont relativement droits, ce qui les distingue des tubes contournés proximal et distal, et conduisent l'urine jusqu'aux calices, puis au bassinnet. Même si la réabsorption d'eau qui a lieu dans cette partie n'équivaut qu'à environ 15% du filtrat glomérulaire original, elle est primordiale dans la maintenance de l'homéostasie hydrique. La perméabilité à l'eau des tubules collecteurs est un phénomène sous haute régulation grâce à la présence conditionnelle des AQP2 à la surface des cellules principales bordant cette section en réponse à la stimulation du récepteur V2. Ce phénomène est central aux résultats de cette thèse et est traité plus en détails au prochain chapitre.

La sécrétion tubulaire implique le passage de substances des capillaires péri-tubulaires (vasa recta) vers les tubules rénaux après la filtration glomérulaire. Les ions K^+ , H^+ , la créatinine, l'ammoniac et certains acides organiques subissent cette sécrétion. Comme la réabsorption, la sécrétion tubulaire peut être active ou passive. La sécrétion tubulaire permet d'éliminer des substances qui n'ont pas été filtrées par le glomérule, d'éliminer des substances nuisibles qui ont été réabsorbées passivement (comme l'urée), de débarrasser l'organisme d'un excès de potassium mais aussi de réguler le pH sanguin, grâce à la sécrétion d'ammoniac et d'ions H^+ .

1.3 Aquaporines

Pendant longtemps, la diffusion passive a été considérée comme le seul mécanisme impliqué dans le passage de l'eau à travers les membranes biologiques. Cependant, cette diffusion est un processus lent et ne correspondait pas toujours aux phénomènes observés. La présence de pores cellulaires perméables à l'eau a tout d'abord été suspectée lors d'études montrant des mouvements rapides d'eau dans des globules rouges en fonction de l'osmolarité environnante (Paganelli et Solomon, 1957). Par la suite, les travaux du groupe de Peter Agre ont permis d'isoler une protéine membranaire de 28 kDa, l'aquaporine 1, qu'ils ont initialement nommée CHIP28 (*channel-forming integral membrane protein*) (Agre *et al.*, 1987). L'injection d'ARNc codant pour cette protéine dans des oocytes a eu pour effet d'augmenter significativement la sensibilité des cellules aux conditions hypo- et hypertoniques, reliant CHIP28 au passage de l'eau à travers la membrane plasmique (Preston *et al.*, 1992).

Les aquaporines (AQPs) sont une famille de petites protéines membranaires largement retrouvées parmi le règne animal et végétal, et dont 13 membres ont été identifiés chez les mammifères (Verkman, 2008). Elles sont exprimées dans plusieurs tissus épithéliaux et endothéliaux et sont impliquées dans le transport de fluides dans les tubules rénaux, mais aussi au niveau des plexus choroïdes et certains épithéliums glandulaires. Elles sont aussi exprimées dans des tissus n'ayant pas de recours significatifs au transport fluidal, comme les tissus adipeux et la peau. Dans la plupart des cellules où elles sont présentes, les aquaporines sont exprimées à la membrane plasmique de façon constitutive, à l'exception de l'aquaporine de type 2 dont l'insertion à la membrane est sujette à régulation par l'hormone antidiurétique AVP (Verkman, 2008) (voir section 1.3.1).

Des études biochimiques ont permis de déterminer que le canal aqueux fonctionnel était un homo-tétramère dont les extrémités N- et C-terminales sont cytoplasmiques (Smith et Agre, 1991). Chaque monomère de ce dernier est composé de deux domaines répétés comportant chacun trois domaines en hélices alpha et un motif signature Asn-Pro-Ala (ou NPA); la disposition des hélices 1 à 3 est symétriquement inversée par rapport aux hélices 4 à 6 (Fujiyoshi *et al.*, 2002; Gonen et Walz, 2006) (Figure 5A). Des simulations de dynamique moléculaire suggèrent que l'eau passe par le canal étroit (<0,3 nm) formé par l'assemblage des deux motifs NPA et que des facteurs stériques et électrostatiques préviennent le passage de protons et autres petites molécules (Hub et de Groot, 2008) (Figure 5B). L'agencement proposé des domaines suggère une structure ressemblant à un sablier (*hourglass hypothesis*; Jung *et al.*, 1994)). Les canaux formés des AQP 0, 1, 2, 4, 5 et 8 seraient sélectifs pour les molécules d'eau tandis que les AQP 3, 7, 9 et 10 (aussi nommées aquaglycéroporines) permettraient le passage du glycérol et possiblement d'autres petites molécules solubles. L'AQP6 a dernièrement été identifié comme étant un canal ionique (Hazama *et al.*, 2002) tandis que les AQP11 et 12, dont l'homologie de séquence avec les autres membres de la famille des aquaporines est inférieure à 20%, sont toujours peu caractérisées (Ishibashi, 2009).

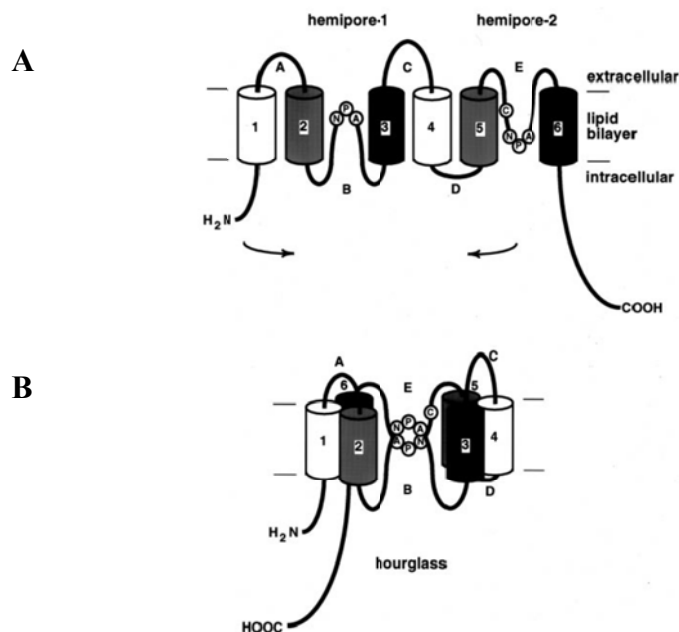


Figure 5: Modèle de la topologie de l'aquaporine 1

Chaque sous-unité d'aquaporine comporte 6 domaines transmembranaires comprenant deux structures symétriques inverses (TM1–3, hémipore-1 et TM4–6, hémipore-2) (A). La juxtaposition des motifs NPA des boucles B et E forme un canal simple à travers la membrane plasmique (B). Tiré de (Agre, 2000).

1.3.1 Les aquaporines et la concentration urinaire

Comme décrit précédemment, les canaux collecteurs du rein ont un rôle crucial à jouer dans la régulation fine de l'homéostasie de l'eau corporelle. Dans la partie proximale du tubule rénal, les AQP1 se retrouvent au niveau des membranes apicale et basolatérale des cellules tapissant ce segment, permettant ainsi le libre passage de l'eau en fonction des différences osmotiques, sans possibilité de régulation active. Les cellules polarisées bordant le canal collecteur participent aussi à la réabsorption du filtrat rénal, via des aquaporines situées de part et d'autre de la cellule. Les AQP3 et 4 présentes chez ces cellules sont exprimées de façon constitutive à la membrane plasmique basolatérale tandis que la localisation de l'AQP2 est sujette

à régulation par l'hormone antidiurétique AVP; en absence d'AVP, les AQP2 sont localisées dans des vésicules intracellulaires et la présence d'AVP permet leur fusion à la membrane plasmique apicale, induisant ainsi la perméabilité aqueuse de ce segment tubulaire (Marples *et al.*, 1995). Les concentrations circulantes d'AVP se reflètent sur la quantité d'AQP2 à la membrane apicale et régulent donc le taux de réabsorption.

L'ensemble des mécanismes impliqués dans la fusion des vésicules contenant les AQP2 induits par l'AVP n'est pas entièrement connu. La relocalisation des AQP2 est initiée par l'activation du récepteur de la vasopressine de type 2 (V2), un membre de la famille des récepteurs couplés aux protéines G (RCPG; voir chapitre 3), localisé à la membrane basolatérale. L'activation du récepteur V2 par l'AVP induit la production d'adénosine monophosphate cyclique (AMPc), qui à son tour, active la protéine kinase A (PKA). Une fois activée, cette dernière phosphoryle les AQP2 à la sérine 256, un événement essentiel à la translocation des AQP2 à la membrane apicale. En effet, la phosphorylation de la sérine 256 par PKA semble à elle seule suffisante pour la translocation des AQP2 puisqu'une substitution phosphomimétique de cette sérine (AQP2-S256D) induit la présence de l'AQP2 mutante à la membrane apicale en absence de stimulation du récepteur V2 (Fushimi *et al.*, 1997; Katsura *et al.*, 1997; van Balkom *et al.*, 2002). L'unité fonctionnelle de l'AQP2 étant un homo-tétramère, il est nécessaire qu'au moins 3 des 4 sous-unités soient phosphorylées pour induire la translocation (Kamsteeg *et al.*, 2000). Il a été démontré que les vésicules contenant les AQP2 possédaient une activité PKA (Lande *et al.*, 1996), suggérant une association directe de la kinase avec ces vésicules. Cette association serait promue par les protéines d'échafaudage AKAPs (*protein kinase A-anchoring proteins*) qui séquestrent la kinase à des sites précis, régulant ainsi la disponibilité de ses substrats (Colledge et Scott, 1999). L'interaction entre AKAP et PKA s'est avérée essentielle à la translocation des AQP2 à la membrane, démontré par l'utilisation d'un peptide perméable aux membranes inhibiteur de la liaison entre AKAP et la sous-unité catalytique de PKA (Klussmann *et al.*, 1999; Klussmann et Rosenthal, 2001). L'activation de PKA par le récepteur V2 induirait aussi la phosphorylation du facteur de transcription CREB (*cAMP response element-binding protein*) qui serait responsable de l'effet antidiurétique à long terme de la stimulation à l'AVP, en

augmentant le niveau de transcription du gène codant pour l'AQP2, qui se traduit par une augmentation de la quantité de ces protéines (DiGiovanni *et al.*, 1994; Ecelbarger *et al.*, 1997).

La phosphorylation de l'AQP2 par des kinases autres que PKA est aussi envisagée puisque des sites consensus pour les kinases PKG (*protein kinase G*), PKC (*protein kinase C*) et la protéine kinase CK2 (*casein kinase 2*) sont retrouvés dans sa séquence primaire, mais il reste à déterminer si ces sites sont réellement utilisés et ont un rôle à jouer dans les phénomènes régulant la translocation des AQP2 à la membrane apicale des cellules principales du tubule collecteur. La sérine 256 serait aussi un substrat pour la kinase CK2 golgienne et le transit entre le réticulum endoplasmique (RE) et l'appareil de Golgi de l'AQP2 lors de sa maturation pourrait dépendre de cette phosphorylation (Procino *et al.*, 2003).

Une stimulation par l'AVP induit une augmentation du calcium dans le cytoplasme des cellules principales des canaux collecteurs du rein (Star *et al.*, 1988; Ecelbarger *et al.*, 1996; Chou *et al.*, 2000; Yip, 2002; Balasubramanian *et al.*, 2008) et il a été démontré que la translocation des AQP2 en réponse à l'AVP était bloquée, sinon grandement atténuée lorsque les cellules étaient préalablement chargées du chélateur de calcium BAPTA (acide 1,2-bis(o-aminophenoxy) ethane-N,N,N',N'-tetraacétique) (Chou *et al.*, 2000; Yip, 2002). Cette augmentation de calcium est le résultat de sa libération de compartiments intracellulaires et d'influx provenant du milieu extracellulaire. L'augmentation du calcium cytosolique active les calmodulines (Chou *et al.*, 2000) et plusieurs protéines régulées par cette dernière. Parmi celles-ci, la kinase des chaînes légères de la myosine (*myosin light chain kinase*; MYLK) est reconnue pour phosphoryler et activer l'isoforme B de la chaîne légère régulatrice de la myosine non-musculaire (*myosine regulatory light chain B*; MRLC-B). Les isoformes des MRLC régulent les myosines IIA et IIB, toutes deux exprimées chez les cellules isolées de canaux collecteurs de la médulla interne (IMCD : *inner medulla collecting duct*) (Chou *et al.*, 2004). Les isoformes de myosine II sont des moteurs dépendants de l'actine impliqués dans la réorganisation du cytosquelette et participeraient au processus de translocation des AQP2 (voir ci-bas).

De part la durée de demie vie de l'AVP en circulation (entre 10 et 35 min; (Czaczkas *et al.*, 1964)), des mécanismes rapides et locaux sont aussi impliqués dans la régulation fine de l'abondance des AQP2 à la membrane plasmique (Figure 6). En conditions physiologiques, une perturbation osmotique du milieu interstitiel induit la production d'endothéline-1 (ET-1) (Kohan

et Padilla, 1993). La stimulation subséquente du récepteur de l'endothéline B (ET_BR), présent lui aussi à la membrane basolatérale des cellules principales des tubules collecteurs, provoque une diminution de l'activation de PKA (le récepteur étant couplé à la protéine G α i, inhibitrice de l'adénylate cyclase; voir section 3.2) et active la cyclo-oxygénase 1 (COX-1), enzyme impliquée dans la synthèse de prostaglandine E₂ (PGE₂) (Kohan *et al.*, 1993). À son tour, le PGE₂ active le récepteur aux prostaglandines EP₃ qui inhiberait la voie PKA par son couplage à la protéine G α i mais aussi par PKC (Hebert *et al.*, 1990). En effet, l'activation de la PKC aurait un effet inhibiteur sur l'adénylate cyclase 6 (Lai *et al.*, 1997; Wu *et al.*, 2001), qui est reconnue pour être activée suite à la stimulation du récepteur V2 (voir section 3.5).

Plusieurs évidences suggèrent que les cellules du tubule collecteur libèreraient des nucléotides comme l'ATP (adénosine triphosphate) en réponse à certains stimuli physiologiques et que ce phénomène influencerait négativement la translocation des AQP2. Des membres de la famille des récepteurs purinergiques (P2YR) pourraient donc être impliqués dans la régulation de la translocation des AQP2. Les sous-types P2Y₁ P2Y₂ P2Y₄ et P2Y₆ ont été détectés au niveau des tubules collecteurs (Bailey *et al.*, 2000; Kishore *et al.*, 2000; Bailey *et al.*, 2001; Turner *et al.*, 2003; Uawithya *et al.*, 2008). Ces récepteurs sont connus pour être couplés à la protéine effectrice G α q (Abbracchio *et al.*, 2006) et donc d'induire l'activation de la PLC et l'augmentation intracellulaire de Ca⁺⁺ une fois stimulés. Puisque l'activation de la PLC mène à l'activation de PKC, on peut suggérer que le mécanisme d'inhibition de la translocation des AQP2 induit par ces récepteurs est le même que celui décrit pour le récepteur EP₃. Bien que non détaillé, l'augmentation intracellulaire de Ca⁺⁺ suite à l'activation des récepteurs purinergiques pourrait participer au remodelage du cytosquelette afin de permettre l'endocytose des AQP2 à la surface cellulaire.

Une fois dans le milieu extracellulaire la demie vie de l'ATP est courte, soit inférieure à 5 minutes, et est rapidement dégradée en adénosine par l'ecto-5'-nucleotidase au niveau du rein (Le Hir et Kaissling, 1993). La présence du récepteur de l'adénosine de type 1 (A₁R) au niveau du tubule collecteur (Yamaguchi *et al.*, 1995; Vitzthum *et al.*, 2004; Uawithya *et al.*, 2008) suggère un rôle pour l'adénosine dans les mécanismes de réabsorption de l'eau dans ce segment du néphron. En fait, il a été démontré que la stimulation du récepteur A₁R inhibait la translocation des AQP2 induite par l'AVP (Arend *et al.*, 1987; Yagil, 1990). Couplé à la protéine G α i,

l'activation du récepteur diminuerait l'activité de l'adénylate cyclase et activerait PKC par la PLC via les protéines G $\beta\gamma$ (Palmer et Stiles, 1997), comme les récepteurs purinergiques et EP₃.

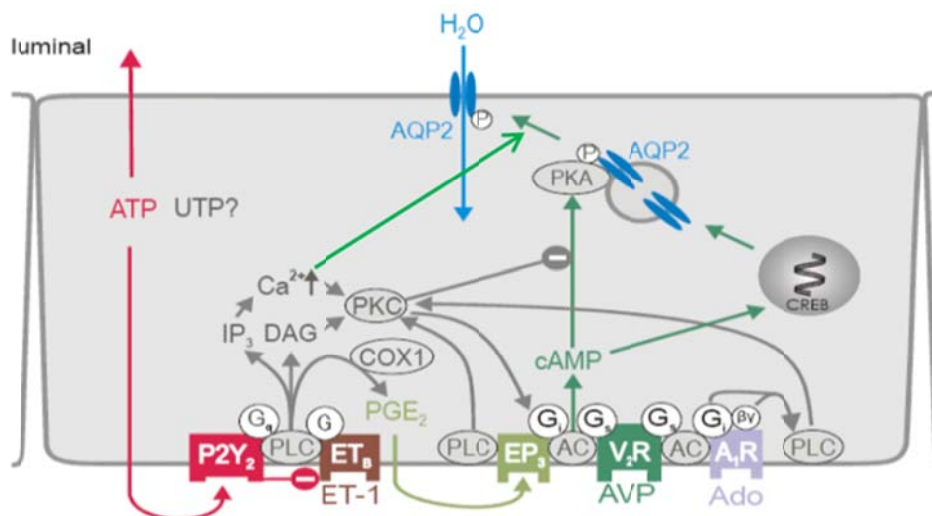


Figure 6: Modèle des voies signalétiques impliquées dans régulation locale de la translocation des AQP2 au niveau des cellules principales du tubule collecteur du rein

Se référer au texte de la section 1.3.1 pour les détails. A₁R, récepteur de l'adénosine A1; AC, adénylate cyclase; COX-1, cyclo-oxygénase-1; CREB, *cAMP responsive element-binding protein*; DAG, diacylglycérol; EP₃, récepteur de la prostaglandine de type E3; ET-1, endothéline-1; ET_B, récepteur de l'endothéline de type B; Gi, protéine G inhibitrice; Gq, protéine G stimulatrice de la phospholipase C; Gs, protéine G stimulatrice; $\beta\gamma$, sous-unités $\beta\gamma$ des protéines G; P, phosphorylation; PKA, protéine kinase A; PKC, protéine kinase C; PLC, phospholipase C; V₂R, récepteur de la vasopressine type 2. Tiré de (Rieg et Vallon, 2009).

La réorganisation du cytosquelette d'actine est aussi un facteur essentiel à la fusion des vésicules contenant les AQP2 à la membrane plasmique. Il a été démontré que l'AVP induisait une dépolymérisation du réseau d'actine apical des cellules du tubule collecteur chez le rat et que cet évènement menait à la translocation des AQP2 à la membrane (Simon *et al.*, 1993). L'inhibition de Rho A, par sa phosphorylation par PKA, est l'un des mécanismes suggérés pour

la dépolymérisation du cytosquelette d'actine (Tamma *et al.*, 2003). De plus, la stimulation de l'EP₃R, testé avec un analogue de la prostaglandine E₂, empêche l'inhibition de Rho A par la vasopressine, la dépolymérisation du cytosquelette d'actine et donc, la translocation des AQP2 à la membrane plasmique (Tamma *et al.*, 2003).

Le mécanisme de fusion des vésicules contenant les AQP2 à la membrane plasmique apicale impliquerait la protéine associée aux vésicules 8 (VAMP8; *vesicle-associated-membrane-protein 8*) (Wang *et al.*, 2009). Cette protéine est fortement exprimée au niveau du rein et co-localise avec les vésicules intracellulaires AQP2-positives. VAMP8 fait partie de la famille des v-SNAREs (*vesicular soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor-attachment protein receptor*) et permettrait la fusion des vésicules par son interaction avec les t-SNAREs (*target soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor-attachment protein receptor*), comme les syntaxine-3 et 4, situées à la membrane plasmique.

Bien que la phosphorylation des AQP2 soit un évènement essentiel à leur translocation à la membrane plasmique apicale, les phénomènes subséquents induisant leur internalisation ne requièrent pas sa déphosphorylation. En effet, la prostaglandine E₂ (PGE₂) est connue pour induire l'internalisation de l'AQP2 de la surface des cellules principales des tubules collecteurs du rein, via l'activation du récepteur EP₃ sans que le niveau de phosphorylation de l'AQP2 soit altéré (Zelenina *et al.*, 2000). Il a été aussi démontré que l'activation directe de la voie PKC par le PMA (phorbol 12-myristate 13-acetate) induisait l'endocytose de l'AQP2, un phénomène qui s'est aussi avéré indépendant du niveau de phosphorylation de la sérine 256 (van Balkom *et al.*, 2002).

Chapitre 2 : Le système vasopressinergique

Le système vasopressinergique fait référence à l'hormone peptidique arginine-vasopressine et aux récepteurs ciblés par l'hormone. Les pathologies à l'étude dans cette thèse sont conséquentes à des altérations au niveau de ce système. Les sections suivantes contiennent donc un descriptif de chacune de ses composantes et de leurs implications physiologiques.

2.1 L'arginine-vasopressine

L'AVP est une hormone peptidique hypothalamique qui a plusieurs fonctions physiologiques au-delà de l'homéostasie hydrique; elle contrôle la pression sanguine et a des effets sur la température corporelle, la libération d'insuline (Oshikawa *et al.*, 2004) et de corticotropine (Tanoue *et al.*, 2004), la mémoire (Weingartner *et al.*, 1981) et les comportements sociaux (Bielsky *et al.*, 2005). L'AVP fut initialement détectée en 1895 par Oliver & Schafer (Oliver et Schafer, 1895), qui ont démontré que l'administration d'extraits d'hypophyses à des rats avait un effet sur la pression sanguine. L'AVP est synthétisée au niveau du neurone magnocellulaire du noyau supraoptique et paraventriculaire de l'hypothalamus et est transportée le long de leurs axones à l'hypophyse postérieure où elle est emmagasinée avant d'être libérée dans la circulation (Vincent et Su, 2008). Elle peut aussi être libérée directement des dendrites des neurones magnocellulaires pour produire d'importants effets locaux. Sa persistance évolutive démontre bien l'importance de la vasopressine pour la survie puisque des peptides similaires à la vasopressine ont été identifiés aussi bien chez les vertébrés que chez les invertébrés, suggérant que le gène ancestral codant pour le précurseur de la protéine date d'avant la divergence entre ces deux embranchements, soit environ 700 millions d'années (Acher *et al.*, 1995).

L'AVP est un nonapeptide cyclisé par un lien disulfure entre deux cystéines (Figure 7). La vasopressine endogène humaine est appelée arginine-vasopressine afin de la distinguer des autres membres de la famille des vasopressines, comme la lysine-vasopressine retrouvée chez d'autres espèces de mammifères (Vincent et Su, 2008). Elle se différencie de l'hormone

oxytocine (OT) que par deux acides aminés (Figure 7). Bien qu'elles soient similaires, l'AVP et l'OT ont des effets physiologiques très différents: l'OT provoque, entre autre, la contraction des muscles lisses de l'utérus et accélère le travail lors de l'accouchement via l'activation de son récepteur, l'OTR (*oxytocin receptor*). Cette hormone permet aussi à l'utérus de se rétracter après l'expulsion du nouveau né, pour qu'il retrouve sa position initiale. Les gènes codant pour les deux hormones se retrouvent sur le même chromosome (20p) séparés par un segment de 12 kilo bases (Riddell *et al.*, 1985).

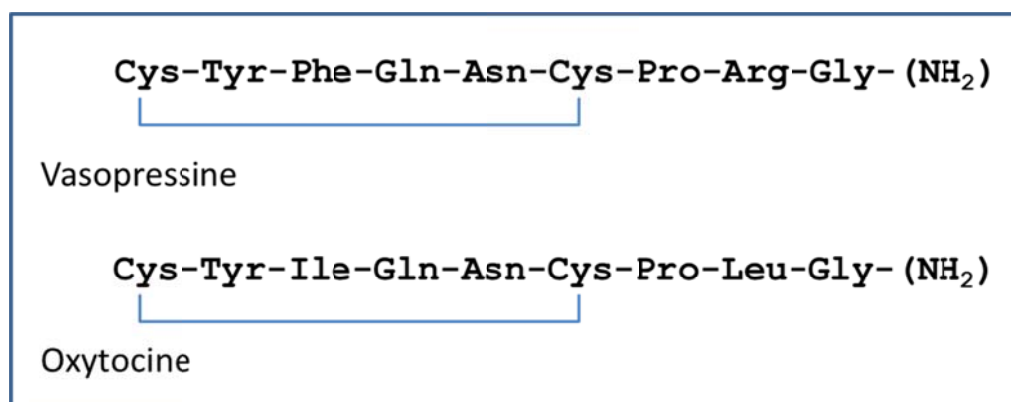


Figure 7: Comparaison des hormones vasopressine et oxytocine

La séquence en acides aminés des deux hormones est donnée. Le crochet entre deux cystéines indique un pont disulfure (cyclisation).

L'AVP est d'abord synthétisée sous forme de pro-hormone, la preprovasopressine, constituée d'un peptide signal de sécrétion en N-terminal, du peptide vasopressine, de la neurophysine (*carrier protein*) et d'un co-peptide en C-terminal. Durant son transport, l'AVP est clivée de la pro-hormone par une endopeptidase reconnaissant un motif di-basique (entre la vasopressine et la neurophysine) et une endopeptidase monobasique (entre la neurophysine et le co-peptide) (Acher *et al.*, 2002). La neurophysine est considérée importante pour le triage de la pro-hormone dans le système de sécrétion (de Bree et Burbach, 1998). Le processus de synthèse, transport et d'emmagasinage de l'AVP dans des granules de sécrétion dure entre une et deux heures (Sklar et Schrier, 1983). La synthèse et la libération d'AVP est principalement stimulée par des conditions hypertoniques, d'hypotension et d'hypovolémie, mais d'autres facteurs,

comme la douleur, la nausée, l'hypoxie, l'hypoglycémie et même la nicotine sont associés à une augmentation de la libération d'AVP (Husain *et al.*, 1975; Baylis, 1987). Bien qu'il existe des différences liées au sexe, à la génétique et à la race (Bankir, 2001), les concentrations plasmatiques d'AVP chez un individu en bonne santé et bien hydraté sont de l'ordre de 1 pg/mL et peuvent doubler durant le sommeil (George *et al.*, 1975; Nadal, 1996).

2.1.1 Cibles de l'AVP

Trois récepteurs sont responsables des effets physiologiques de l'AVP, soit le V1a (vasculaire), le V1b (pituitaire) et le V2 (rénal), tous de la famille des RCPGs. Ces trois récepteurs sont étroitement liés, partageant des similarités de séquence variant de 40 à 85%, particulièrement au niveau des tronçons transmembranaires et de la première boucle intracellulaire (Chini et Manning, 2007). Le développement d'antagonistes spécifiques a permis d'élucider l'action de l'AVP sur chacun de ces récepteurs. La signalisation complexe qui a lieu après la stimulation de ces récepteurs est maintenant mieux comprise.

Le récepteur V1a est localisé au niveau des cellules de muscle lisse des vaisseaux sanguins et son activation provoque la vasoconstriction et augmente le relargage de prostaglandines (Holmes *et al.*, 2004). De plus, des études d'hybridation *in-situ*, d'immunohistochimie et fonctionnelles semblent indiquer la présence de ce récepteur au niveau des tubules collecteurs du rein (Ando *et al.*, 1991; Naruse *et al.*, 1995; Tashima *et al.*, 2001; Carmosino *et al.*, 2007). Le récepteur V1b (parfois nommé V3) est localisé au niveau de l'hypophyse antérieure et au niveau des ilots pancréatiques et semble faciliter le relargage de corticotropine (ACTH) et intervient dans la sécrétion de l'insuline (Thibonnier *et al.*, 1997). Enfin, le récepteur V2 est retrouvé principalement au niveau des tubules contournés distaux et au niveau des canaux collecteurs de la médulla rénale et sa stimulation par l'AVP provoque un effet antidiurétique comme décrit précédemment. La section 3.5 donne une description détaillée de ce récepteur qui est l'élément central de cette thèse.

2.1.2 Régulation de la sécrétion d'AVP

Osmorégulation

La régulation osmotique de la production et de la libération de l'AVP est sous le contrôle d'osmorécepteurs localisés en périphérie, soit au niveau de la veine porte hépatique et au niveau central, à l'extérieur de la barrière hémato-encéphalique, dans la région antéroventrale du troisième ventricule (Baylis, 1987). Les osmorécepteurs centraux détectent les changements osmotiques au niveau systémique tandis que ceux situés en périphérie permettent de détecter les changements osmotiques causés par l'ingestion d'aliments et de liquides. Les impulsions afférentes provenant des osmorécepteurs se déplacent via le nerf vague au noyau du tractus solitarius, la zone prostréma et la médulla ventrolatérale avant d'atteindre le noyau paraventriculaire. Les neurones magnocellulaires de l'hypothalamus sont directement dépolarisés en conditions hypertoniques, résultant en une augmentation de la sécrétion d'AVP, et hyper polarisés en condition hypotoniques, occasionnant une diminution de la sécrétion d'AVP. Une relation linéaire existe entre l'augmentation de l'osmolarité plasmatique et la concentration d'AVP circulante. Le système d'osmorégulation maintient l'osmolarité plasmatique à l'intérieur de limites très étroites (284-295 mOsm/kg) et la régulation du niveau circulant d'AVP est très sensible aux changements osmotiques puisqu'une variation de 1% de l'osmolarité sanguine résulte en un changement de 1 pg/mL d'AVP en moyenne, assez pour affecter significativement le niveau de concentration de l'urine (Bankir, 2001).

Barorégulation :

En conditions physiologiques, la barorégulation entre en jeu lorsque le volume sanguin diminue de plus de 10%. Le volume sanguin et la pression sanguine agissent via différents mécanismes afin d'influencer la sécrétion d'AVP. Les barorécepteurs de l'atrium gauche et du ventricule détectent les variations du volume sanguin et leurs impulsions afférentes diminuent la sécrétion d'AVP tandis que les récepteurs situés dans l'arche aortique et le sinus carotidien sont influencés par des variations dans la pression sanguine artérielle (Vincent et Su, 2008). Une

augmentation exponentielle de la sécrétion d'AVP est observée en réponse à d'importantes pertes de pression sanguine.

Chapitre 3 : Les RCPGs et le récepteur de la vasopressine V2

Comme vu précédemment, les effets antidiurétiques de l'AVP sont en grande partie attribuables au récepteur V2, localisé principalement au niveau des tubules contournés distaux et collecteurs du rein. Son activation favorise la translocation des AQP2 à la membrane apicale des cellules principales des canaux collecteurs. Ce récepteur fait partie de la grande famille des RCPGs et puisque cette thèse se consacre aux défauts fonctionnels de formes mutantes du récepteur V2, le chapitre qui suit donne une description détaillée des différents aspects de la biologie de cette classe de récepteurs.

3.1 Récepteurs couplés aux protéines G

Les récepteurs couplés aux protéines G (RCPG) sont la plus grande famille de protéines membranaires et sont impliqués dans la majeure partie des réponses cellulaires aux hormones et neurotransmetteurs et sont aussi responsables de la vision, de l'olfaction et du goût. Ils sont collectivement classés en une grande super famille, basé sur leur topologie caractérisée par sept tronçons transmembranaires, séparés par des boucles extracellulaires et intracellulaires en alternances, et par leur capacité à activer les protéines G. L'existence de molécules réceptrices ou récepteurs avait été suspecté par les Drs Rodbel et Gilman, lauréats du prix Nobel de médecine en 1994 pour leur découverte des protéines G et leur implication dans la signalisation cellulaire. L'élucidation des mécanismes d'activation des RCPGs a été initiée en 1958 par les travaux de Sutherland & Rall (Sutherland et Rall, 1958) qui étaient à caractériser les propriétés de l'adénylate cyclase (AC), une enzyme activée par des hormones comme l'épinéphrine et le glucagon et produisant de l'AMPc à partir d'ATP. À l'époque, l'AC était considérée comme une

enzyme allostérique activée par la liaison directe d'hormones à un site de régulation. En 1969, Birnbaumer & Rodbell (Birnbaumer et Rodbell, 1969) proposaient que l'AC était distincte des récepteurs, se basant sur le fait que l'AC pouvait être activée par de multiples hormones. Ils ont aussi démontré deux années plus tard que le lien entre les récepteurs aux hormones et l'AC requérait un troisième partenaire, les protéines G (*GTP-binding proteins*) (Rodbell *et al.*, 1971). Bien que ces éléments importants de la cascade de signalisation des RCPGs aient été identifiés, l'existence même de récepteurs membranaires en tant qu'unité moléculaire restait spéculative (Lefkowitz, 2007). La purification des récepteurs β -adrénergiques (Caron *et al.*, 1979) et la reconstitution d'une voie de signalisation dans des vésicules phospholipidiques à partir de récepteurs purifiés (Cerione *et al.*, 1983) ont permis de confirmer l'existence d'une molécule réceptrice. Par la suite, le clonage du récepteur β 2-adrénergique (Dixon *et al.*, 1986) a permis de proposer une topologie à sept tronçons transmembranaires (7TM) grâce à sa haute homologie avec la rhodopsine bovine. Il est alors apparu évident que les 7TM représentaient une signature structurale pour les RCPGs et rapidement de nombreux autres membres de cette famille ont été clonés.

3.1.1 Organisation structurale des RCPGs

Comme décrit ci-haut, les RCPGs ont tous en commun une topologie similaire, constituée de 7 TM (TM-I à VII), d'un domaine amino-terminal (N-ter) extracellulaire et d'un domaine carboxyl-terminal (C-ter) intracellulaire, formant ainsi 3 boucles extracellulaires (e1-e3) et 3 boucles intracellulaires (i1-i3). La première structure cristallographique obtenue d'un RCPG fut celle de la rhodopsine, un récepteur pour la lumière responsable de la vision que l'on retrouve au niveau de la rétine (Palczewski *et al.*, 2000) (Figure 8). La rhodopsine est particulière puisque contrairement aux autres RCPGs, son ligand est lié de façon covalente au récepteur, ce qui participe à sa stabilisation dans un état inactif en absence de lumière, un paramètre qui a contribué, en plus de son abondance dans la rétine, à faciliter sa cristallisation. Suite à l'absorption d'un photon, l'isomérisation de son ligand, le 11-cis-rétinal, induit un changement de conformation du récepteur. L'élucidation de la structure de la rhodopsine a permis de

confirmer la présence des 7 hélices α traversant la membrane plasmique. La cristallographie a aussi révélé la présence d'une 8^{ème} hélice α dans le domaine C-terminal, parallèle au plan de la membrane plasmique et délimitée par une cystéine palmitoylée.

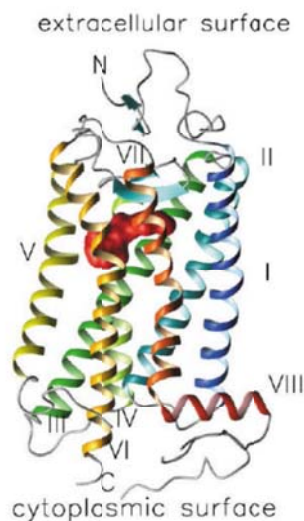


Figure 8: Modèle structural de la rhodopsine, récepteur archétype de la famille des RCPGs

Les hélices sont numérotées I à VIII. Le chromophore rétinale est dépeint en rouge. Tiré de (Filipek *et al.*, 2003)

Dans le cas des autres RCPGs pour lesquels le ligand est diffusible (non lié de façon covalente), la cristallographie représente un défi de taille dû à la flexibilité inhérente de ces protéines et la difficulté à en purifier de grandes quantités. Ce n'est que dernièrement que l'équipe du Dr Kobilka a réalisé une percée dans ce domaine en rapportant la cristallographie du récepteur β 2-adrénergique (β 2AR) (Cherezov *et al.*, 2007; Rasmussen *et al.*, 2007; Rosenbaum *et al.*, 2007), un récepteur pour l'adrénaline, archétype de la famille des RCPGs. Afin d'obtenir des cristaux du β 2AR, les auteurs ont dû recourir à différentes stratégies pour stabiliser la structure de ce récepteur. Notamment, la 3^e boucle intracellulaire étant l'une des régions les plus dynamique, un anticorps dirigé contre cette portion du récepteur a été ajouté pour la stabiliser (Rasmussen *et al.*, 2007), ou a été tout simplement remplacée par le lysozyme T4 (Cherezov *et al.*, 2007; Rosenbaum *et al.*, 2007). De plus, et toujours dans le but d'augmenter la stabilité du récepteur, la cristallisation a été réalisée en présence d'un ligand, soit le carazolol. Deux éléments structuraux

principaux se sont avérés différents entre la rhodopsine et le β 2AR. Premièrement, la poche de liaison où est attaché de façon covalente le 11-cis-rétinal chez la rhodopsine est couverte par la boucle e-2 et le N-terminus tandis que cette structure, qui limiterait l'accès des ligands diffusibles au récepteur, n'est pas présente chez le β 2AR, où le domaine e-2 forme une hélice retenue par deux ponts disulfures, donnant ainsi un accès direct à la poche de liaison. Deuxièmement, l'interaction ionique (appelée « verrou » ionique) reliant deux résidus à la fin des TM-III (R135) et VI (E247) chez la rhodopsine, est absente chez le β 2AR. Cette différence pourrait être reliée à la présence du ligand carazolol dans la structure du β 2AR, qui stabiliserait le récepteur dans une conformation particulière, inactive pour la protéine G mais active pour d'autres voies de signalisation indépendante de la protéine G (voir section 3.3) (Audet et Bouvier, 2008).

3.1.2 Classification des RCPG

La classification la plus couramment utilisée sépare les récepteurs en différentes classes A, B, C, D, E et F basée sur la présence de différents motifs de séquences (Horn *et al.*, 1998; Vassilatis *et al.*, 2003). Cette classification couvre à la fois les vertébrés et les invertébrés. Toutefois, la conservation de séquence entre les récepteurs homologues chez ces deux phyla est minime, ainsi certaines familles de ce système de classification ne se retrouvent pas chez les humains. Une analyse phylogénétique plus récente, réalisée uniquement sur les RCPGs humains, les divise maintenant en 5 familles principales, soit glutamate (G), rhodopsine (R), adhésion (A), frizzled (F) et sécrétine (S). Cette nomenclature forme ainsi le système de classification GRAFS (Fredriksson *et al.*, 2003; Schioth et Fredriksson, 2005).

La famille des récepteurs au glutamate (G)

Les membres de cette famille possèdent un très long domaine N-terminal (280-580 acides aminés), formant deux lobes séparés par une cavité, appelé « venus fly trap », qui se referment sur le ligand suite à sa liaison. Cette famille comprend entre autres les récepteurs métabotropiques du glutamate (mGluR), les récepteurs de l'acide γ -aminobutyrique (GABABR1 et GABABR2), le récepteur sensible au calcium (CaSR) et certains récepteurs du goût (T1R). Ce groupe correspond essentiellement à la famille C de la classification A-F.

La famille de la rhodopsine (R)

Il s'agit de la plus grande famille de RCPGs, comprenant plus de 700 récepteurs, si l'on tient compte des récepteurs olfactifs. Cette famille est constituée principalement des membres de la classe A dans la nomenclature A-F. On y retrouve entre autres la rhodopsine, les récepteurs adrénergiques, chimiokines, opioïdes et aussi les récepteurs de la vasopressine. Un trait commun conservé chez les membres de la famille R est la présence d'un motif NPxxY au niveau du TM-VII, le connectant à la queue C-terminale, et d'un motif (E/D)R(Y/H) au niveau de la jonction entre le TM-III et la boucle i-2. Le résidu arginine du motif est impliqué dans les interactions avec le TM-VI, formant un verrou ionique (*ionic lock*) observé dans la structure de la rhodopsine mais absent chez le β 2AR lié au carazolol. La majorité des récepteurs de cette famille possèdent un N-terminus relativement court et leurs ligands se lient au niveau d'une cavité formée entre les domaines transmembranaires, à l'exception des récepteurs aux hormones glycoprotéiques et de certains récepteurs peptidiques, pour lesquels le site de liaison implique le domaine N-terminal et les boucles extracellulaires.

La famille des récepteurs d'adhésion (A).

Les membres de cette nouvelle famille possèdent un très long domaine N-terminal (200 à 2800 acides aminés) contenant des motifs impliqués dans l'adhésion cellulaire du type de ceux retrouvés chez le récepteur du facteur de croissance épidermique (EGFR; *epidermal growth factor receptor*) par exemple, et de nombreux sites de glycosylation, en plus de posséder un domaine protéolytique de type RCPG dans certains cas. Cette famille comprend entre autre les

récepteurs lectomédines, ainsi que certains membres qui appartenaient auparavant à la classe B de la classification A-F, tel le récepteur latrophiline.

La famille des récepteurs frizzled (F)

Cette famille est constituée des récepteurs frizzled (Fz), smoothed (Smo) et de certains récepteurs du goût (T2R). Les récepteurs Fz et Smo, membres de la famille F de la classification A-F, sont impliqués dans le développement des métazoaires. Ces récepteurs contiennent un long domaine N-terminal d'environ 200 acides aminés comprenant plusieurs résidus cystéines conservées impliquées dans la liaison du ligand.

La famille des récepteurs à la sécrétine (S).

Cette famille est formée de récepteurs pour des peptides de grande taille, agissant principalement de façon paracrine. Dans la plupart des cas, le site de liaison du peptide se situe au niveau du long domaine N-terminal de ces récepteurs (60 à 80 acides aminés) qui contient des résidus cystéines conservées. En plus du récepteur de la sécrétine, cette famille comprend, entre autres, le récepteur du glucagon, du polypeptide intestinal vasoactif/polypeptide activateur de l'adénylate cyclase pituitaire (VPACR) et de l'hormone parathyroïde (PTHrP). Il s'agit essentiellement de la famille B de la classification A-F.

3.1.3 Homo- et hétéro-oligomérisation des RCPGs

Contrairement à la plupart des autres récepteurs membranaires, tels les récepteurs tyrosines kinases, les canaux ligands-dépendants, les récepteurs aux cytokines et les récepteurs guanylates cyclases, dont l'association en oligomères est reconnue depuis longtemps comme essentielle à leur fonction, les RCPGs ont longtemps été considérés comme étant des entités monomériques. L'existence d'oligomères de RCPGs a été un concept généralement accepté suite aux études portant sur le GABABR (récepteur B du GABA; *gamma-aminobutyric acid*), un

membre de la famille G. En effet, le GABABR est un hétéro-oligomère obligatoire composé des récepteurs GABABR1 et GABABR2 (Jones *et al.*, 1998; Kaupmann *et al.*, 1998; White *et al.*, 1998). Lorsqu'exprimé seul, le GABABR1 est retenu à l'intérieur du réticulum endoplasmique par la présence d'un signal de rétention dans sa séquence primaire, alors que le GABABR2, même s'il peut atteindre la membrane plasmique sans le GABABR1, est incapable de lier l'acide gamma-aminobutyrique. Suite à la formation d'hétéro-oligomère GABABR1/GABABR2, le signal de rétention présent au niveau de la queue C-terminale du GABABR1 est masqué, ce qui permet l'acheminement du complexe fonctionnel GABABR1/GABABR2 à la surface cellulaire. Bien que la délétion ou la mutation du signal de rétention du GABABR1 permettent son acheminement à la surface cellulaire, ce récepteur n'est toujours pas fonctionnel, impliquant que le GABABR2 n'est pas seulement requis pour promouvoir le transport à la surface cellulaire du GABABR1, mais qu'il jouerait aussi un rôle au niveau signalétique (Margeta-Mitrovic *et al.*, 2000). En effet, alors que seule la sous-unité GABABR1 lie le ligand, le modèle actuel suggère que la sous-unité GABABR2 serait responsable de l'activation de la protéine G (Duthey *et al.*, 2002) suggérant une coopérativité en trans des récepteurs. Même si la majorité des RCPGs ne forment pas d'hétéro-dimères obligatoires, l'hétéro-oligomérisation a été proposée pour plus de 40 récepteurs (Prinster *et al.*, 2005) et une base de donnée à ce sujet est maintenant accessible (Khelashvili *et al.*, 2010). Il existe aussi plusieurs évidences suggérant que certains RCPGs peuvent s'associer pour former des homo-oligomères. Dans tous les cas, qu'il s'agisse d'homo- ou d'hétéro-oligomères, ces assemblages entre RCPGs peuvent avoir diverses conséquences fonctionnelles (Figure 9).

En premier lieu, et pour plusieurs protéines, l'assemblage oligomérique a des répercussions au niveau de leur maturation et de leur export. Leur oligomérisation permettrait de masquer certains motifs de rétention et segments hydrophobes dont l'exposition est incompatible avec le système de contrôle de qualité de la voie de sécrétion (Reddy et Corley, 1998), tel l'exemple du GABABR1/2 décrit ci-haut. La liaison du ligand au RCPG, bien que controversé, pourrait aussi avoir un effet sur le statut oligomérique de certains, que ce soit en favorisant leur oligomérisation (Rodriguez-Frade *et al.*, 1999; Angers *et al.*, 2000; Rocheville *et al.*, 2000; Cornea *et al.*, 2001; Horvat *et al.*, 2001; Kroeger *et al.*, 2001; Wurch *et al.*, 2001; Patel *et al.*, 2002; Zhu *et al.*, 2002; Hunzicker-Dunn *et al.*, 2003; Roess et Smith, 2003) ou leur dissociation (Gines *et al.*, 2000; Cheng et Miller, 2001; Latif *et al.*, 2002). Dans certains cas, l'affinité du

ligand pour un récepteur donné est affectée par la co-expression d'un autre récepteur (Jordan et Devi, 1999; Maggio *et al.*, 1999; Franco *et al.*, 2000; Gomes *et al.*, 2000; Rocheville *et al.*, 2000; Galvez *et al.*, 2001), suggérant que l'oligomérisation des RCPGs confère à ceux-ci un niveau supplémentaire de diversité pharmacologique. La signalisation a aussi été démontrée comme étant affectée par l'oligomérisation de plusieurs récepteurs, comme le GABABR qui pour être fonctionnel, comme mentionné précédemment, requiert l'expression du GABABR1 et GABABR2. Dans certains cas, l'intensité du signal émanant d'un récepteur peut être potentialisé (Jordan et Devi, 1999; AbdAlla *et al.*, 2000; Gomes *et al.*, 2000; Rocheville *et al.*, 2000; Ciruela *et al.*, 2001; Mellado *et al.*, 2001) ou diminué (AbdAlla *et al.*, 2000; Gines *et al.*, 2000; Overton et Blumer, 2000; Pfeiffer *et al.*, 2001) par l'expression concomitante d'un autre récepteur. Enfin, il a été démontré que l'internalisation d'un récepteur induite par son ligand pouvait entraîner l'internalisation d'un autre récepteur n'ayant aucune affinité pour ce ligand (Rocheville *et al.*, 2000; Jordan *et al.*, 2001; Stanasila *et al.*, 2003; Xu *et al.*, 2003). Toutes ces évidences démontrent clairement que l'oligomérisation des RCPGs est un phénomène réel et important dans la biologie de cette famille de récepteurs.

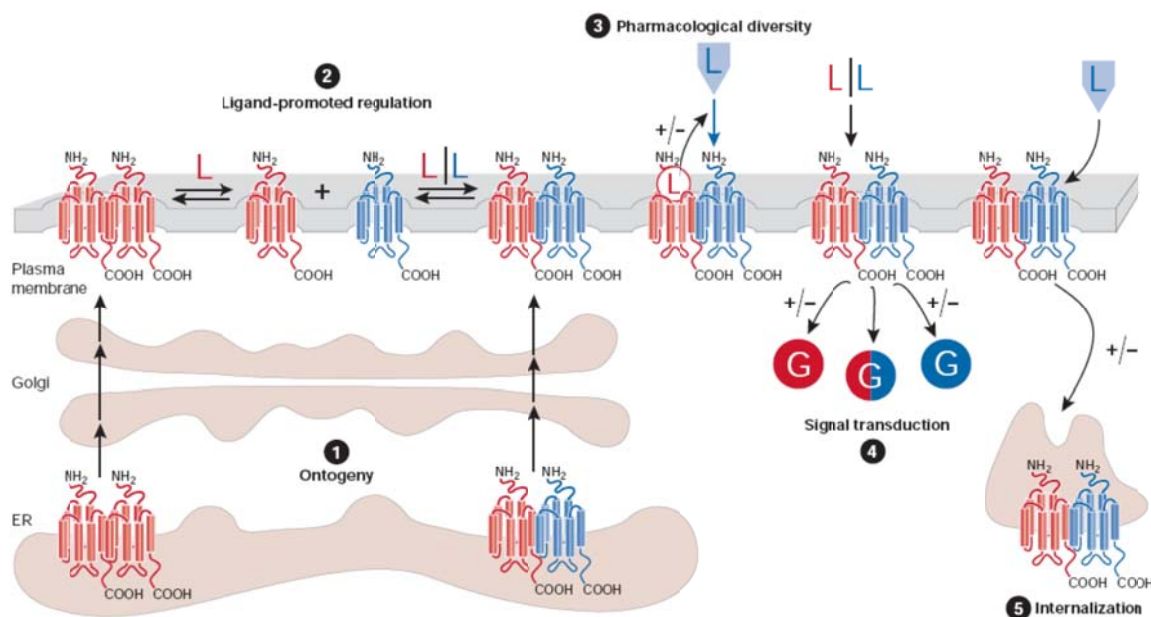


Figure 9: Rôles potentiels de l'oligomérisation des RCPGs

(1) Dans certains cas, l'oligomérisation a été rapportée pour jouer un rôle dans la maturation et le transport de RCPGs à la surface cellulaire. (2) L'oligomérisation pourrait être dynamiquement

modulée (positivement ou négativement) par la liaison du ligand au récepteur. (3) La formation d'oligomères de RCPGs affecterait, dans certains cas, la pharmacologie des récepteurs et (4) leur signalisation. (5) La désensibilisation et l'internalisation serait aussi des facteurs influencés par la formation d'oligomères de RCPGs. Tiré de (Terrillon et Bouvier, 2004).

3.1.4 Signalisation des RCPGs

Les signaux extracellulaires reçus par les RCPGs sont retransmis via de multiples voies de signalisation intracellulaires distinctes. Ces voies interagissent entre elles, formant un réseau apte à réguler des enzymes métaboliques, des canaux et transporteurs ioniques et autres composantes de la machinerie cellulaire, affectant ainsi plusieurs processus, incluant la transcription, la motilité, la contraction, la sécrétion, etc. Ces processus régulent à leur tour les fonctions systémiques, comme l'embryogénèse, le développement de plusieurs organes, les capacités d'apprentissage, la mémoire et l'homéostasie de l'organisme (Neves *et al.*, 2002).

Comme mentionné précédemment, la famille rhodopsine dont fait partie le récepteur V2 est de loin la plus nombreuse et la plus diversifiée et tous ses membres partagent certains motifs dans leur séquence qui sous-tendent des caractéristiques structurales et des mécanismes d'activation communs. Malgré ces similarités, chaque membre de la famille de la rhodopsine a une signature signalétique unique de par l'implication de différents sous-types de protéines G, de voies de signalisation indépendantes des protéines G et par des processus de régulation complexes. Par exemple, le récepteur β 2AR est reconnu pour lier l'adrénaline et la noradrénaline dans les tissus responsables de la neurotransmission sympathique, entraînant l'activation de la sous-unité α ($G\alpha_s$) de la protéine G hétéro-trimérique, de l'activation de l'adénylate cyclase et de l'accumulation d'AMPc, de l'activation de la protéine kinase dépendante de l'AMPc (PKA) et de la phosphorylation des protéines impliquées dans la contraction des cellules musculaires (Hoffman et Lefkowitz, 1982). Des données récentes ont montré que le profil signalétique du β 2AR était beaucoup plus élaboré. En effet, des études ont démontré que le récepteur possède une activité basale constitutive pouvant être inhibée par certains ligands, nommés agonistes inverses (Chidiac *et al.*, 1994; Samama *et al.*, 1994), qu'il pouvait être couplé à $G\alpha_s$ mais aussi à

la sous-unité inhibitrice G α i (Xiao *et al.*, 1999) et qu'il pouvait engendrer des voies de signalisation via les MAP kinases (*Mitogen-activated protein kinase*) dépendantes des arrestines et indépendantes des protéines G (Azzi *et al.*, 2003; Shenoy *et al.*, 2006).

Les mécanismes de transduction du signal à travers la membrane plasmique par les RCPGs ne sont pas complètement élucidés et restent un domaine d'étude extrêmement dynamique. Selon le dogme, la liaison d'un agoniste au niveau des TM et/ou du N-terminus d'un RCPG, selon la classe de récepteur dont il s'agit (voir section précédente), induit un changement de conformation au niveau des domaines cytoplasmiques du récepteur, entraînant l'activation d'effecteurs, comme par exemple les protéines G qui se détacheraient du récepteur. Ce dernier pourrait alors activer une autre protéine G, retourner à son état inactif ou être inactivé par des mécanismes de désensibilisation. Les RCPGs existeraient sous plusieurs conformations, étant en équilibre entre la forme complètement inactive (R) et la forme complètement active (R*) par des changements conformationnels spontanés (Figure 10); la liaison d'un ligand occasionne une variation dans cet équilibre. Les ligands qui agissent sur les RCPGs peuvent avoir différents effets, passant d'antagoniste neutre i.e. n'ayant aucun effet sur l'activité du récepteur autre que d'empêcher la liaison d'autres molécules, aux ligands favorisant une activation complète (agonistes complets) en passant par des ligands possédant une capacité d'activation sous-optimales (agonistes partiels). D'autres ligands inhibent l'activité signalétique de base d'un récepteur donné et sont nommés agonistes inverses et, eux aussi, peuvent être partiels ou complets. En pharmacologie, la capacité d'activation d'un ligand est considéré comme son efficacité intrinsèque (Lefkowitz *et al.*, 1993). Un concept récent dans le domaine de la pharmacologie des RCPGs suggère que différents ligands mènent à l'adoption de conformations distinctes chez un même récepteur, provoquant l'activation ou à la répression plus ou moins prononcées de différentes voies de signalisation. Ainsi, un ligand peut être agoniste complet pour la voie de signalisation A et agoniste inverse ou antagoniste pour la voie de signalisation B. Ce concept confère donc aux ligands une texture signalétique propre et est nommé agonisme biaisé (*ligand-biased agonism*) (Kenakin, 2001; Azzi *et al.*, 2003; Baker et Hill, 2007; Galandrin *et al.*, 2007), ajoutant un autre niveau de complexité dans l'étude des signaux émanant des RCPGs.

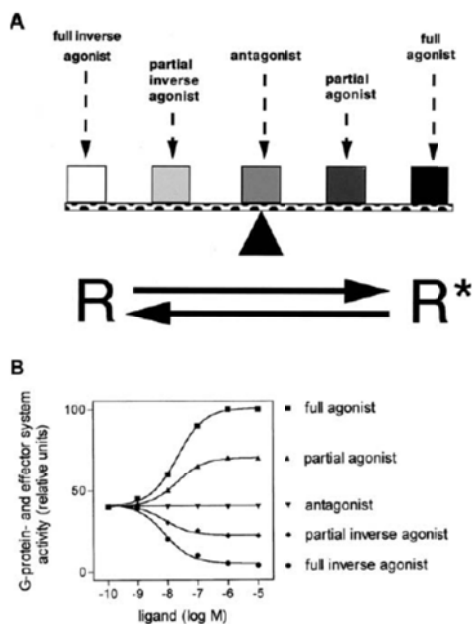


Figure 10: Modèle à deux états de l'activation des RCPGs en fonction de l'efficacité intrinsèque du ligand

Plusieurs états conformationnels peuvent être obtenus après la liaison d'un ligand au récepteur, menant à l'activation ou à la répression de la signalisation émanant de ce dernier. A & B: Les molécules activatrices (favorisant la forme R* du récepteur) sont nommées agonistes tandis que les molécules inhibitrices (favorisant la forme R du récepteur) sont nommées inverses agonistes. Certaines molécules n'affectent pas le niveau d'activation du récepteur (équilibre inchangée en R et R*) et sont nommées antagonistes. De plus, certains ligands peuvent induire des réponses partielles et sont nommés agonistes partiels ou inverse agonistes partiels, selon s'ils activent ou inhibent la voie de signalisation. Tiré de (Seifert et Wenzel-Seifert, 2002).

3.2 Les protéines G hétéro-trimériques et leurs effecteurs

Les protéines G hétéro-trimériques, comme leur nom l'indique, sont composées de trois sous-unités, soit $G\alpha$, $G\beta$ et $G\gamma$. Les sous-unités $G\alpha$ lient le guanosine triphosphate (GTP) et possèdent une activité GTPasique responsable de l'hydrolyse du GTP en GDP (guanosine

diphosphate). Les sous-unités $G\beta$ et $G\gamma$ sont liées entre elles de façon constitutive par le biais d'une structure de type enroulement d'hélices ou « *coiled-coil* » (Sondek *et al.*, 1996). Des modifications post-traductionnelles lipidiques au niveau des sous-unités $G\alpha$ et $G\gamma$ (palmytoylation et dans certains cas myristoylation pour les $G\alpha$, et isoprénylation pour les $G\gamma$) permettent l'ancrage à la membrane plasmique des protéines G du côté cytoplasmique. Les boucles intracellulaires du récepteur, principalement les boucles i2 et i3, interagissent à la fois avec le C-terminus de la sous-unité $G\alpha$ et celui de la sous-unité $G\gamma$. Dans son état inactif, la sous-unité $G\alpha$ est liée au GDP et le changement conformationnel induit par la liaison d'un agoniste au récepteur favorise l'échange du GDP par une molécule de GTP, le récepteur agissant ainsi comme un facteur d'échange de guanosine (GEF; *guanosine exchange factor*) sur la protéine $G\alpha$. Ce phénomène induit l'activation de la protéine G et les sous-unités $G\alpha$ et $G\beta\gamma$ peuvent alors interagir avec divers effecteurs menant à l'initiation de différentes cascades de signalisation selon leur nature (voir Figure 11). L'hydrolyse du GTP en GDP par l'activité GTPase intrinsèque de la sous-unité $G\alpha$ retourne cette dernière à son état inactif, abrogeant ainsi le signal initiateur des voies signalétiques. Plusieurs protéines peuvent réguler le cycle d'activation des protéines G, notamment les régulateurs de la signalisation des protéines G (RGS; *regulator of G protein signaling*) qui vont accélérer l'hydrolyse du GTP en GDP en modulant leur activité GTPasique. Une autre famille importante, les AGS (*activators of G protein signaling*), sont reconnues pour favoriser l'échange GDP/GTP des protéines $G\alpha$ et amplifier la réponse signalétique émanant de ces dernières (Cismowski *et al.*, 2000).

Selon le modèle classique, un récepteur lierait la protéine G uniquement lorsqu'il est activé, provoquant son activation et la dissociation des sous-unités $G\alpha$ et $G\beta\gamma$, libres alors d'interagir avec leurs effecteurs (Hein *et al.*, 2005). Un modèle alternatif propose que le récepteur inactif (libre de ligand) serait en constante interaction avec la protéine G et les effecteurs, formant un complexe pré-associé récepteur/protéines G/effecteur. Ainsi, l'activation de la protéine G et des effecteurs en aval reposeraient uniquement sur des changements conformationnels plutôt que des cycles d'association/dissociation de protéines (Gales *et al.*, 2006; Rebois *et al.*, 2006).

L'étude approfondie des protéines G est assez récente puisque ce n'est qu'en 1983 que la première ($G\alpha_s$) a été purifiée (Northup *et al.*, 1983). Chez l'humain, 16 gènes codant pour des sous-unités $G\alpha$, cinq pour $G\beta$ et 12 pour $G\gamma$ ont jusqu'alors été identifiés, permettant ainsi un très

grand nombre de possibilité d'hétéro-trimères. Cette diversité de combinaisons pourrait expliquer en partie la sélectivité des voies de signalisation induites par différents RCPGs, même si toutes les combinaisons ne sont pas nécessairement observées *in vivo* (Mervine *et al.*, 2006). Par convention, la nature de la sous-unité $G\alpha$ présente dans l'hétéro-trimère définit le type de protéine G à laquelle le récepteur est couplé. Les sous-unités $G\alpha$ sont subdivisées en 4 classes principales: $G\alpha_s$, $G\alpha_i$, $G\alpha_q$ et $G\alpha_{12}$ et chacune de ces classes, ainsi que les divers couples $G\beta\gamma$, régulent différents effecteurs (voir la liste dans la Figure 11). Les différentes protéines G peuvent être activées par plusieurs récepteurs et un récepteur peut activer plusieurs protéines G différentes, permettant d'activer simultanément, suite à la liaison du ligand, de nombreuses cascades de signalisation.

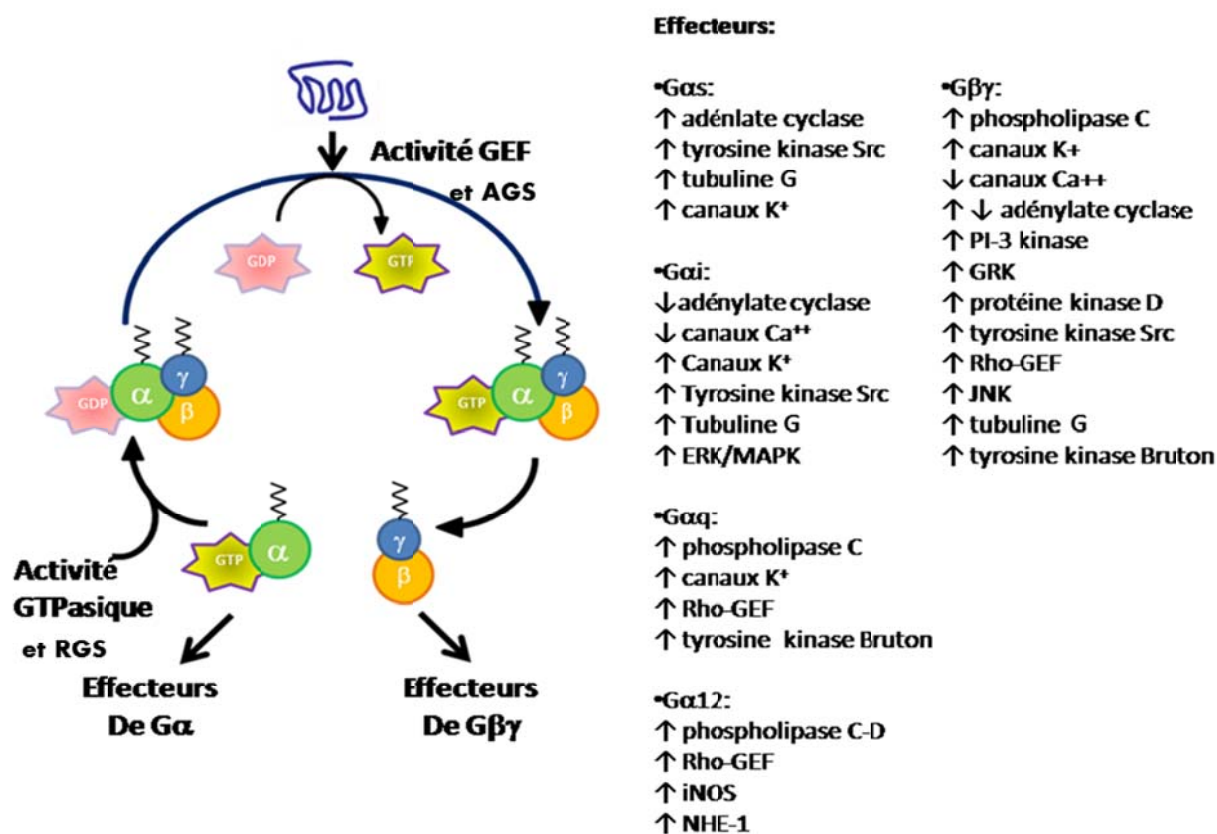


Figure 11: Les protéines G hétéro-trimériques

Schéma représentant le cycle d'activation/inactivation des protéines G hétéro-trimériques: Le récepteur activé ainsi que les AGS agissent comme GEF en permettant l'échange du GDP pour le GTP au niveau de la sous-unité α de la protéine G. Une liste énumérant les différentes classes de

protéines $G\alpha$ ainsi que les effecteurs modulés par les différentes sous-unités α et $\beta\gamma$ est présentée à droite du schéma d'activation des protéines G: \uparrow représente une activation alors que \downarrow indique une inhibition de l'effecteur. Inspiré de (Milligan et Kostenis, 2006).

3.3 Signalisation indépendante des protéines G

En plus de la signalisation dépendante des protéines G décrite ci-dessus, certains signaux émanant de l'activation d'un RCPG ne sont pas dépendant de l'activation de ces dernières. Parmi les diverses protéines impliquées, la protéine β -arrestine constitue sans aucun doute la plus étudiée. Cette protéine, découverte initialement pour son rôle dans la désensibilisation des récepteurs (voir section 3.4), est capable d'interagir avec la plupart des RCPGs et peut induire directement l'activation de la voie des protéines kinases activées par des mitogènes (MAPK) (Luttrell *et al.*, 1999). Le recrutement de la β -arrestine par les RCPGs permet aussi la régulation d'autres voies de signalisation, notamment NF κ B (Gao *et al.*, 2004) et Akt (Beaulieu *et al.*, 2005), indépendamment de l'activation des protéines G.

Certains RCPGs peuvent aussi moduler l'activité de canaux ioniques sans passer par les protéines G, comme c'est le cas pour les récepteurs de la dopamine D1 et D5 qui interagissent directement avec les canaux ioniques GABAA et NMDA respectivement (Liu *et al.*, 2000; Lee *et al.*, 2002). D'autres peuvent activer des voies de signalisation en interagissant avec des protéines d'échafaudage, qui lient le récepteur directement aux effecteurs. Par exemple, le récepteur β 2AR régule l'activité de l'échangeur Na^+/H^+ via son interaction avec la protéine à domaines PDZ (domaine semblable à la protéine de densité synaptique-95/Discs-large/ZO-1) appelée facteur de régulation de l'échange Na^+/H^+ (NHERF) (Hall *et al.*, 1998), alors qu'en interagissant avec les protéines de la famille Homer, les récepteurs mGluR peuvent contrôler la concentration intracellulaire de calcium via la régulation des récepteurs de l'inositol triphosphate (Tu *et al.*, 1998). Les RCPGs interagissent donc avec une vaste panoplie de protéines, qui sont collectivement nommées GIP (*G protein-coupled receptors-interacting proteins*) (Bockaert *et al.*, 2004). En plus d'inclure les protéines impliquées dans la signalisation indépendante des protéines G décrites ci-dessus, le terme « GIP » englobe aussi diverses protéines accessoires impliquées

dans plusieurs autres aspects de la régulation de l'activité des RCPGs, tels que la localisation cellulaire, la pharmacologie, la régulation fine de la signalisation et la désensibilisation des récepteurs. De par la multitude des événements indépendants de l'activation des protéines G qui ont lieu suite à la stimulation des RCPGs, certains auteurs les ont rebaptisés en un terme plus général, soit «récepteurs à 7TM» (R7TM) (Pierce *et al.*, 2002).

3.4 Désensibilisation

Un thème récurrent dans la physiologie des RCPGs est l'observation de l'atténuation de la réponse de ceux-ci dans le temps malgré la présence continue du stimulus initial (Hausdorff *et al.*, 1990) et cet événement est nommé désensibilisation. La désensibilisation peut être homologue, lorsque la perte de réponse est observée uniquement pour le récepteur ciblé par l'agoniste, ou hétérologue, lorsque la perte de réponse à un ligand spécifique d'un ou plusieurs récepteurs est perdue par la stimulation précédente d'un autre récepteur par un ligand n'ayant pas d'affinité pour le ou les premiers. Plusieurs mutants du récepteur V2 étudiés dans cette thèse se sont avérés affectés dans leur processus de désensibilisation.

Un événement majeur dans la désensibilisation des RCPGs implique leur phosphorylation suite à une stimulation. Jusqu'au milieu des années 1980, les kinases dépendantes de second messagers, comme la PKA et la PKC, étaient considérées comme les principales responsables de la phosphorylation des RCPGs après leur activation (Benovic *et al.*, 1985). Par la suite, il fut démontré que le récepteur β 2AR pouvait être phosphorylé après stimulation même lorsqu'exprimé dans des cellules dépourvues de PKA fonctionnelle (Strasser *et al.*, 1986), suggérant que d'autres kinases pouvaient agir sur les RCPGs activés. L'équipe du Dr Lefkowitz a par la suite identifié une nouvelle kinase apte à phosphoryler le β 2AR suite à sa stimulation, nommé β -ARK (*β -adrenoreceptor kinase*) (Benovic *et al.*, 1986), faisant aujourd'hui partie d'une famille de kinases nommée GRKs (*G protein-coupled receptor kinases*). Cette famille de kinases s'est avérée impliquée dans la phosphorylation et la désensibilisation de plusieurs RCPGs (Premont et Gainetdinov, 2007). La phosphorylation des RCPGs seule est insuffisante pour induire leur désensibilisation complète (Pitcher *et al.*, 1992), ce qui a mené à la découverte d'une

autre famille de protéines régulatrices, les β -arrestines (Lohse *et al.*, 1990) ayant une haute affinité pour les récepteurs phosphorylés par les GRKs, inhibant stériquement l'interaction récepteur/protéine G, provoquant l'arrêt du signal. Ces découvertes ont permis l'élaboration d'un modèle de désensibilisation homologue applicable à la majorité des RCPGs (Krupnick et Benovic, 1998; Pitcher *et al.*, 1998). Dans ce modèle, un RCPG lié à un agoniste est spécifiquement phosphorylé par un ou plusieurs membres des GRKs sur certaines sérines et/ou thréonines localisées sur la 3^{ème} boucle intracellulaire et/ou au niveau du c-terminus. La phosphorylation du récepteur augmente son affinité pour les β -arrestines qui participent à la terminaison du signal en découplant les protéines G du récepteur. Les β -arrestines participeraient à l'internalisation subséquente du récepteur en faisant le pont entre celui-ci et le manteau structural des puits de clathrines, via son interaction avec la protéine adaptatrice AP-2 (*clathrin adaptor protein 2*), provoquant ainsi l'endocytose des récepteurs (Figure 12). Les étapes subséquentes de triage auront un rôle primordial sur la destinée et sur la réponse signalétique du récepteur après les événements précoces de désensibilisation. Certains récepteurs seront recyclés à la membrane plasmique tandis que d'autres seront plutôt détruits; la dégradation lysosomiale représente un mécanisme majeur par lequel plusieurs RCPGs sont réduits au silence après activation par un agoniste (Hicke, 1999; Chen et Davis, 2002; Katzmann *et al.*, 2002; Pierce *et al.*, 2002; von Zastrow, 2003; Hanyaloglu et von Zastrow, 2008). En effet, basé sur la nature de l'interaction récepteur/ β -arrestines, les RCPGs sont divisés en deux classes. Les membres de la classe A interagissent de façon transitoire avec les β -arrestines et peuvent être recyclés rapidement des endosomes vers la membrane plasmique tandis que les récepteurs faisant partie de la classe B ont une interaction stable avec les β -arrestines, les séquestrant dans les endosomes: Ceux-ci sont donc peu ou pas recyclés à la membrane plasmique et sont sujets à la dégradation lysosomiale.

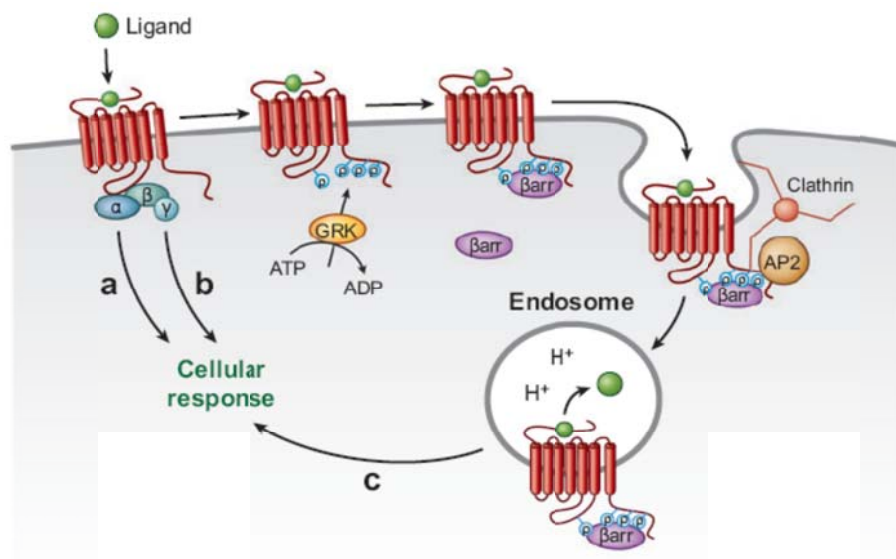


Figure 12: Mécanismes généraux impliqués dans la désensibilisation homologue des RCPGs

Un RCPG lié à un agoniste est spécifiquement phosphorylé par un ou plusieurs membre des GRKs sur certaines sérines et thréonines localisées à la 3^{ème} boucle intracellulaire et/ou au niveau du carboxy-terminus. La phosphorylation du récepteur augmente son affinité pour les β -arrestines qui participent à la terminaison du signal en découplant les protéines G. Les β -arrestines participent à l'internalisation subséquente du récepteur en faisant le pont entre celui-ci et le manteau structural des puits de clathrines, provoquant ainsi l'endocytose des récepteurs. Les étapes subséquentes de triage (recyclage vs dégradation lysosomiale) auront un rôle primordial sur la destinée et sur la réponse signalétique du récepteur après les événements précoces de désensibilisation. Tiré de (Hanyaloglu et von Zastrow, 2008).

3.5 Le récepteur de la vasopressine V2

Initialement cloné en 1992 par l'équipe du Dr Rosenthal (Birnbaumer *et al.*, 1992), le gène humain codant pour le récepteur V2 (*AVPR2*) est localisé sur le chromosome X en position q28 (Xq28) (Kambouris *et al.*, 1988) et est constitué de 2 introns et 3 exons. L'analyse de la séquence primaire en acides aminés du V2R par profil hydropatique a permis de déterminer que

le récepteur était un membre de la famille des RCPGs (Birnbaumer *et al.*, 1992). Les niveaux d'expression du récepteur V2 semblent régulés au niveau transcriptionnel par divers facteurs. En effet, des études *in-vitro* ont démontré que des conditions hypertoniques (Izumi *et al.*, 2008) et un pH acide (Memetimin *et al.*, 2009) avaient un effet positif sur l'activité du promoteur du gène *AVPR2* et ces deux phénomènes seraient MAP kinase et PKA dépendants. De plus, cette régulation positive serait inhibée par la signalisation émanant du récepteur V1a, localisé à la membrane apicale des cellules exprimant le V2R (Izumi *et al.*, 2007), conditionnellement à la présence d'AVP dans la lumière du tubule collecteur.

Le récepteur V2 est composé de 371 acides aminés et a une masse moléculaire calculée de 40 228 Daltons (Figure 13); il est aujourd'hui considéré comme un membre de la famille R (rhodopsine) dans la classification GRAFS. La protéine est palmitoylée sur deux cystéines en position 341 et 342 (Sadeghi *et al.*, 1997; Charest et Bouvier, 2003) et est sujette à la N- (asparagine en position 22) et O-glycosylation (Sadeghi et Birnbaumer, 1999). Un pont disulfure entre deux cystéines relie les boucles e1 et e2. Il est principalement exprimé au niveau du rein, aux membranes basales des cellules principales des tubules collecteurs. Certaines évidences pharmacologiques suggèrent la présence du récepteur au niveau de l'endothélium vasculaire (Hirsch *et al.*, 1989; Naitoh *et al.*, 1993; Martinez *et al.*, 1994; Okamura *et al.*, 1997), mais sa présence n'a jamais été démontrée directement. De plus, des études ont rapporté la présence d'ARNm codant pour le récepteur au niveau de l'hippocampe (Hirasawa *et al.*, 1994) et des plexus choroïdes (Kato *et al.*, 1995) chez le rat mais sa fonction dans la physiologie du système nerveux central reste spéculative. Comme décrit précédemment, un point culminant de l'activation du récepteur au niveau du rein est la translocation des AQP2, de vésicules intracellulaires à la membrane plasmique apicale; sa fonction principale est donc d'inhiber la diurèse en réponse à l'AVP. Le récepteur V2 joue aussi un rôle direct au niveau de la natrémie, en activant les canaux sodiques épithéliaux (*epithelial sodium channel*; ENaC), permettant la réabsorption du sodium. Ce rôle est complémentaire à celui de l'aldostérone.

Le récepteur V2 est le seul membre de la famille vasopressine/oxytocine dont la signalisation se fait via la sous unité α_s des protéines G; elle implique donc l'activation de l'adénylate cyclase, la production d'AMPc et l'activation de PKA. Dans des cellules isolées

d'IMCD, les adénylate cyclases 3 (Hoffert *et al.*, 2005) et 6 (Chabardes *et al.*, 1996) sont activées suite à la stimulation du récepteur V2.

L'activation du récepteur par l'AVP induit aussi une augmentation transitoire de Ca^{++} intracellulaire (Star *et al.*, 1988; Champigneulle *et al.*, 1993; Maeda *et al.*, 1993; Ecelbarger *et al.*, 1996), un phénomène encore peu détaillé mais qui s'est avéré indépendant de la voie des phosphoinositides mais dépendant de l'activation du récepteur sensible à la ryanodine de type 1 (ryanodine-sensitive receptor 1; RyR1) localisé au niveau du réticulum endoplasmique (Chou *et al.*, 2000). Le rôle de l'augmentation du calcium cytosolique dans le processus de translocation des AQP2 a été abordé à la section 1.3.

Le récepteur V2 modulerait la voie MAPK puisque la phosphorylation des protéines ERK1 et ERK2 (*extracellular signal-regulated kinases 1 & 2*) a été observée suite à sa stimulation par l'AVP. Il est proposé que l'activation des ERK1/2 par le V2R serait indépendante des protéines G et plutôt reliée aux β -arrestines. En effet, l'augmentation de la phosphorylation des ERK1/2 induite par l'AVP est abrogée par l'expression hétérologue d'un dominant négatif de β -arrestine ou lorsque les niveaux d'expression de cette dernière sont réduits à l'aide d'ARN interférents (Charest *et al.*, 2007). De plus, cette voie signalétique impliquerait une ou plusieurs métalloprotéinases ainsi qu'un membre de la famille des récepteurs tyrosine kinase (RTK), probablement l'IGFR (Insuline-like growth factor 1 receptor; G. Oligny-Longpré, communication personnelle). En résumé, la stimulation du récepteur V2 provoquerait l'activation d'une métalloprotéinase à la surface cellulaire dont le produit de clivage agirait comme ligand pour le RTK impliqué. L'activation du RTK favoriserait le recrutement de la β -arrestine à ce dernier et c'est cet événement qui mènerait à l'activation de la voie MAPK; l'activation de cette voie par le récepteur V2 serait donc un événement de trans-activation (Charest *et al.*, 2007).

La pertinence physiologique de l'activation de la voie MAPK par le récepteur V2 n'est pas connue mais pourrait être impliquée dans certaines pathologies impliquant une croissance et/ou une différenciation cellulaire inappropriée, comme la polykystose rénale, caractérisée par l'apparition lente et progressive de kystes. De plus, plusieurs résultats d'études sont contradictoires; certains y détectent une augmentation de l'activation (Thibonnier *et al.*, 1998; Charest et Bouvier, 2003; Tohgo *et al.*, 2003), certains ne voient pas d'effet (Michlig *et al.*, 2004), et d'autres y voient une inhibition (Yamada *et al.*, 1995; Pisitkun *et al.*, 2008). L'équipe

du Dr Bouvier a démontré que la voie dépendante des protéines G initiée par le récepteur V2 avait un effet inhibiteur sur l'activation des ERK1/2 (Charest *et al.*, 2007). Ainsi, les divergences observées entre les différentes études pourraient être expliquées par l'utilisation de types cellulaires différents, dont la balance signalétique entre la voie activatrice (β -arrestine) et inhibitrice (protéines G) pourrait ne pas être similaire. Une étude récente *in-vivo* chez le rat a démontré que des niveaux sériques élevés et soutenus d'AVP menaient à une augmentation de la prolifération, au niveau du rein, des cellules reconnues pour exprimer le récepteur V2. Cette prolifération a été associée avec la phosphorylation des ERK1/2 (Alonso *et al.*, 2009).

Il a aussi été démontré que la stimulation du récepteur V2 induisait la phosphorylation de la tyrosine 308 et la sérine 473 de la kinase Akt (aussi connu sous le nom de protéine kinase B; PKB) (Pisitkun *et al.*, 2008), deux résidus reconnus pour être impliqués dans l'activation de la kinase. Selon les auteurs de l'étude, l'activation d'Akt serait dépendante du Ca^{++} et de la PI3K. Les événements en aval de l'activation d'Akt ne sont toujours pas connus et, comme pour la voie des MAPK, le rôle d'Akt dans la physiologie rénale reste spéculatif.

Par des études de BRET (*bioluminescence resonance energy transfer*) et de co-immunoprécipitation, le récepteur V2 a été rapporté pour oligomériser avec les récepteurs V1a et l'OTR et avec lui-même (Terrillon *et al.*, 2003). Ces assemblages seraient précoces dans la biosynthèse des récepteurs puisque des interactions entre des formes immatures des différents récepteurs ont été détectées. La pertinence de l'hétéro-oligomérisation du récepteur V2 avec l'OTR est par contre discutable puisque les deux récepteurs ne sont pas reconnus pour être exprimés dans les mêmes tissus. La relevance physiologique de l'homo- et de l'hétéro-oligomérisation du récepteur V2 n'est cependant toujours pas connue.

Comme c'est le cas pour la majorité des RCPGs, il a été démontré que le récepteur V2 subissait une désensibilisation suite à son activation (Birnbaumer *et al.*, 1992). Une fois internalisé, et contrairement au récepteur V1a (classe A), le récepteur V2 n'est pas recyclé, ou très peu, à la membrane plasmique (classe B) et ce phénomène serait causée par la présence d'un groupe de sérines phosphorylées (en position 362, 363 et 364) retrouvées au niveau de sa queue C-terminale (Innamorati *et al.*, 1998). En effet, l'échange de la queue C-terminales du V2R pour celle du V1a a induit le recyclage à la membrane plasmique du récepteur chimère, appuyant le

fait que les déterminants qui retiennent le récepteur V2 à l'intérieur de la cellule après internalisation se retrouvent sur la portion C-terminale de ce dernier.

L'internalisation du récepteur V2 après stimulation implique son interaction avec les β -arrestines (Oakley *et al.*, 1999; Bowen-Pidgeon *et al.*, 2001) et l'interaction entre les deux protéines est grandement favorisée par la phosphorylation de la queue C-terminale du récepteur V2. Toutefois, il a été démontré qu'une forme tronquée de ce dernier, dont la queue C-terminale est absente, interagissait toujours avec les β -arrestines, suggérant la présence d'autres sites d'interaction (Bowen-Pidgeon *et al.*, 2001). Récemment, un nouveau site de phosphorylation au niveau de la 3^{ème} boucle intracellulaire du V2R (S255) a été identifié (Wu *et al.*, 2008). Cette sérine est phosphorylée par PKA *in-vitro* et pourrait hypothétiquement être un site de contact entre les β -arrestines et le récepteur V2. Les β -arrestines font le pont entre la machinerie d'endocytose et le récepteur en liant directement (Goodman *et al.*, 1996) et via la protéine adaptatrice AP-2 (*adaptor protein-2*) (Laporte *et al.*, 1999) les protéines structurales d'enveloppe de vésicules d'internalisation, nommées clathrines.

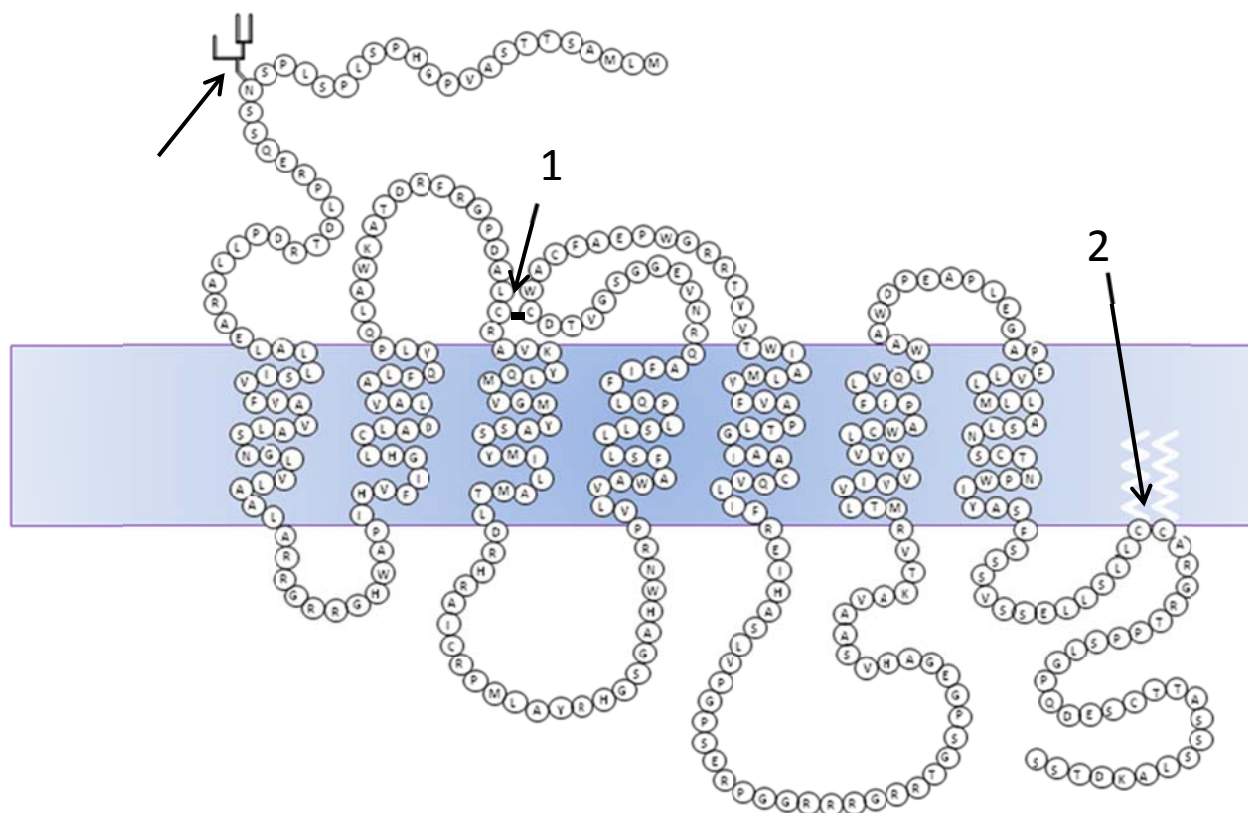


Figure 13: Représentation en serpentins de la topologie du récepteur V2

Sont représentés: Le site de N-glycosylation (N22) (1), le pont disulfure entre les cystéines 113 et 193 (2) et les deux sites de palmitoylation (cystéines 341 et 342) (3).

Chapitre 4 : Désordres hydriques associés au système vasopressinergique

Plusieurs conditions physiologiques, agents et pathologies peuvent perturber directement ou indirectement l'homéostasie hydrique via le système vasopressinergique. Ces perturbations peuvent se retrouver au niveau de la production ou de la sécrétion d'AVP, la réception et la transmission des signaux par le V2R au niveau du rein, ou affecter la translocation des AQP2. Pour les besoins de cette thèse, seuls les désordres dont l'étiologie émane directement du récepteur V2 seront traités en détails.

4.1 Le Diabetes Insipidus

Le Diabetes Insipidus (DI) tire son nom du Grec 'Diabainein' qui signifie 'passer au travers' et du latin 'Insipidus' qui signifie 'sans goût'. Il est caractérisé par une diurèse excessive menant à l'élimination de grands volumes d'urine diluée (polyurie hypotonique) en association avec une polydipsie (soif excessive). Les conséquences les plus fâcheuses sont la déshydratation et l'hypernatrémie (augmentation du niveau de sodium sanguin). Chez l'enfant, la déshydratation peut causer des dommages cérébraux, des retards de développement et même la mort. Une diète faible en sodium et, dans certains cas, l'utilisation d'antidiurétiques permet de diminuer de 20 à 30% la diurèse (Earley et Orloff, 1962) mais cette diète est difficile à suivre et les enfants atteints continuent d'absorber de grandes quantités d'eau, entraînant des reflux gastro-oesophagiens et des vomissements, ce qui engendre des carences nutritionnelles. Il existe quatre types

fondamentalement différents de Diabetes insipidus, chacun relevant d'une cause ou d'un dysfonctionnement différent. Les types de DI sont:

-Neurogénique: Aussi connu sous le nom DI central, hypothalamique, hypophysaire ou neurohypophysaires, il est causé par une déficience en AVP et est le plus commun des DI. La cause la plus fréquente du DI neurogénique est une destruction de la partie postérieure de la glande hypophysaire, responsable de la synthèse de l'AVP. La destruction de la partie postérieure de l'hypophyse peut être causée par plusieurs facteurs, dont une infection, un traumatisme crânien, une tumeur, des infiltrations, etc. mais pour environ la moitié des cas, la maladie est idiopathique. Le DI neurogénique est généralement permanent et ne peut être guéri mais les symptômes peuvent être grandement et même complètement éliminés par l'administration de desmopressine (DDAVP), un analogue d'AVP.

-Néphrogénique: Le Diabetes insipidus néphrogénique (DIN) aussi connu comme DI résistant à la vasopressine, est causé par une insensibilité des reins aux effets de l'AVP et ne peut donc pas être traité à la desmopressine. Le DIN peut être occasionné par la prise de certains médicaments, des pathologies rénales, incluant des défauts génétiques héréditaires (DIN congénital ou DINc). Cette thèse se consacre en partie à l'étude de la forme congénitale de cette classe de DI et sera élaboré à la section suivante.

-Gestagénique: aussi connu sous le nom DI gestationnel est aussi causé par une déficience en hormone antidiurétique et a seulement lieu lors de la grossesse. Il peut être dû à un dommage au niveau de l'hypophyse ou à l'élimination trop rapide de l'AVP circulante par le placenta. Ce type de DI est traitable à la desmopressine mais les symptômes disparaissent habituellement 4 à 6 semaines après l'accouchement. Les symptômes sont généralement récurrents à chaque grossesse.

-Dipsogénique: qui est une forme de polydipsie primaire causée, comme son nom l'indique, par une soif anormale menant à une prise excessive de liquide. Il est généralement associé à des

anormalités au niveau de régions du cerveau qui régulent la soif. Il est difficile de le distinguer du DI neurogénique puisque les deux désordres peuvent avoir comme origine les mêmes déficiences cérébrales. La façon de les distinguer est de mesurer les niveaux circulants d'AVP après un stimulus, comme la privation en liquide où de constater l'effet d'un traitement à la desmopressine : Pour le DI dipsogénique, l'administration de desmopressine élimine aussi l'urination excessive mais n'élimine pas la soif et la prise de liquide. Il est important de bien distinguer ces deux formes de DI puisque l'administration de desmopressine aux patients souffrant de DI dipsogénique pourrait entraîner une intoxication à l'eau, une condition associée à des maux de tête, une perte d'appétit, de la nausée, de la léthargie et un état hyponatrémique.

4.2 Le diabète insipide néphrogénique congénital (DINc)

Comme son nom l'indique, le DINc est héréditaire et caractérisé par une insensibilité rénale à l'AVP menant à une diurèse excessive (>30 mL/kg/jour) et hypotonique (< 30 mmol/kg) (Fujiwara et Bichet, 2005). On retrouve généralement deux formes de DINc; la première, représentant 90% des cas, est reliée à des mutations du gène *AVPR2*, occasionnant un dysfonctionnement ou la perte de fonction du récepteur V2. Récessive et liée au chromosome X, elle affecte principalement les hommes. La deuxième forme, beaucoup plus rare, est associée à des mutations au niveau du gène codant pour l'AQP2, à transmission autosomale dominante ou récessive (Bockenhauer, 2008).

Historiquement, la première référence à paraître qui laissait sous-entendre qu'un facteur héréditaire était relié au désordre parut en 1892 (McIlraith, 1892). En effet, le Dr Charles H. McIlraith publia un article décrivant une famille souffrant de soif excessive et d'urinations fréquentes. En 1945, le Diabetes Insipidus de forme néphrologique était pour la première fois reconnu comme une condition distincte par le Dr Forssmann en Suède (Forssmann, 1945) et par le Dr Waring, aux États-Unis (Waring *et al.*, 1945). Les Dr Williams & Henry utiliseront pour la première fois l'appellation Diabetes Insipidus néphrogénique (DIN) et démontrent que les symptômes de certains patients n'étaient pas 'soulagés' par l'injection d'hormone antidiurétique (Williams et Henry, 1947). En 1954, on retrouve la présence d'AVP biologiquement active dans

l'urine de patients atteints de DIN (Luder et Burnett, 1954). En 1963, et contre toute attente, on constate la présence d'AVP dans la circulation sanguine de patients atteints de DIN (Holliday *et al.*, 1963). En 1969, Bode & Crawford proposent, sous l'appellation 'The hopewell hypothesis' que la plupart des cas de DIN en Amérique pourraient être reliés à la descendance d'Ulster Scots, arrivé en Nouvelle-Ecosse en 1761 à bord du bateau nommé 'Hopewell' (Bode et Crawford, 1969; Bichet *et al.*, 1993). En 1981, on apporte des évidence d'une forme familiale de DIN variante, caractérisée par une résistance partielle à l'hormone antidiurétique (Robertson et Scheidler, 1981). Une percée importante est effectuée en 1988 lorsque le locus muté, causant la forme la plus commune de DIN, est localisé; il s'agira de la région sub-télomérique du bras long du chromosome X (Knoers *et al.*, 1988). En 1989, Le Dr Bichet démontre que les patients atteints de DIN ne répondent pas plus au DDAVP (desmopressine), un analogue synthétique de l'arginine-vasopressine (Bichet *et al.*, 1989). En 1990, le Dr Birnbaumer isole et caractérise une lignée cellulaire de souris exprimant le récepteur V2, obtenue par transfert d'ADN génomique humain à des cellules HTB-1 murines (Birnbaumer *et al.*, 1990). En 1992, on isole finalement l'ADNc humain codant pour le récepteur V2 (Birnbaumer *et al.*, 1992). Celui du rat est aussi isolé durant la même année et les auteurs suggèrent que le gène *AVPR2* est relié au DIN, de par sa localisation génomique (Lolait *et al.*, 1992). Encore durant la même année, les Drs Bichet et Birnbaumer fournissent des évidences biochimiques que des mutations dans le récepteur V2 sont la cause du DIN lié au chromosome X (Rosenthal *et al.*, 1992).

À ce jour, plus de 200 mutations distinctes dans le gène codant pour le récepteur V2 et causant le DINc ont été rapportées dans la littérature (Spanakis *et al.*, 2008). Malgré tout, la maladie est plutôt rare puisque son incidence est estimée à 8,8 cas par million d'individus mâles, du moins au Québec (Arthus *et al.*, 2000). Approximativement 50% des mutations répertoriées sont faux-sens (*missense*) menant à la substitution/addition/délétion d'un ou plusieurs acides aminés, les reste étant des mutations non-sens, menant à un changement du cadre de lecture et/ou l'expression d'une forme tronquée par l'arrêt prématuré de la synthèse du récepteur (Conn *et al.*, 2007). Des mutations affectant tout les domaines de la protéine ont été identifiées mais semblent être plus fréquentes, toutes proportions gardées, dans les régions codant pour les domaines transmembranaires (Morello et Bichet, 2001).

Les mutations ont été classées en trois groupes, selon leur impact sur la biologie du récepteur (Fujiwara et Bichet, 2005). Ainsi, les mutations du groupe A sont associées à l'incapacité du récepteur à produire de l'AMPc en réponse à l'AVP, malgré la présence du récepteur à la surface cellulaire, découlant soit d'une incapacité à lier le ligand ou à transmettre le signal aux protéines G. Le groupe B inclut les récepteurs mutants dont l'expression à la surface cellulaire est compromise dû à un défaut de maturation et leur rétention intracellulaire et le groupe C inclut les mutations affectant la stabilité et la 'transcriptibilité' de l'ARNm. La majorité des mutations faux-sens a été rapportée faisant partie du groupe B et les récepteurs mutants sont donc retenus intracellulairement. Il est généralement accepté que la rétention intracellulaire de la plupart des récepteurs mutants se situe au niveau du réticulum endoplasmique où un système élaboré de contrôle de qualité veille à ce que seules les protéines complètes et adéquatement repliées progressent le long de la voie de sécrétion (voir chapitre 5).

Au-delà des mictions fréquentes, les conséquences les plus fâcheuses du DINc sont la déshydratation et l'hypermnatrémie. Les enfants exposés à des épisodes de déshydratation fréquentes sont souvent atteints de retard mental, comme démontré dans une étude où seulement 9 patients atteints de DINc sur 82 (11%) ont démontré une intelligence normale (Crawford et Bode, 1975). Dans un contexte médical, les considérations thérapeutiques les plus importantes impliquent un apport en fluide adéquat afin de compenser les pertes en eau et d'appliquer une diète faible en solutés afin de diminuer l'excrétion obligatoire d'urine. Chez les enfants atteints, la prise d'eau est parfois si importante qu'elle peut entraîner une perte d'appétit, des vomissements, de la fièvre, des diarrhées et affecter leur croissance et développement. Bien que paradoxal, l'administration de certains diurétiques, tels l'hydrochlorothiazide et l'indométhacine, s'est avéré utile pour diminuer la quantité d'urine formée et pour améliorer sa capacité de concentration (Earley et Orloff, 1962; Jakobsson et Berg, 1994). L'hydrochlorothiazide agit en inhibant la réabsorption du sodium au niveau du tubule contourné distal et ses effets bénéfiques seraient attribuable à l'hypovolémie qu'il induit (grâce à la perte de sodium), ce qui entraîne une diminution de la filtration glomérulaire et une augmentation de la réabsorption du sodium et de l'eau au niveau du tubule proximal, réduisant ainsi la quantité de pro-urine atteignant les tubules collecteurs (Janjua *et al.*, 2001). L'utilisation chronique de diurétiques de la famille des thiazides mène à une sécrétion urinaire de potassium accrue, pouvant mener à l'hypokaliémie. Ainsi, l'amiloride, un diurétique qui inhibe les canaux sodique épithéliaux (ENaC) tout en préservant le

potassium, est souvent utilisé en combinaison avec les thiazides. Quant à l'indométhacine, il est un inhibiteur non-spécifique des cyclo-oxygénases 1 et 2 et inhibe donc la formation de prostaglandines à partir de l'acide arachidonique. Comme mentionné à la section 1.3.1, la production rénale de prostaglandine et l'activation subséquente du récepteur EP₃ inhibe la voie PKA et la translocation des aquaporines 2. Notons aussi que, dans le cas de DINc partiel, impliquant une activité résiduelle du récepteur V2 muté, l'administration de DDAVP peut s'avérer bénéfique. En 2000, une percée prometteuse a été effectuée par l'équipe des Drs Bichet et Bouvier pour l'élaboration d'un traitement des patients atteints de DINc dont les récepteurs mutants sont retenus intracellulairement: Ils ont montré que l'utilisation de chaperons pharmacologiques favorisait la maturation et le bon fonctionnement de plusieurs mutants du récepteur V2 *in-vitro* (voir chapitre 6) (Morello et al., 2000). En 2006, Bernier *et al.* démontrent une amélioration des symptômes chez certains patients atteints de DINc par l'administration de chaperons pharmacologiques (Bernier *et al.*, 2006).

4.3 Syndrome de la sécrétion inappropriée de l'hormone antidiurétique

Le syndrome de la sécrétion inappropriée de l'hormone antidiurétique ou SIADH (*syndrome of inappropriate antidiuretic hormone secretion*) est une forme courante d'hyponatrémie, caractérisée par une incapacité à excréter des volumes importants d'eau, occasionnant la production d'une urine anormalement concentrée (>100 mOsm/kg), l'hyponatrémie (<135 mmol/L), l'hypo-osmolarité plasmatique (<300 mOsm/L) et une natriurèse élevée (> 40 mmol/L) (Hannon et Thompson, 2010). Le SIADH est généralement associé avec des concentrations plasmatiques d'AVP élevées, responsables de l'anti-diurèse excessive et peut, dans la majeure partie des cas, être traité par l'utilisation d'antagonistes du récepteur V2.

4.4 Syndrome néphrogénique de l'anti-diurèse inappropriée

Récemment, des patients ayant des profils cliniques apparentés à un SIADH chronique mais dont les niveaux d'AVP circulant étaient indétectables ont été rapportés (Feldman *et al.*, 2005). Des analyses génétiques ont permis de mettre en évidence deux mutations dans le gène *AVPR2* jusqu'alors inconnues, menant toutes les deux à la substitution du même acide aminé, soit l'arginine en position 137, par une cystéine ou une leucine (R137C/L). De façon intéressante, la substitution de cette même arginine par une histidine (R137H) avait été rapportée dans la littérature occasionnant de DINc, soit une pathologie aux manifestations cliniques totalement opposées. Une des études de cette thèse porte sur la caractérisation comparative des différentes substitutions de l'arginine 137 dans l'objectif de mieux comprendre la différence des issues cliniques. Une caractérisation sommaire préalable des mutants R137C/L a permis de déterminer que les deux substitutions induisaient un niveau d'activité constitutive élevé chez les récepteurs mutants, menant à la production d'AMPc en absence même d'AVP. Cette arginine fait partie du motif (D/E)R(Y/H), hautement conservé chez les récepteurs de la famille rhodopsine, et est reconnue pour être en interaction avec d'autres résidus chargés au niveau du TM-VI, participant ainsi à contraindre le récepteur dans sa conformation inactive (Rovati *et al.*, 2007). La découverte de mutations occasionnant un gain de fonction du récepteur V2 a forcé les auteurs à nuancer la notion de SIADH et à nommer cette nouvelle cause d'hyponatrémie 'syndrome néphrogénique de l'anti-diurèse inappropriée' (NSIAD; *nephrogenic syndrome of inappropriate antidiuresis*). Avant les travaux inclus dans cette thèse, 25 cas de NSIAD avaient été rapportés dans la littérature, tous étant causés par les deux mêmes substitutions (Cho *et al.*, 2009; Gupta *et al.*, 2009). Contrairement aux mutations occasionnant une perte de fonction du récepteur V2, reconnues pour affecter principalement les hommes, dû à la présence d'un seul allèle du gène chez ces derniers, les mutations occasionnant un gain de fonction ne peuvent être réchappées par la présence d'un deuxième allèle 'sain' et affecte donc également les femmes (Decaux *et al.*, 2007). De prime abord, l'utilisation d'agonistes inverses, reconnus pour abaisser les niveaux d'activité constitutive des RCPGs, serait la voie thérapeutique à préconiser mais une étude clinique comportant sept patients atteints de NSIAD issus de la même famille a démontré que l'utilisation de deux agonistes inverses spécifiques au récepteur V2 testés chez l'un d'eux n'avait

pas permis de soulager les symptômes (Decaux *et al.*, 2007), suggérant que les récepteurs mutants occasionnant le NSIAD sont ‘figés’ dans leur conformation active. Une des études de cette thèse démontrera que cette dernière particularité n’est pas généralisable à toutes les substitutions du récepteur V2 menant à un gain de fonction. Une stratégie combinant une restriction en fluide à l’administration d’urée par voie orale s’est par contre avérée efficace pour diminuer les symptômes chez des patients atteints de NSIAD (Feldman *et al.*, 2005; Huang *et al.*, 2006; Decaux *et al.*, 2007; Marcialis *et al.*, 2008).

Le DINc ainsi que le NSIAD sont deux des sujets d’étude principaux de cette thèse et impliquent tous les deux des mutations dans le récepteur V2. Plusieurs études traitent du DINc mais, de part sa découverte récente, le NSIAD reste très peu caractérisé. Comme décrit précédemment pour le DINc, la majorité des mutations faux-sens occasionnent une maturation incomplète du récepteur mutant et sa rétention à l’intérieur de la cellule par le système de contrôle de qualité du réticulum endoplasmique. Les récepteurs mutants occasionnant le NSIAD étudiés dans cette thèse se sont aussi avérés partiellement retenus intracellulairement, une observation plutôt paradoxale, compte tenu qu’ils génèrent un gain de fonction. Les prochains chapitres traitent donc de notions générales de la synthèse et de la maturation des protéines membranaire ou sécrétées, et plus particulièrement des RCPGs, le long de la voie de sécrétion, du système de contrôle de qualité du réticulum endoplasmique ainsi que des chaperons pharmacologiques, reconnus pour promouvoir spécifiquement la maturation et l’expression à la surface cellulaire d’un nombre croissant de protéines mutantes.

Chapitre 5 : Synthèse et maturation des protéines membranaires et sécrétées

Le réticulum endoplasmique (RE) est le premier compartiment de la voie de sécrétion. Sa surface membranaire est extensive et s'étend de l'enveloppe nucléaire à la périphérie cellulaire (Palade, 1975). Dans les cellules allongées, comme les neurones, le RE s'étend du corps cellulaire jusqu'aux dendrites et l'axone (Krijnse-Locker *et al.*, 1995; Aridor *et al.*, 2004). Le RE est une organelle polarisée; les membranes arborant les ribosomes (RE rugueux) sont en continuité avec les membranes lisses qui fournissent la surface nécessaire pour la formation de vésicules et les sites de sortie du RE. Son architecture élaborée supporte une variété de processus cellulaires clés, comme la biosynthèse de lipides, le repliement et l'assemblage des protéines ainsi que le contrôle signalétique et l'homéostasie du calcium (Ca^{2+}) (Borgese *et al.*, 2006). Ces processus sont régulés par la présence à même le RE de récepteurs pouvant initier et réguler des cascades moléculaires élaborées. Les cascades de signalisation associées au RE ont un impact majeur sur la régulation fine de l'expression d'une multitude de gènes afin d'ajuster ses fonctions avec les besoins, et sur le contrôle général de la physiologie cellulaire. La signalisation émanant du RE peut aussi culminer vers la mort cellulaire programmée (apoptose).

Les études initiales sur le RE ont élucidé le rôle des ribosomes et celui du translocon dans l'insertion co-translationnelle des polypeptides nouvellement synthétisés dans le RE (Blobel et Sabatini, 1970; Sabatini et Blobel, 1970; Blobel et Dobberstein, 1975; Johnson et van Waes, 1999; Egea *et al.*, 2005). Les polypeptides qui s'y replient et s'assemblent sont dédiés à la membrane plasmique, aux organelles intracellulaires ou à la sécrétion. Les protéines issues du RE ont des fonctions variées et incluent les récepteurs membranaires qui régulent l'activité métabolique et l'homéostasie cellulaire, la croissance et la différenciation cellulaire, la communication inter-cellules, les canaux qui régulent le débit d'ions et solutés, les récepteurs responsables du captage d'éléments nutritifs (peptides, lipides) de l'environnement extracellulaire, le tout se reflétant sur l'architecture et la fonction des organes. Les protéines sécrétées et les enzymes impliquées dans la communication de la cellule avec son environnement, comme les

RCPGs, sont synthétisés dans le RE. La lumière du RE contient une haute concentration de chaperons moléculaires, d'enzymes de repliement et de facteurs de contrôle de qualité qui assistent la maturation des polypeptides nouvellement synthétisés, tout en s'assurant de la qualité du produit final (Ellgaard *et al.*, 1999). La biosynthèse des protéines dans le RE est divisée en trois étapes, soit la translocation dans le RE, le repliement et dans certains cas, l'assemblage oligomérique (Ellgaard et Helenius, 2003).

5.1 Translocation et intégration membranaire des protéines en synthèse au RE

Chez les mammifères, la synthèse des protéines est initiée par les ribosomes cytoplasmiques à l'exception des protéines synthétisées à même certaines organelles. Ces protéines sont d'abord synthétisées sous forme de précurseur arborant une séquence signal permettant l'adressage des protéines à la voie de sécrétion (Blobel et Dobberstein, 1975). Cette séquence signal, de 15 à 30 résidus, est située en N-terminal de la protéine (article de synthèse; (Walter et Johnson, 1994)). Lorsque le peptide signal émerge du ribosome lors de la traduction, un complexe protéique nommé SRP (*signal recognition particle*) se lie au peptide ainsi qu'au ribosome, ralentissant ainsi l'élongation du polypeptide en synthèse. Le complexe ainsi formé sera dirigé vers le RE, en se liant au récepteur SRP, une protéine retrouvée uniquement à la surface des membranes du RE rugueux, à proximité des translocons. Des données récentes suggèrent aussi que certains ARNm contiendraient des séquences leur permettant d'être localisés au RE, ce qui rendrait leur produit indépendant de la présence d'un peptide signal pour leur adressage au RE (Pyhtila *et al.*, 2008). Dans le cas des RCPGs, la majorité (90%) ne contient pas de séquence signal d'adressage au RE. Pour eux, le premier tronçon transmembranaire agirait comme séquence d'ancrage et de signal de translocation au RE par la voie SRP-Sec61 (Friedlander et Blobel, 1985).

En 1975, Blobel et Dobberstein ont émis l'hypothèse que les protéines vouées à la voie de sécrétion étaient transloquées à la lumière, ou intégrées aux membranes du RE via des canaux

aqueux formés par des protéines membranaires résidente du RE (Blobel et Dobberstein, 1975). En 1986, on utilise le terme translocon pour la première fois (Walter et Lingappa, 1986). Les translocons sont formés d'un complexe de différentes protéines qui s'associent pour former un canal permettant le passage de chaînes polypeptidiques. Ses composantes, chez les eucaryotes, ont été identifiées par photo-réticulation, en incorporant des sondes photo-réactives directement aux chaînes polypeptidiques en synthèse (Krieg *et al.*, 1989; Wiedmann *et al.*, 1989; High *et al.*, 1991; Thrift *et al.*, 1991). Une reconstitution *in-vitro* de l'activité de translocation et d'intégration aux membranes a été possible avec seulement quatre protéines. La protéine Sec61 α et deux autres protéines, Sec β et Sec γ , forment un hétéro-trimère et composent, avec TRAM (*translocon-associated membrane protein*) l'essence même du translocon, nommé Sec61 (Figure 14). Bien que la translocation post-traductionnelle soit possible chez la levure, la translocation des protéines dans le RE chez les mammifères semblerait exclusivement co-traductionnelle (Chen *et al.*, 1995; Molinari et Helenius, 2000).

Plusieurs autres protéines sont associées ou situées à proximité du translocon Sec61. C'est le cas pour les protéines SP (*signal peptidase*) et OST (*oligosaccharyltransferase*) qui agissent directement sur le peptide en synthèse. La protéine SP est responsable du clivage protéolytique du peptide signal tandis que l'OST est responsable de la glycosylation liée aux asparagines.

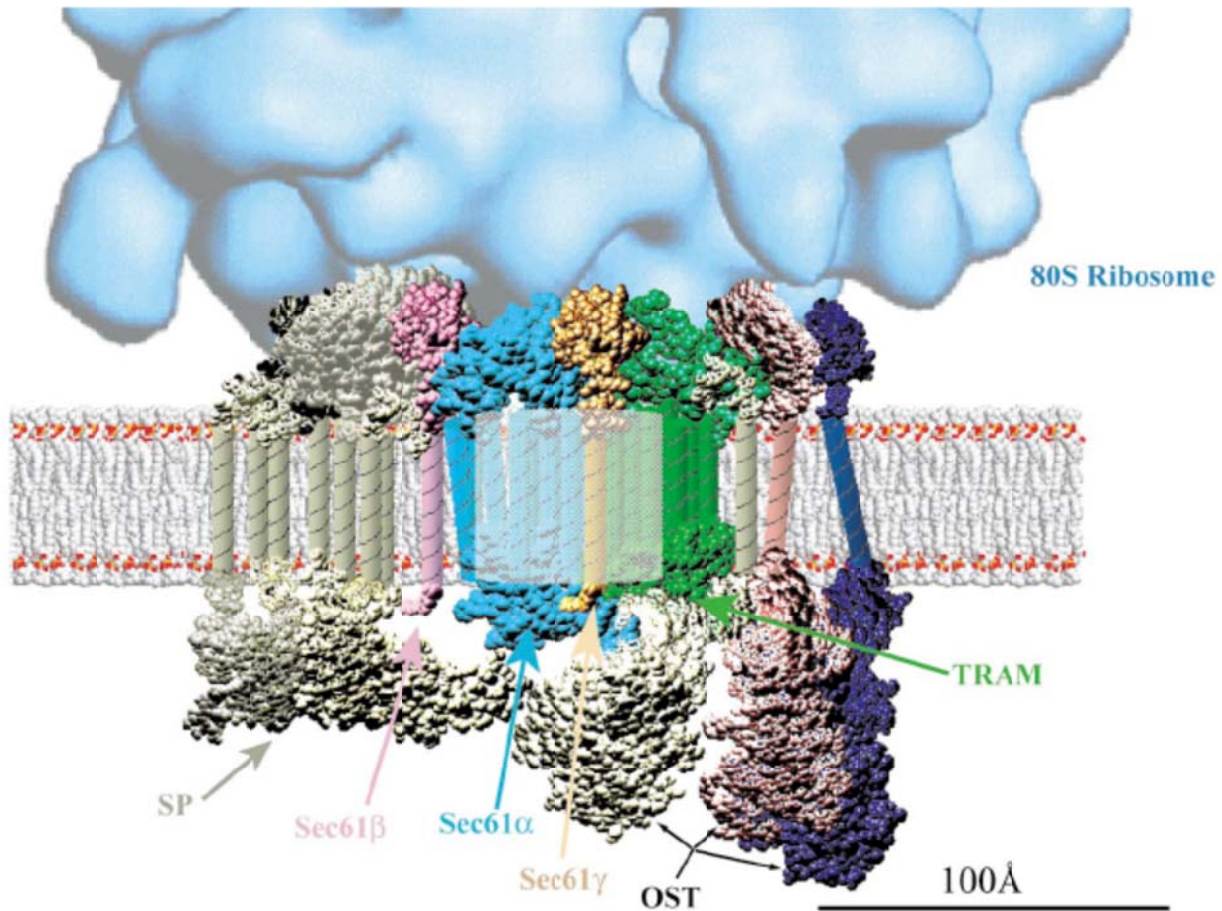


Figure 14: Assemblage des protéines formant le translocon Sec61

Chaque composante du translocon est représentée à l'échelle dans cette vue perpendiculaire au plan de la membrane du RE. La position relative de chacun des polypeptides a été choisie de façon à correspondre au modèle fonctionnel, soit en plaçant les protéines connues pour interagir ensemble à proximité l'une de l'autre. Tiré de (Johnson et van Waes, 1999)

5.2 Glycans liés aux asparagines

Lorsqu'un polypeptide pénètre la lumière du RE par le complexe du translocon Sec61, sa séquence est balayée par l'OST afin de détecter les asparagines contenues dans un motif

consensus composé de Asn-X-Ser/Thr, où X peut être n'importe quel résidu, sauf une proline. Lorsque le motif consensus est reconnu, l'asparagine est modifiée de façon covalente par l'addition d'un oligosaccharide pré-assemblé. Le bloc de glycans qui est lié aux asparagines est composé de 14 saccharides, synthétisé en un précurseur associé aux membranes par des enzymes situés de chaque côté du RE (Kornfeld et Kornfeld, 1985) et sa composition et sa maturation seront traitées à la section 5.2.1. L'oligosaccharide complexe formé est transféré de son ancrage au dolichylpyrophosphate vers le peptide en voie de synthèse par l'OST dont le site actif se retrouve dans la lumière du RE. Cet enzyme reconnaît une conformation particulière, lors de l'émergence du polypeptide en synthèse, dans la séquence consensus de N-glycosylation; il a été estimé que 90% des séquences consensus de N-glycosylation sont effectivement glycosylées (Gavel et von Heijne, 1990). Une analyse de la banque de donnée SWISS-PROT a permis de prédire que la moitié de toutes les protéines de source eucaryotique sont glycosylées (Apweiler *et al.*, 1999) et qu'environ 90% d'entre elles sont susceptibles de contenir de la glycosylation liée aux asparagines; il y aurait en moyenne 1,9 N-glycans par chaîne polypeptidique N-glycosylée. Avec une masse moléculaire pouvant atteindre 3 kDa, la N-glycosylation peut parfois contribuer considérablement à la masse d'une glycoprotéine et couvrir une large fraction de sa surface. Exposés à la surface cellulaire et formant des branches flexibles et hautement hydratées, les N-glycans peuvent s'étendre de 3 nm et plus dans le solvant. Des structures cristallographiques ainsi que des études par résonance magnétique nucléaire de glycoprotéines ont démontrées que, mis à part leur interaction avec les deux premiers N-acétylglucosamines, la majorité des glycans ont peu de contacts avec la surface de la protéine (Wormald *et al.*, 2002). Même lorsque des interactions entre les oligosaccharides et la surface protéique sont prévisibles ou observées, les sucres terminaux de l'oligosaccharide sont généralement libres et accessibles : Les N-glycans et le corps protéique sont donc généralement considérés indépendants entre eux. De plus, enlever les sucres enzymatiquement de la surface des glycoprotéines matures n'a généralement pas d'effet appréciable sur sa structure ni sa fonction. Le fait que les glycans sont des appendices semi-indépendants leur permet donc d'être modifiés sans affecter significativement la protéine sur laquelle ils se trouvent, contribuant ainsi à la régulation fine des propriétés biophysiques et biologiques des glycoprotéines et à l'établissement d'une micro-hétérogénéité caractéristique des glycoprotéines matures.

Les oligosaccharides liés aux asparagines ont diverses fonctions importantes sur les protéines matures: Ils sont des ligands pour une multitude de processus de reconnaissance, ils stabilisent les protéines contre la dénaturation et la protéolyse, augmentent leur solubilité et leur temps de demi vie, modulent la réponse immunitaire, influencent la topologie des protéines membranaires, confèrent une rigidité structurale, régulent le renouvellement (turnover), affectent la charge et le point isoélectrique des protéines et sont médiateurs de certaines interactions avec des pathogènes (Varki, 1993; Upreti *et al.*, 2003).

Le bloc de glycans initialement ajouté aux protéines en synthèse subira plusieurs modifications (ajouts/clivages) lors du transit de ces dernières le long de la voie de sécrétion. Pendant longtemps, on s'est demandé pourquoi synthétiser et lier un oligosaccharide complexe aux polypeptides en synthèse dans le RE pour ensuite l'ébarber et le reconstruire avec des sucres différents? Bien qu'il était clair que ce procédé était important, puisque conservé et virtuellement inchangé pour tous les eucaryotes, il a été difficile de rationaliser cette complexe et, en apparence, coûteuse stratégie biosynthétique. Les dernières années de recherche dans ce domaine ont su mettre à jour une logique relativement simple: Les différentes configurations de sucres liés aux asparagines ne sont pas simplement des intermédiaires d'une voie de biosynthèse, mais ont des fonctions spécifiques. En fait, ils jouent un rôle dans au moins trois étapes durant l'existence d'une glycoprotéine et pour chaque étape, la structure de l'oligosaccharide doit être différente.

La première étape a lieu dans le RE où l'oligosaccharide central doit être partiellement ébarbé pour l'adoption d'un repliement adéquat du polypeptide ainsi que pour son interaction avec les composantes lectines du système de repliement et de contrôle de qualité du RE. Le premier rôle du glycan est donc de favoriser le repliement et de sécuriser la qualité de la production des protéines. Le second rôle implique le transport et l'adressage des protéines aux différentes organelles. Cette étape a lieu dans le RE, le Golgi et le réseau trans-Golgi. Après que des modifications majeures ont eu lieu dans le Golgi et que la protéine a atteint un stade final de maturité, le rôle du glycan est alors presque aussi varié qu'il y a de structures de sucres. Pour les besoins de cette thèse, nous nous focaliserons sur le premier rôle des oligosaccharides liés aux asparagines, soit le repliement et le contrôle de qualité des protéines en voie de maturation.

5.2.1 N-Glycans et contrôle de qualité du RE

Les processus impliqués dans la biosynthèse des protéines sont sujets à erreurs et doivent donc être chapeautés par un système de surveillance vigilant. En effet, au niveau de la transcription (Ninio, 1991) et de la traduction (Yarus, 1979; Kurland, 1992), on compte en général un évènement erroné sur 10 000, du moins chez *E. coli*. De plus, la présence de mutations génétiques peut induire la synthèse de protéines aberrantes. L'adoption d'une structure tridimensionnelle adéquate est un paramètre crucial pour le bon fonctionnement des protéines et, dans certains cas, ce processus est extrêmement inefficace. Par exemple, le récepteur δ opioïde (Petaja-Repo *et al.*, 2000) et le CFTR (*cystic fibrosis transmembrane conductance regulator*) (Kopito, 1999) sont des protéines natives dont les rendements de repliement et de maturation sont estimés à seulement 40 et 20% respectivement. Les systèmes de contrôle de la qualité doivent donc être en mesure de détecter d'infimes changements conformationnels occasionnés par la substitution d'un seul résidu, ou d'un repliement inadéquat afin d'éliminer les protéines potentiellement défectueuses. Ainsi, chez certains organismes procaryotes, environ 20% des protéines nouvellement synthétisées seront éventuellement dégradées avant d'avoir pu atteindre leur pleine maturation (Goldberg, 1972; Yen *et al.*, 1980) et pour l'humain, ce nombre pourrait atteindre 30% (Schubert *et al.*, 2000). Chez les mammifères, la glycosylation liée aux asparagines des protéines passant par la voie de sécrétion sert de point d'ancrage entre les protéines en voie de synthèse et les protéines responsables des différentes étapes de sa maturation, son transport ou de son élimination. La composition du glycan est modifiée aux différentes étapes et ces différentes configurations permettent à la protéine en maturation de passer de l'un à l'autre de ces systèmes.

Le bloc de glycans ajouté aux protéines en voie de synthèse dans le RE est composé de deux N-acétylglucosamines, neuf mannoses et trois glucoses (Figure 16). Les glycans liés aux asparagines servent d'abord à augmenter l'hydrophilicité des polypeptides non-structurés en formation. Subséquemment, et toujours de façon co-traductionnelle (Chen *et al.*, 1995; Molinari et Helenius, 2000), les chaînes polypeptidiques N-glycosylées entrent dans un système de chaperons moléculaires dédié aux glycoprotéines composé de la calnexine (Cnx), une protéine lectine membranaire du RE de type 1, et/ou de la calréticuline (CRT), son homologue soluble

(Ellgaard *et al.*, 1999). Cette interaction précoce permet, entre autre, d'éviter l'agrégation des peptides en synthèse (Hebert *et al.*, 1996; Vassilakos *et al.*, 1996). La position du N-glycan sur la protéine en synthèse ainsi que la topologie de chacune des lectines détermineraient leur spécificité de substrats (Wada *et al.*, 1995; Hebert *et al.*, 1997). Une étude étendue impliquant environ 100 glycoprotéines s'associant à Cnx ou CRT lors de leur synthèse, a montré que certaines n'interagissent qu'avec un seul de ces deux chaperons tandis que d'autres interagissent simultanément ou séquentiellement avec les deux (Helenius, 1997).

La structure cristallographique de la portion luménale de la Cnx a révélée deux domaines; un domaine globulaire en sandwich β ressemblant aux lectines de légumes, et un domaine de 140 Angstroms en forme de bras composé de deux brins β repliés en épingle à cheveux (Figure 15) (Schrag *et al.*, 2001). Chaque brin est composé de quatre répétitions riches en prolines en tandem, nommé domaine P. Pour CRT, seule la structure du domaine P a été résolue par résonance magnétique nucléaire et il est semblable à celui de la Cnx, bien qu'étant plus court puisqu'il ne contient que trois domaines répétés (Ellgaard *et al.*, 2001). La haute homologie entre les domaines globulaires de la Cnx et de la CRT (39% d'identité) et leur redondance de spécificité pour les sucres laissent à penser qu'ils seraient relativement identiques (Ware *et al.*, 1995; Spiro *et al.*, 1996; Vassilakos *et al.*, 1998). Cnx et CRT possèdent un site de haute affinité pour le calcium dans leur domaine globulaire. Les ions calcium jouent un rôle structural important puisque leur absence diminue la température de dénaturation, augmente la susceptibilité aux protéases et abroge les propriétés lectines des deux chaperons (Vassilakos *et al.*, 1998; Corbett *et al.*, 2000; Li *et al.*, 2001). De plus, CRT possède plusieurs sites de faible affinité pour le calcium qui serviraient de stockage (Baksh et Michalak, 1991; Nakamura *et al.*, 2001). Les deux chaperons lient le Zn^{++} au niveau du domaine globulaire et lient aussi l'ATP, bien qu'aucune activité ATPasique n'ait été détectée chez ces dernières; le site de liaison aux nucléotides n'a toutefois pas été localisé. Comme suggéré pour d'autres chaperons moléculaires, la présence d'ATP (mais non l'ADP ni l'AMP) pourrait induire des changements conformationnels puisqu'elle diminue la susceptibilité de CRT aux protéases et augmente les habilités de suppression d'agrégation des deux lectines, du moins *in-vitro* (Ou *et al.*, 1995; Ihara *et al.*, 1999; Saito *et al.*, 1999; Corbett *et al.*, 2000).

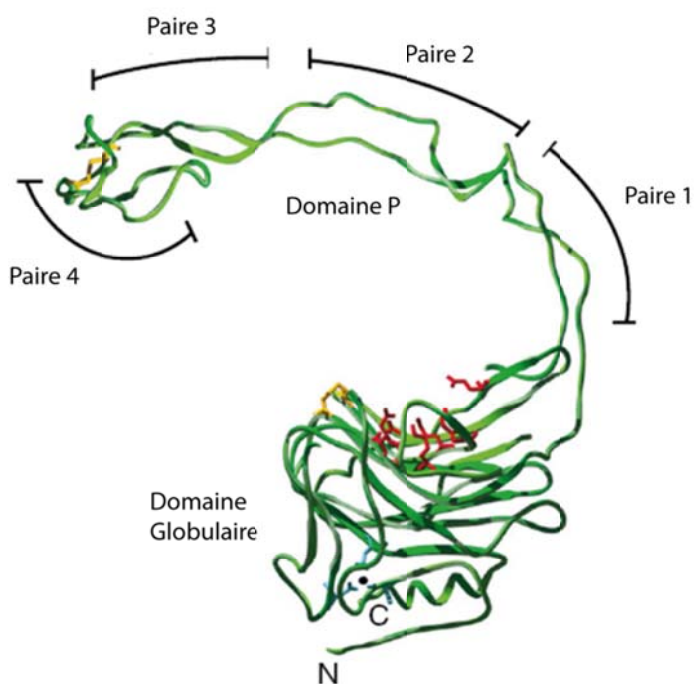


Figure 15: Structure de la Calnexine

Le domaine globulaire lie les oligosaccharides avec, en rouge, les acides aminés impliqués dans la liaison avec le glucose terminal. Les résidus en interaction avec un ion Ca^{++} (point noir) sont en cyan et les ponts disulfures sont représentés en jaune. Le domaine en bras (domaine P) est composé de deux brins parallèle dont un contient 4 motifs 1 [I-DP(D/E)A-KPEDWD(D/E)] et l'autre, 4 motifs 2 [G-W-P-IN-P-Y]. Chaque motif 1 est en paire avec un motif 2 sur le brin opposé. Les quatre paires de motifs sont montrées. Modifié de (Williams, 2006)

Les lectines Cnx et CRT lient spécifiquement les glycoprotéines arborant des sucres de type high-mannose mono-glucosylés, soit la forme $\text{Glc}_1\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ (Figure 16) (Grinna et Robbins, 1979) bien que dans certains cas rapportés, le polypeptide en formation pourrait aussi interagir avec la calnexine via des interactions protéine-protéine (Williams, 2006; Molinari, 2007). Pour que la glycoprotéine en formation puisse interagir avec le domaine globulaire de la Cnx ou de la CRT, il doit donc y avoir clivage préalable des 2 premiers résidus glucose à l'extrémité de la branche A de l'oligosaccharide central. Cette opération est effectuée par l'action

concertée de deux glucosidases résidentes du RE, les glucosidases GI et GII (voir Figure 16). La glucosidase GI est une protéine membranaire de type II d'environ 82 kDa qui clive rapidement le premier glucose, permettant la dissociation du bloc de glycan de l'OST (Yan et Lennarz, 2005).

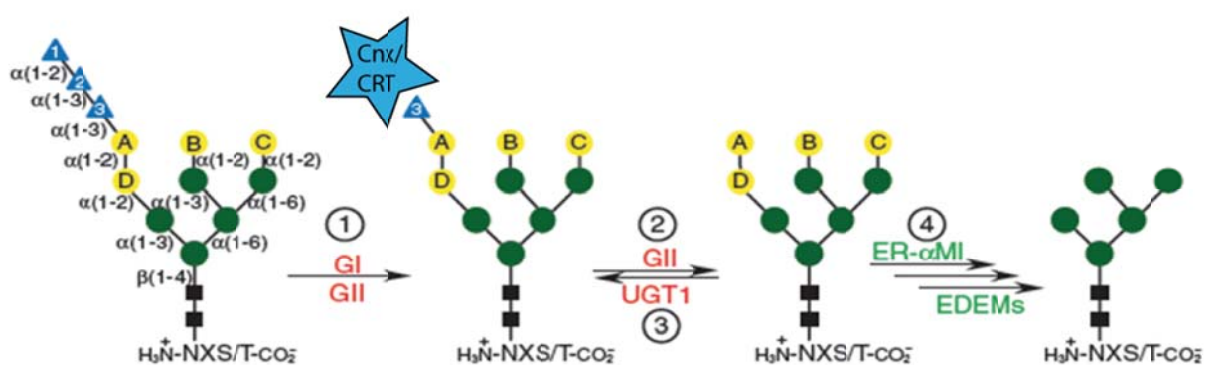


Figure 16: Traitement dans le RE des glycanes liés aux asparagines chez les mammifères

Structure de l'oligosaccharide lié de façon covalente aux résidus asparagines contenus dans la séquence consensus NXS/T sur les protéines nouvellement synthétisées. Les glucosidases I et II clivent les glucoses 1 et 2 de la branche A, respectivement (étape 1). L'intermédiaire monoglucosylé ainsi créé s'associe avec les lectines calnexine (Cnx) ou calréticuline (CRT). Après la dissociation des lectines, la glucosidase II clive le glucose 3 de la branche A (étape 2). L'enzyme UGGT1 peut rajouter un résidu glucose au mannose terminal de la branche A (étape 3) afin de permettre une réassociation avec Cnx ou CRT. Les résidus $\alpha(1-2)$ -mannoses sont progressivement clivés par les $\alpha(1-2)$ -mannosidases résidentes du RE (étape 4). Triangles bleu; glucoses, cercles jaunes et verts; mannoses, carrés noirs; N-acétylglucosamines. Modifié de (Molinari, 2007)

L'ancrage du polypeptide en synthèse par son/ses N-glycans permet à plusieurs protéines, agissant de concert avec Cnx/CRT, de procéder au repliement du polypeptide client (voir section 5.4). Ces protéines chaperons et enzymes de repliement sont en surnombre par rapport aux protéines clientes, atteignant des concentrations près du millimolaire (Marquardt *et al.*, 1993;

Stevens et Argon, 1999). L'enzyme Glucosidase II convertit éventuellement les glycoprotéines clientes sous leur forme non-glucosylée ($\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$) (Grinna et Robbins, 1979), ce qui termine leur interaction avec les chaperons Cnx/CRT. En plus de dissocier les protéines clientes des lectines Cnx/CRT, cette nouvelle configuration de sucre rend les glycoprotéines en maturation accessibles à l'enzyme UDP-glucose:glycoprotéine glucosyltransférase (UGGT) (Trombetta et Parodi, 2005). L'enzyme UGGT est reconnue pour agir en temps que senseur de repliement et est donc considérée comme l'élément central du contrôle de qualité basé sur les N-glycans au niveau du RE. La protéine de 174 kDa est constituée d'un domaine 'senseur' en N-terminal (80% de la protéine) et d'un domaine catalytique en C-terminal (Arnold *et al.*, 2000), les deux domaines étant étroitement liés fonctionnellement et structurellement (Arnold et Kaufman, 2003; Guerin et Parodi, 2003). La partie senseur serait apte à reconnaître les domaines hydrophobes anormalement exposés à l'extérieur de la structure des protéines en repliement (Ritter et Helenius, 2000; Caramelo *et al.*, 2003; Caramelo *et al.*, 2004; Taylor *et al.*, 2004) ainsi que la portion $\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$ du glycan central qui y est attaché (Totani *et al.*, 2009). L'association d'une protéine semi-repliée avec l'UGGT entraîne une re-glucosylation, à partir d'UDP-glucose, du mannose terminal de la branche A du glycan central, redonnant à ce dernier son affinité pour les lectines Cnx et CRT, permettant au peptide en maturation une nouvelle ronde de repliement facilitée par le complexe Cnx/CRT; proposé pour la première fois en 1993 (Hammond et Helenius, 1993), ce processus élégant est nommé le cycle de la calnexine (voir Figure 17). Ainsi, plusieurs rondes de repliement peuvent survenir, jusqu'à l'obtention d'une structure tertiaire adéquate, l'UGGT n'ayant pas d'affinité pour les protéines correctement repliées (Caramelo *et al.*, 2004).

En général, les glycoprotéines en repliement resteront associées au système Cnx de 15 minutes à plus d'une heure afin d'atteindre leur structure native (Lippincott-Schwartz *et al.*, 1988; Amara *et al.*, 1989; Le *et al.*, 1990; de Virgilio *et al.*, 1999; Fagioli et Sitia, 2001; Molinari *et al.*, 2002; Mancini *et al.*, 2003). Lorsque la protéine est adéquatement repliée et donc non reconnue par l'UGGT, elle sera prise en charge par un autre système de lectines responsable de son transport antérograde vers l'appareil de Golgi avant d'être dirigée vers sa destination finale. Les travaux du Dr Hauri ont en effet permis de déterminer que la protéine ERGIC-53 (53 kDa *ER-Golgi intermediary compartment protein*) assistait le transport des glycoprotéines du RE vers le compartiment intermédiaire ER-Golgi (ERGIC) (Hauri *et al.*, 2000). ERGIC-53, une lectine

membranaire de type I, lie spécifiquement les glycanes de type high-mannose et fait la navette entre le RE, où elle lie ses substrats dans un environnement neutre et riche en calcium, et l'ERGIC où elle libère sa cargaison, dans un environnement acide et pauvre en calcium (Appenzeller-Herzog *et al.*, 2004).

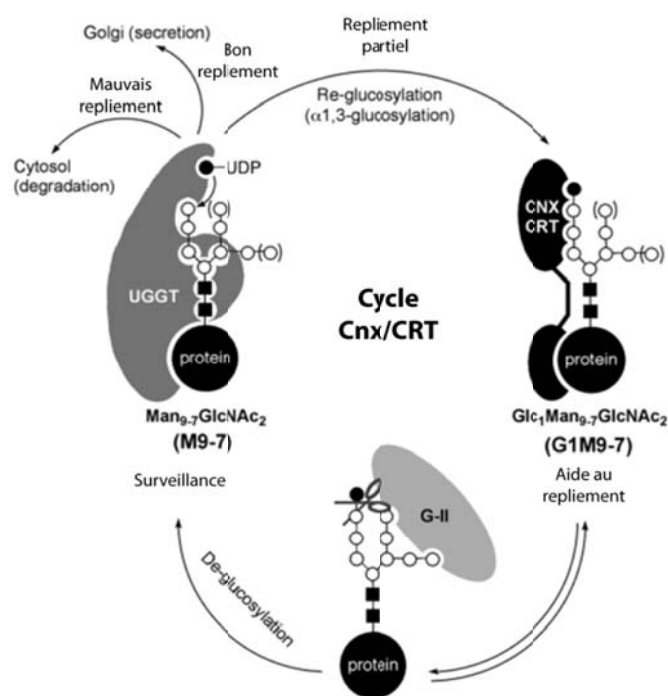


Figure 17: Cycle de la calnexine.

Diagramme du cycle de la calnexine, mécanisme central du contrôle de la qualité des glycoprotéines au niveau du RE. Adapté de (Totani *et al.*, 2009)

5.3 Chaperons moléculaires, senseurs et enzymes de repliement du RE

Comme mentionné précédemment, le RE renferme une grande quantité de protéines vouées à assister et évaluer l'adoption de conformation adéquate des protéines en synthèse. Durant leur interaction avec les chaperons Cnx et CRT, les glycoprotéines en synthèse sont séquestrées dans un environnement propice à l'exploration assistée de différentes conformations, jusqu'à l'obtention de leur structure native. Cette section fait une revue sommaire des trois joueurs les mieux caractérisés impliqués dans ce processus.

BIP :

Lors de leur entrée dans le RE, les chaînes polypeptidiques non repliées, dont les segments hydrophobes sont exposés au solvant sont sujettes à agrégation et doivent donc être prises en charge rapidement. Une protéine importante dans ce processus est le chaperon moléculaire BIP (*immunoglobulin binding protein*), un orthologue de la famille de chaperons HSP70 (*70 kDa heat shock protein*), retrouvés dans le cytosol. BIP est un chaperon abondant dans le RE et lie spécifiquement les protéines non-repliées (Hellman *et al.*, 1999). Des études de liaison avec différents peptides ont permis de déterminer que BIP se liait préférentiellement aux segments contenant des résidus aliphatiques retrouvés normalement à l'intérieur de la structure des protéines repliées (Flynn *et al.*, 1991; Blond-Elguindi *et al.*, 1993). De part son association avec le translocon, l'interaction BIP/substrat serait précoce. En fait, BIP prendrait rapidement en charge les polypeptides dont les 50 premiers acides aminés seraient dépourvus de N-glycosylation (Molinari et Helenius, 2000). Au-delà de son rôle de chaperon, BIP est aussi impliqué dans la maintenance des réservoirs de calcium du RE, dans la reconnaissance des protéines défectueuse devant être dirigées vers la dégradation (voir la prochaine section) et agit comme barrière de perméabilité du translocon lors des événements précoces de translocation des polypeptides (Hendershot, 2004).

Comme les membres de la famille des HSP70, BIP a un domaine ATPase en N-terminal et un domaine de liaison au substrat en C-terminal. Ces domaines communiquent puisque les cycles d'hydrolyse de l'ATP et du remplacement de l'ADP par l'ATP sont corrélés avec

l'association et la dissociation de BIP avec ses substrats (Mayer *et al.*, 2003). En effet, lorsque le domaine de liaison aux nucléotides est occupé par l'ATP, le domaine de liaison au substrat est ouvert et l'hydrolyse de l'ATP en ADP referme ce domaine, permettant de stabiliser l'interaction avec son substrat (Mayer et Bukau, 2005). La dissociation BIP/substrat a lieu lorsque l'ADP est remplacée par l'ATP dans le domaine ATPasique. BIP interagit avec des co-facteurs, les ERdj (*ER-resident domain J proteins*) qui stimulent son activité ATPasique et augmentent le spectre de ses substrats (Misselwitz *et al.*, 1998). Ces co-facteurs sont de la famille des HSP40 et sept membres (ERdj1-7) ont été isolés chez les mammifères. Des données récentes suggèrent que les ERdj reconnaîtraient les substrats, recruteraient BIP et s'assureraient que plusieurs interactions fonctionnelles aient lieu entre les deux protéines avant de se dissocier du complexe, et ce, bien avant que le repliement de la protéine soit complété (Jin *et al.*, 2008; Petrova *et al.*, 2008).

Puisque BIP est simultanément impliqué dans le repliement des protéines en synthèse et dans la reconnaissance des substrats voués à la dégradation, il est difficile de concevoir comment est régulé l'une et l'autre de ces activités. Certains suggèrent que l'association de différentes ERdj au complexe BIP/substrat permettrait de définir l'issue de cette interaction. Ainsi, l'association avec les ERdj 3 et 6 favoriserait le repliement tandis que l'association avec les ERdj 4 et 5 favoriserait la voie de dégradation (Otero *et al.*, 2010).

GRP94 :

Le chaperon moléculaire GRP94 (*glucose-regulated protein of 94 kDa*) localisé au RE est un orthologue de la famille des HSP90. Comme tout les membres de cette famille, GRP94 est une protéine soluble composée de quatre domaines, soit le domaine N-terminal, un domaine 'linker', un domaine 'milieu' et un domaine C-terminal. GRP94 est aussi une ATPase, comme BIP, et son domaine de liaison aux nucléotides se retrouve au niveau du domaine N-terminal; pour qu'il y ait hydrolyse de l'ATP, il doit y avoir coopération des domaines 'linker' et 'milieu'. Le domaine C-terminal serait responsable de l'homo-dimérisation de la protéine, une caractéristique essentielle à son activité (Nemoto *et al.*, 1996; Wearsch et Nicchitta, 1996). Certains ont suggéré que cette dimérisation établissait une plateforme sur laquelle l'assemblage oligomérique des protéines en synthèse était effectuée (Yang et Li, 2005).

La relation entre l'hydrolyse de l'ATP et la fonction chaperon de GRP94 n'est pas complètement élucidée. Une hypothèse séduisante suggère que la liaison d'ATP au domaine N-terminal favoriserait sa dimérisation, agissant ainsi comme une pince moléculaire permettant de fixer les protéines clientes (Immormino *et al.*, 2004; Dollins *et al.*, 2007). Bien que la fonction majeure de GRP94 soit de favoriser le repliement et l'assemblage des protéines en maturation, son spectre de substrats est beaucoup plus limité que BIP; plusieurs protéines sécrétées ne requièrent pas GRP94 pour leur maturation et d'autres, dont l'interaction avec GRP94 a été confirmée, peuvent être exprimées correctement sans celle-ci (Yang et Li, 2005). La grande sélectivité de substrats de GRP94 soulève des questions quant aux déterminants structuraux qui servent de reconnaissance au chaperon. Sans être les sucres, comme les lectines, ni les segments hydrophobes et différemment des autres membres de la famille des HSP90 qui reconnaissent des domaines kinases et de liaison à l'ADN, le seul déterminant commun entre ses différents substrats semble être la présence de ponts disulfures (Eletto *et al.*, 2010). Des données récentes suggèrent que GRP94 serait aussi impliquée dans la reconnaissance des substrats voués à l'ERAD (Christianson *et al.*, 2008), bien que les mécanismes s'y rattachant ne sont toujours pas élucidés.

La majeure partie du calcium du RE est liée aux protéines et GRP94 est une de celles-ci; chaque molécule est apte à lier entre 16 et 28 atomes (Macer et Koch, 1988; Van *et al.*, 1989), conférant à cette protéine un rôle de stockage du calcium. GRP94 est influencée par ces ions puisque son activité de liaison aux substrats est augmentée *in-vitro* en présence de Ca^{++} à concentration physiologique (Biswas *et al.*, 2007). Les récepteurs de la famille des RCPGs ne sont pas reconnus pour interagir directement avec GRP94. Les exemples d'interaction entre un RCPG et GRP94 sont rares dans la littérature. Une forme mutante du récepteur LH (*luteinizing hormone*) a été identifiée interagissant avec GRP94, le récepteur sauvage n'ayant pas d'interaction avec ce chaperon (Mizrachi et Segaloff, 2004). De plus, des formes dimériques sauvages et mutantes du récepteur β 2-adrénergique et du récepteur AT1 (homo- et hétéro-dimères) ont été immuno-précipitées avec GRP94 (Hammad et Dupre, 2010) mais cette étude comporte plusieurs lacunes et la qualité des résultats est discutable.

ERp57:

Une étape cruciale dans l'adoption d'une conformation adéquate lors du repliement des protéines passant par la voie de sécrétion est la formation de liens disulfures. Une famille de protéines, nommées protéines disulfide isoméras (PDI), catalyse l'oxydation, la réduction et l'isomérisation des liens disulfures. ERp57 est une protéine de la famille des protéines disulfide isoméras (PDI) et est une composante essentielle du système Cnx/CRT. En effet, ERp57 est retrouvée en association avec les chaperons Cnx et CRT via l'extrémité de leur domaine P. Elle contient deux motifs thioredoxines (CXXC) qui agissent en temps que thiol oxydase, réductase et isomérase afin de catalyser la formation de liens disulfures sur les protéines en synthèse (Frickel *et al.*, 2004).

5.4 Élimination des glycoprotéines mal repliées

Les protéines qui n'arrivent pas à atteindre une conformation native dans des délais raisonnables sont sujettes à la dégradation par la voie de l'ERAD (*ER-associated degradation*). Cette étape est importante puisque qu'elle empêche l'accumulation de protéines irrécupérables dans le RE, ce qui nuirait à son bon fonctionnement. La démannosylation progressive du glycan central est un signal de dégradation des glycoprotéines puisque l'inhibition des mannosidases du RE par des agents chimiques spécifiques (e.g. kifunensine) augmente le temps de résidence dans le RE de protéines normalement dégradées (Liu *et al.*, 1999) et que la surexpression de certaines accélère leur dégradation (Wu *et al.*, 2003). L'activité enzymatique relativement lente des mannosidases du RE (Jakob *et al.*, 1998) est une caractéristique inhérente au processus décisionnel de l'adressage des protéines mal repliées à l'ERAD; plus le temps de résidence de la protéine en maturation dans le RE est grand, plus les probabilités de démannosylation du glycan central sont élevées. De plus, le clivage du mannose terminal de la branche A (mannose A de la figure 16) est un évènement qui prévient la re-glycosylation du glycan par l'UGGT, ce qui exclus définitivement le peptide du cycle de la calnexine. La plus importante des mannosidases du RE est une α 1, 2-exomannosidase nommée ER-mannosidase I. Cette enzyme clive spécifiquement le

mannose terminal de la branche B du glycan central (mannose B de la Figure 16) pour former l'isomère B $\text{Man}_8\text{GlcNAc}_2$ (Herscovics, 2001). Bien que cette configuration de sucres est nécessaire pour diriger les protéines vers la voie de dégradation, elle n'est pas le seul déterminant puisque des protéines correctement repliées arborant cette conformation de glycan ne sont pas dégradées (Jakob *et al.*, 1998). L'isomère B $\text{Man}_8\text{GlcNAc}_2$ est reconnue par un groupe de protéines homologues aux mannosidases mais dépourvues d'activité exomannosidase nommées EDEM pour *ER-degradation-enhancing α -mannosidase-like protein*, dont trois membres ont été isolés à ce jour (EDEM 1-3) et dont la surexpression augmente significativement la dégradation des protéines mal repliées (Molinari *et al.*, 2003). Il est à noter que la perte de mannoses sur les branches B et C du glycan central affecte négativement l'efficacité des enzymes UGGT et glucosidase II (Grinna et Robbins, 1980; Sousa *et al.*, 1992), ce qui ralentirait la vitesse à laquelle les protéines en repliement réintègrent le cycle de la Cnx, donnant ainsi avantage aux EDEMs. De plus, il a été démontré par immunoprécipitation que les EDEMs étaient en complexe avec la Cnx (van Anken *et al.*, 2003), suggérant que celles-ci pourraient acquérir leur substrats directement de la lectine. Des études ont montré que certains substrats pour l'ERAD arboraient des configurations de sucres de type $\text{Man}_7\text{GlcNAc}_2$ et même $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$ (Cabral *et al.*, 2000; Ermonval *et al.*, 2000), suggérant la présence d'autres mannosidases résidentes du RE et, hypothétiquement, d'autres voies d'adressage à la dégradation. Des données récentes suggèrent que les protéines EDEMs auraient en fait une activité mannosidase et qu'elles pourraient agir comme chaperons moléculaires en empêchant l'agrégation des protéines destinées à la dégradation sans que l'on sache s'il y a un lien entre ces deux caractéristiques (Hirao *et al.*, 2006; Hosokawa *et al.*, 2006; Olivari *et al.*, 2006).

Les protéines vouées à l'ERAD subissent à peu-près toutes l'ubiquitinylation avant leur dégradation, un processus requérant l'action séquentielle d'un enzyme d'activation de l'ubiquitine (E1), un enzyme de conjugaison de l'ubiquitine (E2) et une ubiquitine ligase (E3) dont les sites catalytiques se retrouvent dans le cytoplasme. Les protéines solubles doivent donc être d'abord rétro-transloquées dans le cytosol pour subir l'ubiquitinylation tandis que les portions exposées au cytoplasme des protéines membranaires seraient la cible de cette modification post-traductionnelle (Nakatsukasa et Brodsky, 2008).

L'extraction des protéines défectueuses du RE implique leur passage à travers un canal et plusieurs évidences suggèrent que le translocon Sec61 pourrait être impliqué (Johnson et Haigh, 2000; Rapoport, 2007). D'autres études par contre suggèrent que le canal utilisé pour la rétro-translocation est distinct de Sec61 et serait formé de façon transitoire par l'assemblage de protéines membranaires s'associant spécifiquement aux substrats de l'ERAD (Erdmann et Schliebs, 2005). Une des protéines candidates pour ce rôle est Derlin-1 qui fut initialement décrite comme une protéine essentielle à la dégradation de deux protéines solubles (Knop *et al.*, 1996). Derlin-1 est retrouvé en complexe avec des facteurs membranaires et cytosoliques impliqués dans l'ERAD (Lilley et Ploegh, 2004; Ye *et al.*, 2004; Katiyar *et al.*, 2005; Lilley et Ploegh, 2005; Schulze *et al.*, 2005; Ye *et al.*, 2005).

Des études biochimiques ont démontré que la protéine Cdc48/P97 (ou P97/VCP), une AAA ATPase hexamérique, était responsable, avec certains co-facteurs, de l'extraction des protéines ubiquitinylées du RE vers le cytosol (Ye *et al.*, 2001; Ye *et al.*, 2003; Nakatsukasa *et al.*, 2008). Suite à cet évènement, une batterie de protéines liant les chaînes d'ubiquitines escortent les protéines vouées à l'ERAD de la membrane du RE vers le protéasome 26S. Une étude récente a démontré que les deux composantes de l'ERAD mentionnés ci-haut, soit Derlin-1 et P97/VCP, étaient impliquées dans le processus de dégradation du récepteur V2 sauvage et des trois mutants testés causant le DINc (Schwieger *et al.*, 2008).

La dégradation des substrats ubiquitinylés par le protéasome 26S, un complexe protéique composé de plus de 30 sous-unités, commence par la reconnaissance des chaînes d'ubiquitines liées aux lysines des protéines à dégrader par la particule de régulation 19S. Les glycans associés aux asparagines, encore présents à cette étape, sont clivés des protéines par des glycanases associées au protéasome juste avant leur dégradation (Suzuki *et al.*, 2000; Hirsch *et al.*, 2003).

5.4 Transport antérograde des RCPGs

L'information concernant le transport antérograde des RCPGs est plutôt rare et la prochaine section fait donc état des mécanismes généraux impliqués dans ce processus avec, en parallèle, avec les données se rapportant aux RCPGs.

Le transport hors du RE des protéines ayant répondues aux critères de qualité se fait au niveau de sites de sortie, où se forment des bourgeons qui seront recouverts par l'assemblage de la protéine manteau COPII (*coat protein II*) sous le contrôle de la GTPase Sar1p. La majorité des protéines qui sont libérées de la machinerie responsable du contrôle de qualité s'accumulent dans ces bourgeons (Barlowe, 2003). Une étude récente suggère que la sortie des RCPGs du RE serait aussi dépendante de Sar1p/COPII (Dong *et al.*, 2008). Des signaux se retrouvant au niveau de la queue C-terminale (exposés au cytoplasme), comme les motifs di-acidiques (D-x-E), les paires aromatiques (F-F, F-Y, Y-Y) ou hydrophobes (L-L ou I-L), fréquemment retrouvés chez les RCPGs (Dong *et al.*, 2007), seraient impliqués dans la liaison directe avec les composantes de COPII (Barlowe, 2003). Chez les mammifères, les protéines passant du RE vers l'appareil de Golgi traversent l'ERGIC où s'effectue un tri favorisant le transport antérograde ou rétrograde des protéines cargo. Ce système, sans que soit connus les déterminants responsables de la prise de décision, est donc un autre niveau de contrôle de qualité. Une étude a démontré que certains mutants du récepteur V2 retenus intracellulairement pouvaient atteindre l'ERGIC mais étaient par la suite retournés vers le RE (Hermosilla *et al.*, 2004). Le transport rétrograde est sous le contrôle des protéines de manteau COPI, des Rabs et des GTPases Arf (Appenzeller-Herzog et Hauri, 2006). Les vésicules quittant l'ERGIC sont donc soit transportées vers le Golgi ou retournées vers le RE selon le cargo qu'elles contiennent, l'isoforme Arf impliqué dans le recrutement du manteau et l'effecteur Rab présent. Deux Rabs sont principalement retrouvés au niveau de l'ERGIC, soit les Rab1 et 2 qui ont des fonctions opposées; Rab2 serait responsable de la formation des vésicules retournant au RE (Tisdale, 2003) tandis que les isoformes Rab1 sont impliquées dans la formation des vésicules voyageant du RE vers l'ERGIC et de l'ERGIC vers le cis-Golgi (Moyer *et al.*, 2001). Le transport des RCPGs à l'ERGIC a été démontré par des études

analysant l'effet des protéines Rab1 et 2 sur ce phénomène. En effet, le transport antérograde du récepteur AT1 ainsi que le récepteur β 2-adrénérique a été grandement atténué par la surexpression d'un dominant négatif de Rab1b et par sa suppression via des ARNs interférants (RNAi) (Wu *et al.*, 2003). Par contre, l'export du récepteur α 2b-adrénérique n'a pas été affecté par ces traitements, suggérant des voies de transport alternatives récepteurs-spécifiques.

L'appareil de Golgi est composé d'un empilement de citernes lipidiques et est subdivisé en quatre parties, soit le cis-Golgi, le Golgi médial, le trans-Golgi et le réseau trans-Golgien; les protéines qui empruntent cette voie entrent par le cis-Golgi pour émerger par le trans-Golgi. Les mécanismes impliqués dans le transport des cargos et enzymes à travers les différentes citernes du Golgi ne sont pas entièrement élucidés et les modèles présents sont conflictuels (Pfeffer, 2007). Une fois le réseau trans-Golgien atteint, les protéines cargo sont triées afin d'être dirigées vers leur site d'action, soit la membrane plasmique, les endosomes ou simplement retournées au RE. Certaines protéines qui ne répondent pas aux critères de qualité du Golgi seront ubiquitinylées puis dégradées par la voie lysosomiale après leur tri au niveau des endosomes par le système ESCRT (*endosomal sorting complex required for transport*) (Roxrud *et al.*, 2010).

Chaque citerne du réseau Golgien contient des glycosyltransférases responsables de la modification des N-glycans et de l'ajout et de la modification de sucres ajoutés aux sérines et thréonines, nommée O-glycosylation. Une étude sur la maturation du récepteur δ -opioïde, un RCPG, a montré que l'O-glycosylation ainsi que le traitement final des glycans liés aux asparagines ont lieu dans différents compartiments de l'appareil de Golgi (Petaja-Repo *et al.*, 2000).

Chapitre 6 : Maladies conformationnelles

Il est bien établi que des mutations génétiques ponctuelles affectant la composition en acides aminés d'une protéine peuvent perturber le processus de repliement et l'adoption d'une structure native (Dobson, 1999; Radford et Dobson, 1999; Sanders et Nagy, 2000; Forloni *et al.*, 2002). Des facteurs environnementaux, comme la température, un stress oxydatif ou l'activation de voies signalétiques associées au repliement des protéines et du contrôle de qualité, peuvent aussi affecter le repliement d'une protéine (Benjamin et McMillan, 1998; Dobson, 1999; Bucciantini *et al.*, 2002; Forman *et al.*, 2003), mais ces phénomènes sont souvent de nature transitoire. Une maladie dite 'conformationnelle' implique donc le mauvais repliement chronique d'une protéine, affectant sa maturation et/ou son adressage. Les conséquences de ces altérations structurales sont divisées en deux groupes; elles peuvent provoquer l'accumulation et l'agrégation des protéines mal repliées, qui deviennent alors toxiques pour la cellule (Selkoe, 2003) ou engendrer leur dégradation prématurée due à la 'bienveillance' du système de contrôle de qualité (Sitia et Braakman, 2003). Les pathologies d'intérêt de cette thèse, soit le DINc et le NSIAD, sont classées dans le deuxième groupe.

6.1 Agrégation

Plusieurs maladies en apparence différentes, incluant l'amyloïdose, la maladie aux prions et la maladie de Parkinson, peuvent être classées comme maladies conformationnelles puisqu'elles impliquent toutes un repliement inadéquat d'une protéine suivi de son agrégation (Carrell et Lomas, 1997; Walker et LeVine, 2000; Soto, 2001; Chiti et Dobson, 2006). Les points communs entre ces maladies est l'absence de domaines hélicaux chez les protéines susceptible de s'agrèger, qui sont plutôt sous forme de feuillets beta, et le fait qu'elles subissent plusieurs modifications post-traductionnelles. Le concept original des maladies conformationnelles a été développé en relation avec des désordres dont la caractéristique principale est l'accumulation d'agrégats de protéines intra- ou extracellulaires, comme pour la maladie de Parkinson,

l'Alzheimer ou la maladie d'Huntington. En plus des effets néfastes de l'accumulation d'agrégats protéiques, les conséquences physiologiques sont souvent exacerbées par la perte de fonction de la protéine impliquée. Les protéines sujettes à agrégation ont été divisées en quatre classes:

1-Les protéines dont la conformation native est plutôt non-structurée sont plus sujettes à l'auto-agrégation; ainsi, seule leur séquence en acides aminés les prédispose à ce phénomène. Souvent, certaines mutations, modifications post-traductionnelles ou la liaison d'un ligand peut augmenter la susceptibilité de ses protéines à l'agrégation. Un exemple d'une telle protéine est l' α -synucléine impliquée dans la maladie de Parkinson (Surguchov, 2008).

2-Les protéines qui deviennent sujettes à l'agrégation seulement après avoir subi une modification post-traductionnelle, telle la β -amyloïde, responsable de la maladie d'Alzheimer, qui est le produit du clivage de l'APP (*amyloid precursor protein*) par les β - et γ -sécrétases (Younkin, 1998).

3-Les protéines dont une ou plusieurs mutations les rendent susceptible à l'agrégation, telle la rhodopsine, impliquée dans la rétinite pigmentaire (Saliba *et al.*, 2002).

4-Les protéines qui acquièrent leur capacité d'agrégation suite au contact avec une protéine homologue possédant une conformation spécifique, telle la protéine prion (Prusiner, 1987).

6.2 Dégradation

La présence de mutations héréditaires ou acquises dans le gène de certaines protéines affecte leur repliement et peuvent entraîner leur dégradation via le protéasome suite à leur incapacité à répondre aux critères du système de contrôle de qualité du RE. Ainsi, l'absence de la protéine induit un phénotype de type perte de fonction. Dans certains cas, les mutations n'influencent que modestement le repliement, sans affecter l'intégrité fonctionnelle de la protéine en question (Bernier *et al.*, 2004) suggérant que l'extrême rigueur du système de contrôle de qualité peut parfois être néfaste. Comme mentionné précédemment, la majorité des mutations

faux-sens affectant le récepteur V2 induisent la rétention intracellulaire du récepteur et ceux-ci sont éventuellement dégradés avant d'avoir atteint la surface cellulaire (Morello et Bichet, 2001).

6.3 RCPGs et maladies conformationnelles

Plusieurs pathologies conformationnelles originent de mutations de gènes de RCPGs. C'est le cas de la forme autosomale dominante de rétinite pigmentosaire, dont la caractérisation fonctionnelle des mutants de rhodopsine causant la maladie a démontré que ces derniers étaient retenus au niveau du RE et s'accumulaient sous forme d'aggrégats, occasionnaient une dégénérescence des photorécepteurs (Sung *et al.*, 1991). Par la suite, on attribua la cause du DINC aux mutants de récepteurs V2 (Birnbaumer *et al.*, 1994; Tsukaguchi *et al.*, 1995; Wenkert *et al.*, 1996; Sadeghi *et al.*, 1997) dont la majeure partie sont retenus intracellulairement sans générer d'aggrégats. Plus récemment, l'hypogonadisme hypogonatotropique a été associée à des mutations dans le gène codant pour le récepteur au GnRH (*gonadotropin hormone-releasing hormone*) occasionnant son mauvais repliement (Janovick *et al.*, 2002; Ulloa-Aguirre *et al.*, 2004). Des mutants retenus intracellulairement ont aussi été décrits pour les récepteurs au LH (*lutheinizng hormone*), FSH (*follicule-stimulating hormone*) et TSH (*thyroid-stimulating hormone*) chez des patients mâles atteints de pseudo-hermaphrodisme (Gromoll *et al.*, 2002; Martens *et al.*, 2002), chez des femmes victime de dégénérescences ovariennes (Rannikko *et al.*, 2002; Meduri *et al.*, 2003) et dans des cas d'hypothyroïdisme congénital (Biebermann *et al.*, 1997; Costagliola *et al.*, 1999; Tonacchera *et al.*, 2000), respectivement. Des mutations amenant la perte de fonction du récepteur sensible au calcium (CaSR) ont été trouvées chez des patients souffrant d'hypercalcémie hypocalciurique familiale (D'Souza-Li *et al.*, 2002). Le récepteur de la mélanocortine de type 1 (MC1R) s'est avéré muté chez des patients avec des anomalies pigmentaires au niveau des cheveux et de la peau qui deviennent plus susceptible au cancer de la peau (Valverde *et al.*, 1996); des 60 mutations décrites, au moins quatre ont démontré induire une diminution de l'expression à la surface cellulaire (Beaumont *et al.*, 2005). La rétention intracellulaire de formes mutantes de deux autres récepteurs à la mélanocortine, soit les MC3R et MC4R, associés avec la régulation des dépôts graisseux et de l'homéostasie énergétique

respectivement, a été rapportée chez des patients atteints d'obésité morbide (Ho et MacKenzie, 1999; Tao et Segaloff, 2003; Rong *et al.*, 2006; Tao, 2007). Finalement, des mutations dans le gène codant pour le récepteur B de l'endothéline ont été détectées chez des patients atteints de la maladie de Hirshsprung ou du mégacôlon aganglionique (Tanaka *et al.*, 1998; Fuchs *et al.*, 2001). Bien qu'elles ne causent pas de maladie en soi, certaines mutations dans le gène du récepteur des chemokines de type 5 (CCR5) qui occasionnent sa rétention intracellulaire, confèrent une résistance à l'infection par le virus humain de l'immunodéficience (VIH) (Rana *et al.*, 1997).

Il est important de mentionner que dans certains cas, particulièrement pour les maladies héréditaires autosomales récessives, l'absence ou la diminution de l'expression du RCPG impliqué peut être amplifiée par un effet de dominance négative, soit par l'association du récepteur muté avec un récepteur sauvage; cet effet peut limiter ou éliminer l'expression du récepteur sauvage à la membrane plasmique et engendrer une pathologie de type 'perte de fonction' (Ulloa-Aguirre *et al.*, 2004). Dans le cas du récepteur V2, ce phénomène ne peut se produire puisque le gène codant pour le récepteur se retrouve sur le chromosome X et donc, seul un allèle est exprimé.

6.4 Chaperons chimiques et pharmacologiques

Des études ont démontré que certains composés pouvaient avoir un effet bénéfique sur le repliement et la maturation de protéines mutantes ou repliées inefficacement et, en fonction de leur mode d'action, ont été divisées en deux classes, soit les chaperons chimiques et pharmacologiques. Leur utilisation pour le traitement de maladies conformationnelles est prometteuse mais requiert toujours une caractérisation approfondie de leurs mécanismes d'action. Le tableau 1 donne une liste de maladies conformationnelles ainsi que des composés utilisés afin de promouvoir la maturation de la protéine impliquée dans chaque cas.

6.4.1 Chaperons chimiques

Les premières évidences suggérant que la maturation des protéines ayant un défaut de repliement pouvait être améliorée vient d'études effectuées sur le mutant $\Delta F508$ (délétion de la phénylalanine en position 508) du transporteur chlore CFTR (*Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator*), impliqué dans 90% des cas de mucoviscidose, plus communément appelée fibrose kystique. Le transporteur mutant est retenu par le système de contrôle de qualité du RE puis éventuellement dégradé par le protéasome (Skach, 2000). Il a été observé que l'abaissement de la température de croissance des cellules exprimant le mutant CFTR avait pour effet d'augmenter significativement le nombre de canaux fonctionnels à la membrane plasmique (Denning *et al.*, 1992). Ce résultat fut interprété comme un effet cinétique, en l'occurrence un ralentissement du processus de repliement de la protéine, favorisant l'adoption de la conformation native dotée du plus bas niveau d'énergie libre. À partir de cette observation, les effets de petits composés chimiques, tels que le diméthyl sulfoxyde (DMSO, solvant organique), le glycérol ou le triéthylamine N-oxyde (TMAO), déjà reconnus pour stabiliser la conformation native de plusieurs protéines contre la dénaturation thermique ou chimique, furent testés. Les effets sur le mutant $\Delta F508$ ont été convaincants, puisque ces traitements ont favorisé la maturation de la protéine mutante et sa fonction, et ce, au même niveau que la protéine sauvage (Brown *et al.*, 1996; Sato *et al.*, 1996).

Par la suite, l'utilisation de petites molécules pour pallier au mauvais repliement de protéines a été largement explorée. Ainsi, l'utilisation d'osmolytes perméables à la membrane plasmique a permis de rattraper *in-vitro* la fonction et/ou de diminuer l'agrégation de plusieurs protéines responsables de maladies conformationnelles (voir table 1) et ont été nommés chaperons chimiques. Les osmolytes sont de petites molécules non chargées ou zwitterioniques compatibles avec la majorité des macromolécules cellulaires, nommés aussi 'solutés compatibles'. Ils sont retrouvés chez plusieurs organismes exposés, dans leur environnement, à des concentrations élevées et variables en sels. Leur rôle biologique est d'augmenter la pression osmotique intracellulaire afin de protéger les organismes contre une pression osmotique externe élevée sans interférer avec le bon fonctionnement des protéines et, de surcroît, ils augmentent la stabilité des protéines. Les osmolytes n'interagissent pas physiquement avec les protéines (Bowlus et Somero, 1979; Arakawa et Timasheff, 1983; Arakawa et Timasheff, 1985), ce qui explique qu'ils n'affectent pas la fonction de ces dernières. L'augmentation de la stabilité des protéines en présence d'osmolytes serait un phénomène thermodynamique, soit une augmentation

de l'énergie libre des protéines due à une déshydratation partielle, favorisant ainsi la conformation native de ces dernières, puisqu'une protéine mal repliée détient un niveau d'entropie et une surface de contact plus élevées que la forme native (Bowlus et Somero, 1979; Arakawa et Timasheff, 1983; Arakawa et Timasheff, 1985) (Figure 18).

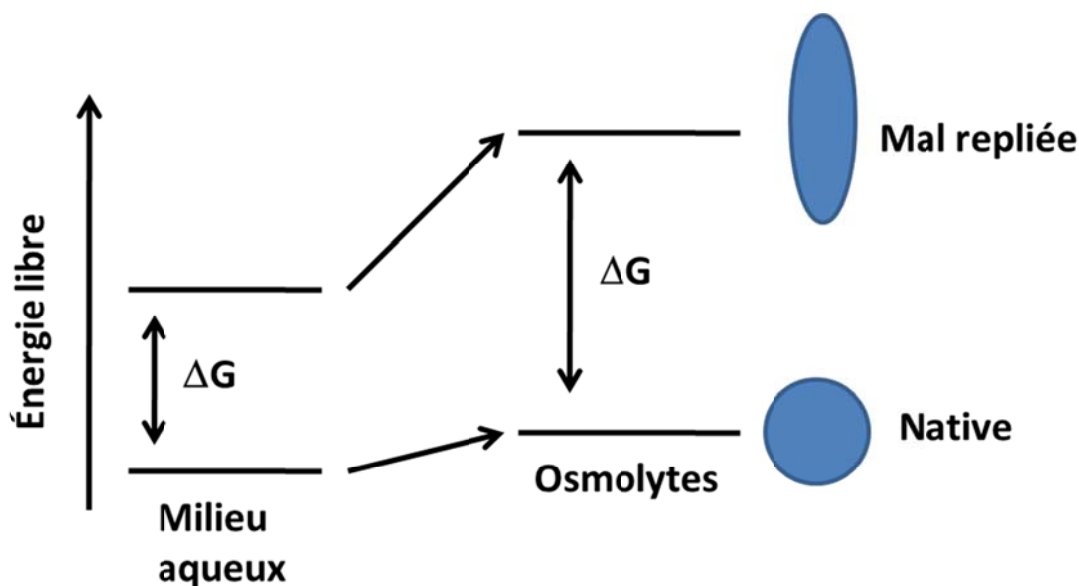


Figure 18: Schéma de l'effet thermodynamique des osmolytes sur la stabilité des protéines.

La présence d'osmolytes augmente l'énergie libre des protéines, ayant un plus grand effet sur les protéines mal repliées dues à une plus grande surface de contact, favorisant ainsi l'adoption de la conformation native lors du repliement. Inspiré de (Arakawa *et al.*, 2006)

L'effet positif des osmolytes sur le repliement des protéines pourrait aussi être indirect, par l'induction de la réponse au choc thermique (*heat shock response*) suite à l'augmentation de l'osmolarité intracellulaire, qui est reconnue pour induire l'expression de chaperons moléculaires favorisant le repliement des protéines (Diamant *et al.*, 2001).

Certaines molécules agissant comme chaperons chimiques ne sont pas des osmolytes. C'est le cas, entre autre, de l'oxyde de deutérium (eau lourde; D_2O) et du diméthyl sulfoxyde (DMSO). Les effets du D_2O sont probablement causés par une augmentation de la formation de liens hydrogènes à même le solvant, influençant ses propriétés, et le nombre de liens hydrogènes

sur les protons labiles des protéines (Arakawa *et al.*, 2006). Il est suggéré que les altérations physico-chimiques du solvant par le D₂O affectent l'hydratation des chaînes non-polaires et du même coup, favorise les interactions hydrophobes. Les effets du DMSO sont aussi non conventionnels puisque le DMSO n'est pas considéré comme un agent stabilisant pour les protéines. En fait, le DMSO est un agent dénaturant à hautes concentrations et augmente la température de dénaturation des protéines à faibles concentrations (Hamaguchi, 1964; Maurel, 1978; Porubcan *et al.*, 1978). À faibles concentrations, le DMSO est exclus de la surface des protéines et lie ces dernières par des interactions hydrophobes lorsque la concentration augmente. L'utilisation du DMSO à faibles concentrations pourrait être bénéfique au repliement des protéines en favorisant les interactions 'protéine mal repliée-chaperon moléculaire' puisqu'il a été démontré que la présence de DMSO favorise les interactions protéine-protéine (Himes *et al.*, 1977; Hamel *et al.*, 1991; Miegel *et al.*, 1996).

L'utilisation des chaperons chimiques *in-vivo* est problématique puisqu'ils requièrent de hautes concentrations afin d'être efficace, des niveaux souvent toxiques pour les cellules. Par ailleurs, leur manque de spécificité empêche toute utilisation thérapeutique dans le cadre d'essais cliniques. Une équipe a tout de même testé l'effet du TMAO et du glycérol sur un modèle de souris transgénique exprimant le mutant $\Delta F508$ du CFTR (Fischer *et al.*, 2001). Le glycérol s'est avéré trop toxique pour que la concentration sérique efficace soit atteinte. Pour le TMAO par contre, une concentration sérique de 50-100 mM a pu être obtenue par injection sous-cutanée, malgré une létalité de 50% des souris. À ces concentrations, une restauration partielle de l'activité du canal chlore a tout de même été obtenue.

Des stratégies permettant de concentrer les chaperons chimiques aux sites d'action sont par contre sur le point d'émerger. Un exemple élégant a été publié pour le traitement de la maladie d'Alzheimer qui, comme mentionné précédemment, implique la formation de plaques amyloïdes, formées par l'agrégation du produit de clivage de la protéine APP. Des inhibiteurs chimiques de cette agrégation sont connus mais, encore une fois, la concentration requise afin d'obtenir l'effet inhibiteur de la formation des plaques amyloïdes est souvent trop élevé pour qu'ils soient considérés comme outils thérapeutiques viables. L'équipe du Dr. Graef a récemment développé une molécule bi-fonctionnelle capable de se rendre au site d'action et de se lier à un

chaperon moléculaire qui la conduira à proximité des plaques amyloïdes. Dans cette stratégie, une des extrémités de la molécule est capable de se lier à la protéine FKBP (*FK506 binding protein*), une peptidyl prolyl cis-trans isomérase cytosolique exprimée de façon ubiquitaire chez les mammifères retrouvée en association avec les β -amyloïdes. L'autre extrémité de la molécule qui n'interagit pas avec FKBP a été conjuguée au Congo Red (acide benzidinediazo-bis-1-naphtylamine-4-sulfonique), un composé reconnu pour interagir et favoriser la dégradation des β -amyloïdes; ainsi, FKBP agit comme cheval de Troie. Grâce à cette stratégie, ils ont été capables de concentrer l'agent inhibiteur des fibrilles β -amyloïdes à leur site d'action. Les concentrations de Congo Red nécessaires à la dégradation des fibrilles sont ainsi passées de 2-20 μ M à 50 nM. Cette stratégie s'est avérée efficace *in-vitro* et dans un modèle cellulaire (Gestwicki et al., 2004). Bien sûr, le Congo Red ne répond pas aux critères de chaperon chimique puisqu'il ne favorise pas la maturation d'une protéine mais bien sa dégradation. Une approche semblable pourrait toutefois être applicable à certains chaperons chimiques.

6.4.2 Chaperons pharmacologiques

Le concept de chaperon pharmacologique découle de l'idée qu'une mutation dans une protéine n'entraîne pas nécessairement une perte de fonction irréversible, à condition que l'altération créée par la mutation puisse être "sélectivement compensée" (Mendre et Mouillac, 2010). En effet, plusieurs protéines mutées sont potentiellement actives, mais sont tout simplement rejetées par le contrôle de qualité du RE. Les succès obtenus avec les chaperons chimiques ont conduit les scientifiques à rechercher des molécules ayant une plus grande spécificité d'action afin d'élaborer des traitements pour les maladies conformationnelles applicable *in-vivo*. Les premières données concluantes sont venues d'une étude réalisée à l'aide de mutations artificielles du gène de résistance multidrogues (MDR1; *multidrug resistance gene 1*) codant pour un transporteur membranaire, la P-glycoprotéine 1 (Loo et Clarke, 1997). Certains mutants de P-glycoprotéine 1 sont retenus dans le RE, mais un traitement à l'aide de substrats (vinblastine et capsaïcine) ou d'inhibiteurs (cyclosporine et verapamil) de l'enzyme, apte à traverser les membranes lipidiques, a favorisé leur maturation et leur transport la membrane

plasmique accompagné d'une récupération de fonction. Les auteurs de ce travail ont proposé que l'occupation du site actif du transporteur par des composés spécifiques avait pour effet de stabiliser un état conformationnel quasi-natif conforme aux critères du système de contrôle de qualité du RE (Loo et Clarke, 1999). L'année suivante, les Dr Bichet et Bouvier ont obtenus le même succès avec plusieurs mutants occasionnant le DINC, en utilisant des antagonistes du récepteur V2 perméables aux membranes (Morello *et al.*, 2000).

La spécificité d'action des chaperons pharmacologique est facilement envisageable pour les protéines qui ont la propriété de lier des molécules, tel les canaux, récepteurs et enzymes et ces dernières ont souvent une pharmacopée bien établie. La possibilité d'utiliser une stratégie semblable aux protéines mutantes dépourvues de sites de liaison spécifiques est tout de même possible mais requiert un effort supplémentaire de criblage afin de trouver des molécules se liant spécifiquement aux protéines d'intérêt. Certains exemples existent déjà dans la littérature, comme pour les transporteurs CFTR (Dormer *et al.*, 2001; Galiotta *et al.*, 2001; McPherson *et al.*, 2001; Suen *et al.*, 2006) et MNK (*Menke protein*) (Kim *et al.*, 2002) et le facteur de transcription p53 (Foster *et al.*, 1999). Dans tout les cas, une récupération fonctionnelle des protéines mutantes a été obtenue suite au traitement avec les chaperons pharmacologiques spécifiques utilisés.

La liaison directe de composés pharmacologiques (substrats, inhibiteurs, ligands) à des formes mutantes de protéines mal repliées favorisant leur maturation implique un mode d'action clairement différent de celui des chaperons chimiques; ces dernières changent les propriétés physicochimiques de l'environnement de la protéine en repliement tandis que le chaperon pharmacologique agit directement et spécifiquement sur celle-ci. Le mécanisme précis d'action des chaperons pharmacologiques reste élitif mais plusieurs hypothèses peuvent être émises. Le fait que le composé utilisé comme chaperon pharmacologique est apte à se lier de façon spécifique à la protéine mal repliée suggère que le site de liaison de cette dernière a tout de même atteint une conformation avancée; ainsi, on pourrait suggérer que l'occupation du site actif par le chaperon pharmacologique lui confère une certaine stabilité/rigidité, ce qui diminuerait l'entropie de la protéine mutante en voie de maturation, comme initialement suggéré par Loo et Clarke (1999). Dans ce sens, des études utilisant des inhibiteurs de la synthèse protéique (cycloheximine et monensine) sur les récepteurs mutants du GnRH humains (Janovick *et al.*, 2003) et V2 murins

(Wuller *et al.*, 2004) ont montré que les chaperons pharmacologiques étaient aptes à rattraper les récepteurs retenus déjà synthétisés, suggérant que l'effet des chaperons pharmacologiques sur la maturation des protéines est un événement post-traductionnel. Certains ont suggéré que le ligand pouvait agir comme 'gabarit' et que la protéine visée pourrait se replier autour du chaperon pharmacologique. Une autre hypothèse qui, à notre connaissance, n'a pas été soulevée dans la littérature est la possibilité que l'occupation du site actif de la protéine en repliement empêche certains chaperons moléculaires de s'associer à ce domaine de la protéine, soit un phénomène d'encombrement stérique; ainsi une diminution des interactions avec les chaperons moléculaires en présence de chaperons pharmacologiques pourrait contribuer à diminuer l'efficacité de rétention des protéines mutantes au niveau du RE, facilitant leur progression le long de la voie de sécrétion.

Les maladies conformationnelles les plus propices à bénéficier du développement de chaperons pharmacologiques sont sans contredit les maladies liées aux désordres de stockage lysosomiaux (*lysosomal storage disorders*) ou LSDs. Les LSDs sont un groupe de pathologies résultant du métabolisme anormal de macrosubstances, tel les glycosphingolipides, le glycogène, les mucopolysaccharides et les glycoprotéines (Winchester *et al.*, 2000). Une carence au niveau des enzymes ou activateurs responsables de la dégradation de ces substances entraîne leur accumulation massive au niveau des lysosomes de plusieurs types cellulaires, ce qui occasionne des réponses inflammatoires secondaires et des dommages aux cellules pouvant mener à une dysfonction tissulaire. Plus de 50 pathologies de ce genre ont été identifiées et la sévérité de la maladie serait liée à l'activité résiduelle de l'enzyme affectée. La prévalence des LSDs est estimée à 1 sur 7700 à 13000 naissances (Santavuori, 1988; Meikle *et al.*, 1999; Rider et Rider, 1999), la maladie de Gaucher étant la plus commune des LSDs, affectant environ 10000 individus dans les pays industrialisés. Les traitements actuels sont les thérapies de remplacement d'enzyme, la transplantation de moelle osseuse et des thérapies de réduction de substrats. Il y a aussi un potentiel pour des thérapies géniques et à base de cellules souches qui sont présentement évaluées (Fan, 2008). Un avantage de l'utilisation de chaperons pharmacologiques pour ce type de pathologie réside dans le fait que l'accumulation des macrosubstances peut être contrecarrée avec une relativement faible activité enzymatique, soit environ 5-10% des niveaux retrouvés chez

un individu sain (Leinekugel *et al.*, 1992; Schueler *et al.*, 2004); ainsi une récupération fonctionnelle très partielle peut être suffisante pour réduire considérablement le développement et les symptômes de la maladie. La première utilisation de chaperon pharmacologique chez l'homme fut dans le cadre de la maladie de Fabry, une pathologie héréditaire du métabolisme des glycosphingolipides, de transmission récessive liée au chromosome X, dont la caractéristique est un déficit en l'enzyme α -galactosidase A lysosomiale (Germain, 2005). Ainsi, les auteurs ont rapporté une augmentation de l'activité de l'enzyme et une amélioration des symptômes cliniques chez un patient après infusion avec du galactose (Frustaci *et al.*, 2001). Depuis, plusieurs études cliniques impliquant les chaperons pharmacologiques pour le traitement de LSDs ont été approuvées par la Food and Drug Administration (FDA) (Fan, 2008). Pour les enzymes, le site catalytique est le domaine préférentiellement ciblé par les chaperons pharmacologiques puisque celui-ci est généralement bien structuré et est souvent au centre de la protéine. Bien que contre intuitif, les chaperons pharmacologiques en développement pour le traitement des LSDs sont généralement des inhibiteurs compétitifs de l'enzyme ciblé car ils ont une haute affinité pour le domaine catalytique (Fan, 2008). Une fois le complexe enzyme/inhibiteur rendu à son site d'action, l'inhibiteur peut être remplacé par le substrat naturel, qui se retrouve normalement à de hautes concentrations dans le compartiment de destination de l'enzyme. Cette dernière caractéristique est un autre point en faveur de l'utilisation des chaperons pharmacologiques pour le traitement des LSDs puisque l'échange dynamique entre l'inhibiteur compétitif et le substrat de l'enzyme est dicté par la concentration relative des deux molécules.

6.4.2.1 Chaperons pharmacologiques et RCPGs

L'utilisation de chaperons pharmacologiques dans des pathologies impliquant des RCPGs origine de l'idée que des ligands de récepteurs connus pour stabiliser une conformation spécifique (active, inactive) pourraient être utilisés sur des formes mutantes de RCPGs responsables de maladies génétiques, qui sont reconnues comme défectueuses par le système de contrôle de qualité et séquestrées dans le RE (Figure 19). Cette hypothèse fut initialement couronnée de succès par l'utilisation d'antagonistes non-peptidiques du récepteur V2 dans le

cadre de l'étude de mutations occasionnant le DINc (Morello *et al.*, 2000). Des antagonistes spécifiques, tels que le SR121463, le SR49059, ou le VPA985 qui, de part leur nature hydrophobe, sont apte à traverser les membranes cellulaires, ont favorisé la maturation des mutants testés, leur ciblage à la membrane plasmique et une récupération fonctionnelle, en l'occurrence leur capacité à induire une production d'AMPc suite à une stimulation à l'AVP. Ces effets n'ont pu être reproduits à l'aide d'antagonistes peptidiques incapables de traverser les membranes cellulaires, ce qui invalidait l'hypothèse que l'effet observé n'ait été qu'une stabilisation des récepteurs déjà présents à la membrane plasmique. Par des études de marquage métabolique, ils ont aussi montré que les chaperons pharmacologiques favorisaient la maturation des formes immatures des récepteurs mutants, confirmant que le site d'action était bel et bien le RE. Suite à cette réussite, la première étude clinique impliquant l'utilisation de chaperons pharmacologiques sur un RCPG mutant a été réalisée chez 5 patients atteints de DINc et porteurs des mutations R137H (3 patients), W164S et del62-64 (deletion des acides aminés 62 à 64) (Bernier *et al.*, 2006). Ces patients ont été traités au relcovaptan (SR949059) à raison de trois doses administrées oralement pendant deux jours consécutifs. Bien qu'il y ait eu des variations inter-patients, une réduction du volume urinaire moyen quotidien a été observée (de 11,9 L à 8,2 L/jour) en combinaison avec une augmentation de l'osmolarité urinaire (de 98 à 170 mOsm/kg) et une réduction de la prise d'eau. Un traitement sur sept jours chez un des patients a permis de pratiquement doubler son osmolarité urinaire de base pour atteindre 450 mOsm/kg. Même si ce niveau est bien en deça des capacités de concentration urinaire chez un individu sain, il s'est traduit par une réduction du volume urinaire et de la prise d'eau d'environ 50%, montrant clairement que ces composés sont prometteurs pour améliorer la qualité de vie des patients atteints de DINc. À ce jour, l'efficacité des chaperons pharmacologiques a été testée et validée *in-vitro* sur plusieurs autres formes mutantes de RCPGs, dont le récepteur sensible au calcium (CaSR) (Rus *et al.*, 2008), smoothed (Chen *et al.*, 2002), GnrH (Finch *et al.*, 2008), rhodopsine (Noorwez *et al.*, 2003), MC4 (Rene *et al.*, 2010), FSHR (Janovick *et al.*, 2009) et le récepteur δ -opioïde (Leskela *et al.*, 2007).

La récupération de fonction d'un RCPG mutant dépend de la mutation elle-même et de l'effet général qu'elle provoque sur la conformation globale. Ainsi, certains mutants resteront rébarbatifs aux traitements, mais en règle générale, une majorité de mutants répondent favorablement (Morello *et al.*, 2000; Wuller *et al.*, 2004; Robben *et al.*, 2007). De plus, le niveau

de récupération varie d'un mutant à l'autre, probablement selon le niveau de sévérité de la défectuosité structurale et du site muté (Wuller *et al.*, 2004). Finalement, l'efficacité de récupération d'un mutant donné peut varier en fonction du chaperon pharmacologique utilisé (Robben *et al.*, 2007; Rene *et al.*, 2010). La variabilité dans l'efficacité de récupération d'un mutant donné par différents chaperons pharmacologiques pourrait être causée par des modes de liaison différentiels. Ainsi, des interactions entre certains résidus de la poche de liaison du récepteur et le ligand pourraient être plus favorables que d'autres à promouvoir le repliement ou à stabiliser une conformation quasi-native d'un mutant donné.

Il est à noter que l'utilisation des chaperons pharmacologiques pour promouvoir la maturation des RCPGs peut s'appliquer aux récepteurs qui ne sont pas nécessairement mutés mais dont l'efficacité de maturation de la forme sauvage est tout de même inefficace, comme décrit précédemment pour le récepteur δ -opioïde (Petaja-Repo *et al.*, 2000) ainsi que pour le récepteur de la dopamine D4 (Van Craenenbroeck *et al.*, 2005). Ainsi, la possibilité de moduler pharmacologiquement les niveaux d'expression de certains RCPGs offre un autre niveau de régulation de leur activité qui pourrait être utilisé afin de contrôler l'amplitude de la réponse cellulaire dans un contexte thérapeutique (Petaja-Repo *et al.*, 2002).

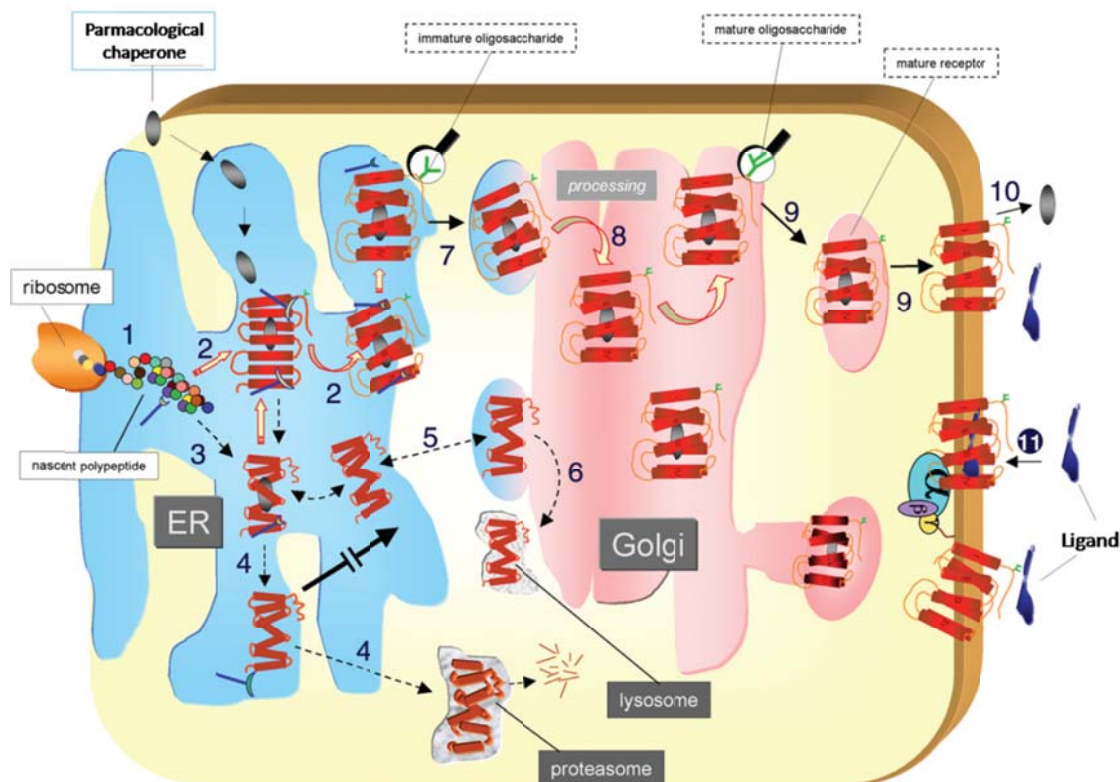


Figure 19: Mécanisme d'action suggéré des chaperons pharmacologiques sur la récupération fonctionnelle des RCPGs.

Les peptides nouvellement synthétisés passent à la lumière du RE via le translocon (étape 1). Le repliement des RCPGs est facilité par leur interaction avec les chaperons moléculaires résidents du RE (étape 2). Les récepteurs mal repliés ou improprement oligomérisés sont retenus dans le RE où plusieurs tentatives de repliement ont lieu (étape 3). Les récepteurs n'ayant toujours pas atteint leur conformation native sont retournés au cytosol après leur dissociation des chaperons moléculaires afin d'être dégradés par le protéasome (étape 4). Alternativement, certains RCPGs défectueux sont exportés au Golgi puis rétro-transloqués vers le RE ou possiblement d'autres tentatives de repliement seront effectuées (étape 5) ou redirigés vers les lysosomes afin d'être dégradés (étape 6). Les protéines correctement repliées sont transportées au Golgi (étape 7) où le processus de maturation (e.g. glycosylation) est complété (étape 8). Les récepteurs matures sont ensuite transportés à la membrane plasmique (étape 9). En présence de chaperons pharmacologiques, le repliement et l'assemblage du récepteur mutant sont facilités tôt dans le processus biosynthétique et lui permet d'échapper à la dégradation et poursuivre sa maturation

jusqu'à son site d'action. Une fois sa destination atteinte, le récepteur réchappé peut interagir avec son ligand (étape 11) suite à la dissociation du chaperon pharmacologique du site actif (étape 10). Tiré de (Ulloa-Aguirre *et al.*, 2004)

6.4.2.1.1 Caractéristiques des chaperons pharmacologiques spécifiques aux RCPGs

La grande majorité des chaperons pharmacologiques de RCPGs décrits à ce jour sont des antagonistes. Ces chaperons pharmacologiques possèdent la capacité de traverser les membranes cellulaires et d'atteindre leurs protéines cibles retenues dans le RE ou autre compartiment intracellulaire; ces molécules sont donc de nature lipophile. Il semblerait exister une corrélation entre l'affinité du chaperon pharmacologique pour le récepteur et sa capacité à promouvoir sa maturation (Robben *et al.*, 2007): Plus l'affinité est forte, plus l'effet serait important. Une haute affinité n'est, par contre, pas un critère avantageux pour les antagonistes puisque la récupération de fonction est un équilibre subtil entre la propriété chaperon et la possibilité d'être remplacé par le ligand endogène du récepteur (Mendre et Mouillac, 2010). Il semblerait donc que les chaperons pharmacologiques antagonistes possédant une affinité modérée pour leur cible soient plus appropriés dans un contexte thérapeutique (Robben *et al.*, 2007). Dans le cas du récepteur V2, plusieurs antagonistes non-peptidiques se sont avérés efficace à promouvoir la maturation de mutants causant le DINc. C'est le cas des composés de la famille des vaptans, soit le SR121463 (satavaptan), VPA-985 (lixivaptan), OPC-41061 (tolvaptan), OPC-31260 (mozavaptan), SR49059 (relcovaptan), et YM087 (conivaptan) (Morello *et al.*, 2000; Bernier *et al.*, 2006; Robben *et al.*, 2007).

Bien que les exemples sont plutôt rares, les chaperons pharmacologiques agonistes seraient plus prometteurs puisqu'ils combinent la capacité de cibler les récepteurs mal repliés à la surface et celle de les activer directement; dans ce cas, une forte affinité serait un avantage. L'utilisation d'agonistes présente toutefois des inconvénients puisqu'ils provoquent la désensibilisation et l'internalisation du récepteur ciblé. Une fois le récepteur internalisé, il n'est plus accessible au ligand(s) activateur(s) endogène(s). Des agonistes agissant sur le récepteur δ -opioïde sauvage et mutant (D95A) possédant des propriétés chaperon pharmacologique ont été

décrits, mais ils ont également la propriété d'induire l'internalisation des récepteurs via les β -arrestines (Petaja-Repo *et al.*, 2002).

La découverte récente d'agonistes biaisés du V2R offre une nouvelle opportunité thérapeutique du DINc (Jean-Alphonse *et al.*, 2009). En l'occurrence, les chaperons pharmacologiques MCF14, MCF18 et MCF57 provoquent l'activation de la protéine $G\alpha_s$, sans entraîner l'internalisation du récepteur. Ils offrent donc un avantage face aux agonistes classiques et aux antagonistes, tout en conservant une forte affinité envers le V2R. La combinaison de ces caractéristiques semble favorable pour traiter les patients du DINc puisque ces molécules induisent effectivement le ciblage de mutants du V2R à la surface cellulaire tout en activant le récepteur (Jean-Alphonse *et al.*, 2009). Enfin, les modulateurs allostériques pourraient également se révéler des chaperons pharmacologiques prometteurs. Ces molécules ont un site d'interaction différent de celui du substrat naturel (pour les enzymes) ou du ligand endogène (pour les récepteurs ou les canaux ioniques). Par sa liaison à la protéine, le modulateur allostérique entraîne un changement conformationnel, ce qui peut avoir une influence positive ou négative sur la liaison de celle de l'activateur (ligand, substrat), sur la nature ou l'intensité de l'effet biologique induit par la protéine, ou sur les deux. Par contre, le fait que le modulateur allostérique induit un changement conformationnel altérant les propriétés intrinsèques du récepteur n'offre aucune garantie quant à sa capacité à favoriser ou stabiliser la structure native de la protéine en repliement. À ce jour, il n'y a qu'un exemple de modulateur allostérique positif combinant également l'activité de chaperon pharmacologique. Cette molécule est spécifique au récepteur de l'hormone FSH (*follicule stimulating hormone*) (Janovick *et al.*, 2009). Le FSH et son récepteur participent à la régulation de la maturation des follicules ovariens chez la femme et contrôlent la spermatogénèse chez l'homme. Plusieurs mutations du récepteur FSH ont été découvertes et sont la cause de plusieurs troubles endocriniens. Ainsi, le composé allostérique (Org41841, famille des thienopyr(im)idines) favorise l'acheminement du récepteur mutant à la surface cellulaire tout en potentialisant la réponse cellulaire induite par la liaison du FSH au récepteur réchappé.

Tableau I: Maladies conformationnelles et chaperons*:

Maladie	Protéine impliquée	Conséquence du défaut de repliement	Chaperon(s)	Référence
Rétinite pigmentosa	Rhodopsine	Agrégation	11-cis 2 7-ring retinal	(Noorwez <i>et al.</i> , 2003)
Diabète insipide néphrogénique	Récepteur V2	Dégradation	SR121463, VPA-985	(Morello <i>et al.</i> , 2000)
Hypogonadisme hypogonadotrope	Récepteur du GnRH	Dégradation	IN3	(Finch <i>et al.</i> , 2008)
Obésité morbide	Récepteurs à la mélanocortine de type 4	Dégradation	4-PB, MTHP, PPPone, MPC1, DCPMP, NBP	(Granell <i>et al.</i> , 2010; Rene <i>et al.</i> , 2010)
Hypercalcémie hypocalciurique	Récepteur sensible au calcium (CaSR)	Dégradation	NPS R-568	(Rus <i>et al.</i> , 2008)
Hyperparathyroïdisme Gaucher	Glucocérébrosidase	Dégradation	N-(n-nonyl)deoxynojirimycin	(Sawkar <i>et al.</i> , 2002)
Fabry	α -galactosidase A	Dégradation	Galactose, 1-deoxy-galactonojirimycine	(Fan <i>et al.</i> , 1999; Frustaci <i>et al.</i> , 2001)
Pompe	α -glucosidase acide	Dégradation	Dérivés de deoxynojirimycine	(Okumiya <i>et al.</i> , 2007)
Tay-Sachs	β -hexosaminidase A	Dégradation	Priméthamine, N-acetyl glucosamine thiazoline	(Tropak <i>et al.</i> , 2007)
Menkes	Protéine Menkes	Dégradation	Cuivre	(Kim <i>et al.</i> , 2002)
Fibrose Kystique	CFTR	Dégradation	Glycerol, DMSO TMAO, 4-PB, compose limonoïde (TS3), VRT325,	(Brown <i>et al.</i> , 1996; Sato <i>et al.</i> , 1996; Rubenstein et Zeitlin, 1998; deCarvalho <i>et al.</i> , 2002; Howard et Welch, 2002)
Déficience en α 1-antitrypsine	α 1-antitrypsine	Dégradation	Glycerol, 4-PB	(Burrows <i>et al.</i> , 2000)
Hypercholestérolémie familiale	Récepteur aux LDL	Dégradation	4-PB	(Tveten <i>et al.</i> , 2007)
Diabète Insipide congénital	Aquaporine 2	Dégradation	Glycerol, TMAO, DMSO	(Tamarappoo <i>et al.</i> , 1999)
Albinisme	Tyrosinase	Dégradation	DOPA, tyrosine	(Halaban <i>et al.</i> , 2001)
Huntington	Huntingtine	Agrégation	Trehalose	(Tanaka <i>et al.</i> , 2005)
Machado-Joseph	Ataxine-3	Agrégation	Glycerol, TMAO, DMSO	(Yoshida <i>et al.</i> , 2002)
Parkinson	α -synucléine	Agrégation	TMAO	(Uversky <i>et al.</i> , 2001)
Creutzfeldt-Jakob	Prion	Agrégation	Analogues d'acridine	(Korth <i>et al.</i> , 2001; Ryou <i>et al.</i> , 2003)
Alzheimer	β -amyloïde	Agrégation	TMAO, Glycerol, CongoRed	(Yang <i>et al.</i> , 1999; Gestwicki <i>et al.</i> , 2004)
Amyloïdose polyneuropathique familiale	Transthyretine	Agrégation	Thyroxine et ligands	(Hammarstrom <i>et al.</i> , 2003)
Homocystinurie	Cistathionine β -synthétase	Dégradation	TMAO, sorbitol, glycerol, proline, DMSO	(Singh <i>et al.</i> , 2007)
Phénylkétonurie	Phénylalanine hydroxylase	Dégradation	Glycerol	(Leandro <i>et al.</i> , 2001)
Maladie du sirop d'érable	α -ketoacide carboxylase	Dégradation	TMAO	(Song et Chuang, 2001)
Cancer	p53	Dégradation	Glycerol, TMAO, D ₂ O, ellipticine, CP-321398, PRIMA-1 diazoxide	(Foster <i>et al.</i> , 1999; Peng <i>et al.</i> , 2003)
Hyperglycémie hyperinsulémique	Récepteur sulfonyleurée SUR1	Dégradation		(Partridge <i>et al.</i> , 2001)
Cancer	Smoothened	Dégradation	Cyclopamine	(Chen <i>et al.</i> ,

Syndrome du QT long	Canal potassium HERG	Dégradation	Cisapride, astemizole	E-4031,	2002) (Curran <i>et al.</i> , 1995)
---------------------	----------------------	-------------	--------------------------	---------	---

*: Lorsque qu'en rouge, il s'agit d'un chaperon pharmacologique tandis que les chaperons chimiques sont en noir. Abréviations communes: DMSO, diméthyl sulfoxyde; TMAO, triméthylamine-N-oxide; 4-PB, 4-phényl butyrate.

Cette introduction a mis en place les éléments cruciaux traités dans les résultats de cette thèse. En résumé, les mutations affectant le récepteur V2, membre de la famille des RCPGs, sont responsables de deux pathologies distinctes affectant l'homéostasie hydrique, soit le DINc et le NSIAD. De part sa découverte récente, le NSIAD est encore peu caractérisé. Dans le cas du DINc, la majeure partie des mutations affectent le repliement et la conformation du récepteur, ce qui mène à leur rétention intracellulaire par le système de contrôle de qualité de RE et éventuellement, à leur dégradation. Cette dernière caractéristique définit la majeure partie des cas de DINc comme maladie conformationnelle. Une percée majeure dans le traitement des maladies conformationnelles fut réalisée par des études démontrant que des récepteurs V2 mutants retenus intracellulairement pouvaient être 'réchappés' par des ligands spécifiques perméables aux membranes, nommés chaperon pharmacologiques. Bien que prometteur, les mécanismes d'action des chaperons pharmacologiques restent élusifs.

OBJECTIFS DE LA THÈSE

L'objectif général de cette thèse consiste à mieux comprendre l'impact de différentes mutations génétiques sur l'ontologie et la physiologie du récepteur V2 et à évaluer le potentiel thérapeutique des chaperons pharmacologiques pour le traitement de maladies conformationnelles impliquant des RCPGs. Un volet 'mécanistique' tente aussi d'éclaircir le mécanisme d'action des chaperons pharmacologiques sur la maturation des protéines mal repliées.

Objectifs spécifiques :

- 1) Déterminer les effets de la substitution V88M sur la biologie du récepteur V2 et expliquer la variabilité phénotypique observée chez les patients porteurs de cette substitution.
- 2) Comparer les effets de substitutions sur le résidu R137 sur la biologie du récepteur V2 et expliquer les conséquences cliniques (DINc vs NSIAD). Évaluer le potentiel des chaperons pharmacologiques sur ces dernières.
- 3) Analyser l'impact d'une nouvelle mutation occasionnant un phénotype 'gain de fonction' sur la physiologie du récepteur V2 et évaluer différentes approches thérapeutiques.
- 4) Déterminer l'importance du système de contrôle de qualité du RE basé sur les N-glycans dans la rétention intracellulaire de mutants du récepteur V2 ainsi que l'impact de ceux-ci sur les mécanismes d'action des chaperons pharmacologiques.

RÉSULTATS

ARTICLE 1

Vasopressin Type 2 Receptor V88M Mutation: Molecular Basis of Partial and Complete Nephrogenic Diabetes Insipidus

Bockenbauer D, Carpentier E, Rochdi D, Van't Hoff W, Breton B, Bernier V, Bouvier M et Bichet DG. 2010. Publié dans *Nephron Physiol.* 114(1) : 1-10

Contexte/Objectifs: La forme récessive liée au chromosome X du diabète insipidus néphrogénique (DIN) est associée à des mutations dans le gène *AVPR2* codant pour le récepteur de la vasopressine de type 2. Dans cette étude, nous rapportons l'historique clinique de membres d'une famille possédant la mutation c.262G (p.V88M). Cette mutation récurrente a été précédemment rapportée pour induire une perte de fonction du récepteur et pourtant, des osmolarités urinaire atteignant 570 mOsm/kg ont été observées chez certains patients dans notre étude. Nous nous sommes donc penchés sur la variabilité phénotypique clinique et ses fondements moléculaires. *Méthodes:* Analyses rétrospectives des données cliniques et caractérisation *in-vitro* des récepteurs sauvage et mutant. *Résultats:* Les données cliniques étaient disponibles pour six patients. Quatre d'entre eux ont démontré une augmentation substantielle de leur concentration urinaire après traitement à la desmopressine (1-desamino[8-D-arginine] vasopressine), en accord avec une forme partielle de DIN, tandis que les deux autres n'ont pas répondu au traitement. Une caractérisation biochimique a révélé que la mutation V88M occasionnait une diminution de l'expression de surface du récepteur mutant et une baisse d'affinité pour l'arginine-vasopressine, affectant ainsi sa capacité signalétique. Un traitement au chaperon pharmacologique (SR121463) a eu pour effet d'augmenter la maturation et l'expression de surface du récepteur mutant. *Conclusion:* La mutation V88M est associée avec une diversité phénotypique et la source de cette diversité est en lien avec l'effet combiné de la faible expression de surface et de la baisse d'affinité du récepteur pour son ligand naturel. Nos résultats fournissent une base rationnelle pour l'utilisation d'analogues de vasopressine en combinaison

avec des chaperons pharmacologiques lors de l'évaluation de traitements chez les patients atteints de cette mutation.

Ma participation en temps que co-premier auteur sur cet article a impliquée la conception et l'exécution des expériences visant la caractérisation fonctionnelle du récepteur mutant. J'ai aussi écrit le premier jet de l'article et participé intensivement à la révision du manuscrit.

Vasopressin type 2 receptor V88M mutation: molecular basis of partial and complete nephrogenic diabetes insipidus

Running title: Partial NDI with V88M mutated V2 receptor

Authors: Detlef Bockenhauer^{1*}, **Eric Carpentier^{2*}**, Driss Rochdi², W. van't Hoff¹, Billy Breton², Virginie Bernier², Michel Bouvier², Daniel G. Bichet³

Institutions: 1) Great Ormond Street Hospital for Children NHS Trust 2) Department of Biochemistry and Groupe de recherche universitaire sur le médicament, Institute of Research in Immunology and Cancer, Université de Montréal 3) Department of Medicine and Physiology, Université de Montréal, and Unité de recherche clinique, Centre de recherche et Service de néphrologie, Hôpital du Sacré-Coeur de Montréal, Québec, Canada

***These authors have contributed equally to this work.**

Corresponding author

Detlef Bockenhauer

Consultant Paediatric Nephrologist

Great Ormond Street Hospital for Children NHS Trust

Great Ormond Street

London WC1N 3JH

Key words: nephrogenic diabetes insipidus; vasopressin receptor type 2; polyuria; pharmacological chaperone, vasopressin

Abstract

Background/Aims: Mutations in the type-2 vasopressin receptor gene (*AVPR2*) underlie X-linked recessive nephrogenic diabetes insipidus (NDI). Here, we report a family with an *AVPR2* mutation gene, c.262G>A; p.V88M. This recurrently identified mutation was previously shown to abolish AVPR2 function, yet in some affected members, urine osmolalities of up to 570 mosm/kg were observed. We detail the variable clinical phenotype and investigate its molecular basis.

Methods: Retrospective analysis of clinical data and in vitro assessment of wild type and V88M-mutant receptor.

Results: Clinical data were available on six patients. Four of these demonstrated a substantial increase in urinary concentration after 1-desamino[8-D-arginine] vasopressin (DDAVP), consistent with partial NDI, whilst two did not respond. In vitro analysis revealed a reduced cell surface expression and decreased binding affinity for arginine-vasopressin of the mutant receptor, leading to blunted signalling activity. Treatment with the pharmacological chaperone SR121463 enhanced cell surface expression.

Conclusion: The V88M mutation is associated with phenotypical diversity, which may be explained by the fact that both the expression level and the hormone binding affinity are affected by the mutation. Our results provide a rational basis for treatment trials with vasopressin analogues in combination with pharmacologic chaperones in patients with this recurrently identified mutation.

Introduction

Urinary concentration control involves the secretion by the neurohypophysis of the antidiuretic hormone arginine-vasopressin (AVP) that binds to the vasopressin type 2 receptor (V₂R), located at the basolateral membrane of the principal cells in the collecting duct. Stimulation of the V₂R leads to an increased concentration of intracellular cyclic adenosine monophosphate (cAMP), with subsequent phosphorylation of the water channel aquaporin 2 (AQP2) and its insertion in the apical membrane. A failure of the kidney to appropriately respond to AVP is called nephrogenic diabetes insipidus (NDI). Whilst NDI can occur in the context of other kidney diseases (Bockenhauer, 2008; Bockenhauer *et al.*, 2008), 2 forms of classical inherited NDI are recognized: a common (~90%) X-linked recessive form, due to mutations in the V₂R encoding gene, *AVPR2*, and a rare (~10%) autosomal recessive or dominant form, due to mutations in the *AQP2* gene (Bockenhauer, 2008). NDI-associated mutations in *AVPR2* result in a loss-of-function of V₂R signalling, characterized by an inability of this receptor to generate sufficient cAMP in response to AVP. To date, over 200 NDI-causing mutations in *AVPR2* have been identified (Spanakis *et al.*, 2008). These mutations can alter the functional properties of the V₂R by either 1) decreasing its cell surface expression as a result of its intracellular retention or misrouting 2) promoting its constitutive desensitization and internalization 3) reducing its affinity for AVP 4) preventing its coupling to proximal signalling effectors or 5) causing defect in mRNA processing or stability (reviewed in (Robben *et al.*, 2006)). Recently, pharmacological chaperones have been shown *in vitro* and *in vivo* to rescue cell surface expression and function of intracellularly retained NDI-associated V₂ mutated receptors (Bernier *et al.*, 2004; Bernier *et al.*, 2006). However, these chaperones cannot rescue other functional consequences of receptor mutations, such as binding or signalling defects.

Here, we report a family with both males and females affected by NDI with an apparent X-linked dominant inheritance. Our genetic investigation revealed a previously recognized NDI-causing point mutation c.262G>A (p.V88M) in *AVPR2* (Bichet *et al.*, 1994; Ala *et al.*, 1998). Yet, four affected members, including 2 males, have a measurable, if incomplete, response to exogenous 1-desamino[8-D-arginine] vasopressin (DDAVP), whilst two others, including one female, do not, revealing a surprising phenotypic heterogeneity with this mutation. To investigate the molecular basis of this, we assessed the pharmacological and functional properties of V88M-

V₂R by looking at cell surface expression, AVP-binding affinity and AVP-induced cAMP production. Finally, functional rescue of the V88M-V₂R by pharmacological chaperone treatment was assessed as a putative therapeutic approach.

Results

Case descriptions

All affected members have a history of polyuria and male patients were diagnosed during their first year of life with NDI (except for individual I-1, see below). A pedigree of the family is shown in figure 1 with pertinent clinical data listed in table 1. A detailed description of the clinical history of affected members is below.

I-1

Individual I-1 immigrated to the UK from Cyprus. He had a long-standing history of severe polyuria/polydipsia, as reported by his children, but never received, nor sought medical treatment. He developed normally and led an active life as a restaurant manager. He died at the age of 80 years of cardiovascular disease.

II-1

Individual II-1 was known for her polyuria and nocturia, like her sisters II-4 and II-8 since early childhood. Her paediatrician ascribed it to “familial diabetes insipidus”. Her urinary concentrating ability was evaluated during the assessment of her son III-1 at which point she received 5 units of pitressin tannate in oil with a subsequent maximum urine osmolality of 208 mosm/kg. She was severely affected by multiple sclerosis and died at the age of 42.

II-4

Individual II-4 sought medical help for polyuria at the age of 25 years, quantified at nearly 3.5 litres (see table1). She has nocturia about 2-3 times per night. She was water-deprived for 11 hours, with an increase in plasma osmolality from a baseline of 287 to a maximum of 294 mosm/kg, while her weight decreased from 133.2 to 131.45 kg. The maximum urine osmolality

during this water deprivation was 413 mosm/kg. She subsequently received 2 mcg DDAVP intramuscularly (im) with a further increase in urine osmolality to 450 mosm/kg.

II-8

Individual II-8 was formally assessed at the age of 48 years with a water deprivation test, which was stopped when her serum osmolality rose to 302 mosm/kg, with a concomitant urine osmolality of 323 mosm/kg. She subsequently received 2 mcg DDAVP im, with a further increase in urine osmolality to 508 mosm/kg. This was interpreted as consistent with central diabetes insipidus. She commenced taking 10 mcg DDAVP twice daily intranasally with subjective improvement of her symptoms. Once the diagnosis of NDI was made in her grandson IV-1 and the V88M mutation also identified in her, she underwent repeat testing with a maximum urine osmolality of 400 mosm/kg.

III-1

Individual III-1 was assessed at the age of 5 months because of failure-to-thrive and polyuria. His weight at that time was below the 3rd percentile. He underwent a water deprivation test during which his serum osmolality increased to 313 mosm/kg with a concomitant urine osmolality of 377 mosm/kg. He subsequently received 0.5 units of pitressin tannate in oil with a maximum urine osmolality of 366 mosm/kg. A low-solute diet and hydrochlorothiazide were commenced and he eventually thrived well. In fact, he became overweight with a BMI of 28 at the age of 10 years. His paediatrician remarked about his NDI that “this family do not have it as badly as others”. He stopped his medication during adolescence and by self-report drank about 10-15 litres per day.

III-10

Individual III-10 was born at 34 weeks gestation with a birth weight of 2.98 kg by elective caesarean section after a pregnancy complicated by maternal gestational diabetes mellitus and placenta previa. He was assessed at day of life 12 with poor weight gain and was found to have elevated plasma sodium of 149 mmol/l. He was subsequently given 0.4 mcg DDAVP im with a maximal urine osmolality of 63 mosm/kg. A low-solute diet, hydrochlorothiazide and indomethacin were prescribed, but the parents eventually decided against all medications. He

maintained normal biochemistries on routine check-ups, but his weight dropped below the 2nd percentile for age and medications were restarted at the age of 11 months. A DDAVP test (2 mcg im) was repeated at the age of 10-months with a subsequent maximum urine osmolality of 89 mosm/kg. At his most recent follow-up at the age of 2, he maintained growth along the 1st percentile.

IV-1

This boy was assessed at 8 month of age because of a history of polyuria. At that time his weight was on the 2nd percentile and the mother reported a fluid intake of about 1200 ml per day, as well as difficulties sleeping. With water deprivation for 3 hours, his weight decreased by 5%, but he maintained a normal plasma osmolality (maximal 295 mosm/kg) with a urine osmolality of 170 mosm/kg. AVP-levels obtained at the beginning and end and were slightly elevated at 2.1 and 2.6 pmol/l respectively (Normal <2.0). After 1 mcg DDAVP im, his urine osmolality rose to 254 mosm/kg. A diagnosis of NDI was made and chlorothiazide and later indomethacin commenced. However, the discharge letter already remarked on the unusually mild presentation, with the absence of typical symptoms, such as vomiting and feeding difficulties. He has been thriving and growing well since along the 25th to 50th %ile for age. The DDAVP test was repeated at the age of 5 years, and his urine osmolality rose to a maximum of 570 mosm/kg after 2 mcg DDAVP im. A 24-h urine collection contained a volume of just over 1.5 liters. His main clinical problem at that age was nocturnal enuresis, now treated with intranasal DDAVP 40 mcg before bedtime to allow him to sleep through the night without the need to void.

Genetic analysis

AVPR2 sequencing was first performed on individual IV-1, his mother III-13 and maternal grandmother II-8 and a point mutation c.262G>A (p.V88M) was identified in all three individuals. The same mutation was subsequently identified in individual III-10, his sisters III-4 and III-7 and their mother II-4 (see Figure 1).

X-inactivation

X-inactivation assays were performed on individuals II-4, III-7 and III-13 and were consistent with random inactivation in all three of them.

Expression of V88M-V₂R *in-vitro*

Relative expression levels of wild type (WT) and V88M-V₂R were assessed by western blotting (Fig. 2A). Expression of the fully-glycosylated, mature form of the receptor (spanning from 45 to 55 kDa (Morello *et al.*, 2000)), was observed for the WT receptor with 50 ng of coding plasmid for transfection whilst substantial expression of the V88M mutant was achieved only with the maximal dose (1000 ng) of coding plasmid. To quantify the relative cell surface expression levels, whole cell enzyme-linked immunosorbent assays (ELISA) were performed. Again, a low amount (50 ng) of WT-V₂R DNA for transfection was sufficient to promote cell surface expression, corroborating the western blot analysis (Fig. 2B). Increasing the amount of DNA transfected by 20-fold resulted in a ~50% increase in receptor cell surface expression. In contrast, transfecting cells with 300 and 600 ng of V88M-V₂R DNA did not lead to detectable cell surface expression of the mutant receptor. However, 1000 ng of V88M-V₂R DNA promoted ~25% of the WT-V₂R expression level in the same transfection conditions. Similar reduced surface labelling was also observed by fluorescence microscopy (data not shown). Thus, we conclude that maturation and surface expression of the V88M-V₂R mutant is reduced in comparison to WT-V₂R.

Cell permeable V₂R-specific antagonists, such as SR121463, can act as pharmacological chaperone to promote maturation and cell surface expression of misfolded V₂R mutants that are retained intracellularly (Morello *et al.*, 2000). We thus assessed the effect of SR121463 on the V88M-V₂ receptor. Our results show that SR121463 treatment increased cell surface expression of the mutant receptor at all DNA quantities used whilst having no significant effect on the WT (Fig 2A & B). Upon SR121463 treatment, the cell surface expression level of V88M-V₂R reached ~70% of that observed for the WT receptor when using 1000 ng of coding plasmids for both. This is, again, consistent with the hypothesis that the V88M-V₂R is not efficiently matured and partially retained intracellularly.

Binding and signalling properties of V88M-V₂R

cAMP production in HEK293 cells transiently expressing either the WT- or V88M-V₂ receptors was measured using an EPAC BRET²-based biosensor (Exchange Protein directly Activated by cAMP Bioluminescence Resonance Energy Transfer) that allows the measurement of cAMP in living cells (Barak *et al.*, 2008). AVP stimulation of WT-V₂R expressing cells promoted cAMP production with an EC₅₀ of 1.54 ± 0.16 nM, in accordance with a previous report (Tahara *et al.*, 1998). In cells expressing V88M-V₂R, the dose-dependent AVP-stimulated cAMP production was found to be right-shifted by more than 100-fold compared to WT-receptor expressing cells with an EC₅₀ of 248 ± 45 nM (Fig. 3A). This decreased potency was not the consequence of the lower cell surface expression of V88M-V₂R compared to WT-V₂R since the EC₅₀ values obtained for each receptor were found to be independent of cell surface expression levels in the range tested (data not shown). Moreover, parallel testing of cAMP production for another V₂R mutant (Y128S), which also has compromised cell surface expression, gave potency values similar to the WT receptor before and after SR121463 treatment (unpublished data), indicating that the observed effect is specific to the V88M mutation.

To assess the affinity of the mutant receptor for AVP, radio-ligand binding assays were carried out using [³H]AVP as the tracer. AVP binds to the WT-V₂R with a dissociation constant (KD) of 6.5 ± 1.44 nM, while the V88M mutant exhibited no detectable specific binding up to 40 nM of [³H]AVP. By increasing the concentrations of [³H]AVP more than 20-fold, an apparent KD of ~500 nM (Fig. 3B inset) was determined. These results clearly demonstrate a reduced affinity of the V88M mutant for AVP and could, in combination with the reduced surface expression, explain the NDI phenotypes observed in patients bearing the mutation.

Functional rescue

Since the SR121463 treatment resulted in a substantial rescue of the V88M-V₂R cell surface expression (Fig. 2B), we assessed the effect of this treatment on AVP-stimulated cAMP production in cells expressing either WT-V₂R or V88M-V₂R. Our results show that, despite the increase in cell surface receptor number, the SR121463 did not improve the AVP-stimulated cAMP production capacity of V88M- V₂R. In fact, the treatment led to a rightward-shift of the AVP-stimulated cAMP production curve for both WT and V88M- V₂R most likely as a result of residual SR121463 binding to the receptor (Fig 3A). Because of the already reduced potency observed for the V88M- V₂R, the SR121463-induced rightward-shift resulted in an almost complete loss of responsiveness (a response could be detected only at 10 μ M AVP), hindering the detection of any possible functional rescue at physiological AVP concentrations.

Discussion

We describe a family affected by NDI with an identified mutation in the *AVPR2* gene (c.262G>A:p.V88M). The clinical phenotype is unusual in two aspects: 1) the presence of symptoms in some female carriers, suggestive of a dominant inheritance and 2) the phenotypic variability observed among individuals. Whilst the V88M mutation has been reported previously, including limited *in-vitro* expression data, the dominant inheritance mode and the variable clinical phenotype was not appreciated (Bichet *et al.*, 1994; Ala *et al.*, 1998). Our detailed cell-based experiments now provide a better understanding of the functional consequences of this mutation that may explain the variable clinical presentation and different response to DDAVP treatment among the affected members of the family.

Dominant inheritance has been previously reported with *AVPR2* mutations and is ascribed to skewed X-inactivation in affected females, as detected in peripheral blood leukocytes (Nomura *et al.*, 1997; Morello et Bichet, 2001). In contrast to these published families, the one affected female (II-4) assessed in this family did not show skewed X-inactivation, nor did the clinically unaffected females III-8 and III-13. Peripheral blood cells do not necessarily reflect the inactivation pattern in kidney cells and thus, skewed inactivation cannot be ruled out as an explanation for the phenotypic heterogeneity. Some of the variability seen in the female mutation carriers may also be due to environmental factors, such as salt intake. Individual II-8 considered herself affected and this was confirmed on subsequent testing with a maximum urine osmolality of 508 mosm/kg after DDAVP and a daily urine volume of 3.5 litres. In contrast, her daughter III-13 considered herself unaffected and, indeed, had a daily urine volume of only 1.6 litres. Yet, the mean osmolality of their 24-h urine was similar at 275 mOsm/kg for II-8 and 330 mosm/kg for III-13 (albeit that II-8 took a total of 20mcg DDAVP intranasally during the collection period), whilst their salt intake differed dramatically: II-8 had to excrete 191 mmol of sodium, equivalent to 10.7 g of cooking salt and obligating a large urine volume. Conversely, her daughter only excreted 77 mmol, or the equivalence of 4.3 g of salt.

Treatment of patients with NDI typically entails a low-salt diet to decrease the osmotic load and a thiazide diuretic to enhance salt and water reabsorption in the proximal tubule (Bockenhauer, 2008). Together, this results in a decreased urine volume, although urine osmolality remains low, reflecting the deficiency in AQP2. In contrast, our patients achieved

urine osmolalities well above that of plasma, indicating functional AQP2. Yet, the discrepancy in the maximum urine osmolality in response to DDAVP demonstrates the importance of an *in vitro* assessment of the functional properties of this mutant receptor to understand this variability and explore potential treatment options. Our results clearly demonstrate a reduced maturation and cell surface expression of the V88M-V₂R, as well as impaired signalling properties compared to the WT-V₂R. Whilst variation in transfection efficiencies could have accounted for the difference in cell surface expression, the SR121463-induced rescue argues against it. This is in line with the fact that most characterized NDI-causing V₂R mutations result in misfolding of the receptor molecule, leading to its intracellular retention by the endoplasmic reticulum (ER) quality control system, and eventual degradation by the proteasomal pathway (Robben *et al.*, 2005). In many cases, the folding and maturation of such mutants was improved by the use of V₂-specific cell permeable antagonists known as pharmacological chaperones (Morello *et al.*, 2000). This is also the case for the V88M-V₂R. However, in contrast with other NDI-causing mutants, where pharmacological chaperone-promoted maturation and trafficking improvement resulted in rescue of signalling functions, SR121463 treatment of V88M-V₂R expressing cells did not improve AVP-stimulated cAMP production. This is most likely due to the reduced affinity of V88M-V₂R for AVP. This may also explain the improved urine concentration following DDAVP treatment compared to water deprivation, documented in several of the patients, since pharmacologic levels of DDAVP exceed those of physiologically produced AVP.

The clinical data clearly show that the mutation V88M in 4 of the 6 affected individuals (II-4, II-8, III-1, IV-1) maintains partial responsiveness to DDAVP, consistent with the residual functional activity of V88M-V₂R observed in cells. Interestingly, 2 other family members (III-1, III-10) did not respond to vasopressin analogues, as reported previously with this mutation (Bichet *et al.*, 1994). The absence of a response to pitressin in individual II-1 is surprising since her clinical symptoms, whilst severe enough to warrant a referral to pediatrics in childhood, were not typical for complete NDI and she developed and thrived normally without further medical support. Therefore, the test results for individual II-1 may have been falsely negative, reflecting the pharmacological difficulties with pitressin in an era before the availability of DDAVP. The non-response in III-10 was initially ascribed to his age, as his first DDAVP test was at the gestational age of 36 weeks, thus a time when NDI is physiologic (Svenningsen et Aronson,

1974; Halperin *et al.*, 2001; Bonilla-Felix, 2004). However, not only was he clinically more severely affected than the other patients in this family, he also showed no response to DDAVP at the age of 10-months, when urinary concentrating ability has usually matured.

The phenotypic variability observed within these reported cases is compatible with the *in-vitro* results obtained using HEK293 cells expressing V88M-V₂R. Indeed, our results suggest that the signalling impairment of the V88M-V₂R results from the combination of a reduced cell surface expression and lower affinity of the receptor for AVP. Thus, the response evoked in patients will depend on both the extent of cell surface targeting and the circulating concentration of AVP (or administered DDAVP), two parameters that can vary between individuals. This contrasts with cases where mutations lead to either complete intracellular retention of the receptor or a total loss of AVP binding.

The initial diagnosis of central DI in patient II-8 highlights the difficulties in distinguishing this from partial NDI, especially in affected females, where an X-linked recessive disorder is not usually suspected. An increase in urine osmolality to >500 mosm/kg after DDAVP was interpreted as incompatible with NDI. Whilst it is below what is typically accepted as a normal response to DDAVP, this was ascribed to the long-standing polyuria with a “wash-out” of the renal medullary concentration gradient. Our data show, that in such incomplete response partial NDI needs to be considered. Whilst both forms can be treated with DDAVP, a diagnosis of partial NDI obviates the need for further investigations into the nature of cranial DI. Moreover, recognition of female carriers of *AVPR2* mutations is important to identify affected male offspring, before the development of potentially serious complications. Finally, confirming a NDI diagnosis could be important for the development of novel therapeutic approaches. Indeed, although the pharmacological chaperone treatment failed to rescue signalling of V88M- V₂R *in vitro*, washout of the pharmacological chaperone in *in-vivo* conditions could alleviate the problem caused by the residual bound pharmacological chaperone. Thus, for patients that do not respond to DDAVP infusion, a pharmacological chaperone treatment, followed by administration of high concentrations of DDAVP (to circumvent the low affinity of V88M- V₂R for AVP) may deserve to be tested.

In conclusion, this work describes the phenotypic diversity associated with the V88M mutation in the V₂R, which is consistent with partial NDI in some individuals. Recognition is important as it opens the possibility of treatment with DDAVP, as successfully done in this family. We further show that females can be affected without evidence of skewed X-inactivation, as assessed in peripheral blood leukocytes. Cell-based experiments show that surface expression and the affinity for its natural ligand are both reduced for the V88M-V₂R. Although the surface expression can be enhanced by treatment with the pharmacological chaperone SR121463, the low affinity of the mutant receptor toward AVP prevents functional rescue, at least *in vitro*. Yet, *in vivo* results could be different and worth testing. Lastly, it is important to distinguish partial NDI from central DI with respect to further investigations and genetic counselling.

Methods

Chemicals were obtained from Sigma-Aldrich, unless specified otherwise. The pharmacological chaperone SR121463 was kindly provided by Sanofi-Aventis (Toulouse, France).

Clinical data

This is a retrospective review of the clinical phenotypes in a single family affected with diabetes insipidus cared for by the authors. Urinary concentrating ability was determined according to standard protocols that included voiding immediately prior to administration of DDAVP and collection of urine every 30-60 minutes, in order to minimise dilution of samples by remnant urine in the bladder.

Molecular Genetics

Analysis of the *AVPR2* gene was performed on individuals II-8, III-13 and IV-1 at the Clinical Genetics Center Nijmegen and on the remaining family members in Dr Bichet's laboratory. Appropriate consents were obtained under a research ethics approved protocol.

X-inactivation assays

The degree of X-chromosome inactivation skewing in females was determined using the PCR-based assay for differential methylation of *HhaI* sites in the first exon of the androgen receptor (*AR*) gene, as described previously (Arthus *et al.*, 2000).

Cell Culture and Transfections

HEK293T cells were Transfected withFuGENE6 (Roche Diagnostics, Qc, Canada) according to the manufacturer's recommendations. Expression plasmids coding for the wild-type myc-tagged V₂R used in this study was previously described (Morello *et al.*, 2000). The V88M mutation was generated using the *Quick Change* mutation kit (Agilent Technologies, Santa-Clara, USA). The EPAC-BRET² used in this study is a modified version of a similar biosensor previously published (Barak *et al.*, 2008). The human EPAC coding sequence was inserted between the blue shifted

variant of the green fluorescent protein (GFP10) and the renilla luciferase-II (RlucII) (Kocan *et al.*, 2008) genes in the pcDNA3.1z vector (Invitrogen). Linkers between GFP10 and EPAC and between EPAC and the RlucII, are GSAGT and KLPAT respectively.

Western blotting

Transiently transfected cells were lysed with 1% Triton X-100 48 hours post-transfection. Western blotting and SDS-PAGE were performed using standard protocols with the 9E10 anti-myc antibody (Santa-Cruz Biotechnology, CA) followed by an HRP-conjugated sheep anti-mouse secondary antibody (GE healthcare, UK). Chemiluminescence was measured with Western Lightning™ (Perkin Elmer, MA) and the LAS-3000 Imaging System (Fuji, Japan).

Cell surface ELISA.

Cell surface receptor expression was assessed as described previously (Hamdan *et al.*, 2007). Briefly, HEK293T cells were transfected and fixed 48-h later with 3.7% formaldehyde and incubated with the 9E10 mouse monoclonal anti-myc antibody first and an alkaline phosphatase-conjugated anti-mouse antibody (BIO-RAD) second. Cell surface expression was assessed with the *Alkaline phosphatase conjugate substrate kit* (BIO-RAD) and a OASYS UVM340 microplate reader (Montreal Biotech inc. Montreal, Canada) at 405 nm. Net surface expression was determined by subtracting absorbance values of mock-transfected cells. All the results were generated in triplicates.

Binding experiments:

Radioligand binding experiments were performed as described (Birnbaumer *et al.*, 1994). Briefly, HEK293T cells were transiently transfected with plasmids encoding WT-V₂R, V88M-V₂R mutant or salmon sperm DNA (ssDNA; Invitrogen, CA, USA). The assays were performed 48 hours after transfection, either on attached cells or in suspension. Cells were incubated with increasing concentrations of [³H]arginin vasopressin (64.2 Ci/mMol, Perkin Elmer, MA, USA) for 2 hours in binding buffer on ice. Attached cells were then lysed with in 0.4 M NaOH and radioactivity determined by scintillation counting. For binding on suspension culture, the bound radio-ligand was separated by filtration over GF/B glass fiber filter (Millipore, MA, USA) and

quantified by scintillation counting. Specific binding was determined by subtracting the counts obtained with the mock-transfected cells. Each data point was performed in triplicates.

cAMP production measurement

An EPAC BRET²-based biosensor was used to determine cAMP production, as described (Barak *et al.*, 2008). Briefly, HEK-293T cells were co-transfected with the EPAC BRET²-based sensor (see above) and either WT- or V88M-V₂R constructs. After 48-h, cells were incubated for 15 minutes with vehicle or AVP. After addition of coelenterazine solution (final concentration 5 μ M; Nanolight Technology, AZ, USA), the plate was read into a Mithras LB940 instrument (Berthold Technologies, Bad Wildbad, Germany) using the MicroWin 2000 software (Berthold Technologies). The BRET signal was determined by calculating the ratio of the light emitted at 505 to 555 nm (YFP) to the light emitted at 465 to 505 nm (Luciferase). Experiments were performed in triplicates.

References

- 1 Bockenhauer D: Diabetes insipidus; in Geary DF, Schaefer F (eds): Comprehensive pediatric nephrology. Philadelphia, Mosby Elsevier, 2008, pp 489-498.
- 2 Bockenhauer D, Cruwys M, Kleta R, Halperin LF, Wildgoose P, Souma T, Nukiwa N, Cheema-Dhadli S, Chong CK, Kamel KS, Davids MR, Halperin ML: Antenatal bartter's syndrome: Why is this not a lethal condition? *Qjm* 2008;101:927-942.
- 3 Spanakis E, Milord E, Gragnoli C: Avpr2 variants and mutations in nephrogenic diabetes insipidus: Review and missense mutation significance. *J Cell Physiol* 2008;217:605-617.
- 4 Robben JH, Knoers NV, Deen PM: Cell biological aspects of the vasopressin type-2 receptor and aquaporin 2 water channel in nephrogenic diabetes insipidus. *Am J Physiol Renal Physiol* 2006;291:F257-270.
- 5 Bernier V, Morello JP, Zarruk A, Debrand N, Salahpour A, Lonergan M, Arthus MF, Laperriere A, Brouard R, Bouvier M, Bichet DG: Pharmacologic chaperones as a potential treatment for x-linked nephrogenic diabetes insipidus. *J Am Soc Nephrol* 2006;17:232-243.
- 6 Bernier V, Lagace M, Lonergan M, Arthus MF, Bichet DG, Bouvier M: Functional rescue of the constitutively internalized v2 vasopressin receptor mutant r137h by the pharmacological chaperone action of sr49059. *Mol Endocrinol* 2004;18:2074-2084.
- 7 Bichet DG, Birnbaumer M, Lonergan M, Arthus MF, Rosenthal W, Goodyer P, Nivet H, Benoit S, Giampietro P, Simonetti S, et al.: Nature and recurrence of avpr2 mutations in x-linked nephrogenic diabetes insipidus. *Am J Hum Genet* 1994;55:278-286.
- 8 Ala Y, Morin D, Mouillac B, Sabatier N, Vargas R, Cotte N, Dechaux M, Antignac C, Arthus MF, Lonergan M, Turner MS, Balestre MN, Alonso G, Hibert M, Barberis C, Hendy GN, Bichet DG, 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.
- 9 Morello JP, Salahpour A, Laperriere A, Bernier V, Arthus MF, Lonergan M, Petaja-Repo U, Angers S, Morin D, Bichet DG, Bouvier M: Pharmacological chaperones rescue cell-surface expression and function of misfolded v2 vasopressin receptor mutants. *J Clin Invest* 2000;105:887-895.

- 10 Barak LS, Salahpour A, Zhang X, Masri B, Sotnikova TD, Ramsey AJ, Violin JD, Lefkowitz RJ, Caron MG, Gainetdinov RR: Pharmacological characterization of membrane-expressed human trace amine-associated receptor 1 (taar1) by a bioluminescence resonance energy transfer camp biosensor. *Mol Pharmacol* 2008;74:585-594.
- 11 Tahara A, Saito M, Sugimoto T, Tomura Y, Wada K, Kusayama T, Tsukada J, Ishii N, Yatsu T, Uchida W, Tanaka A: Pharmacological characterization of the human vasopressin receptor subtypes stably expressed in chinese hamster ovary cells. *British journal of pharmacology* 1998;125:1463-1470.
- 12 Nomura Y, Onigata K, Nagashima T, Yutani S, Mochizuki H, Nagashima K, Morikawa A: Detection of skewed x-inactivation in two female carriers of vasopressin type 2 receptor gene mutation. *J Clin Endocrinol Metab* 1997;82:3434-3437.
- 13 Morello JP, Bichet DG: Nephrogenic diabetes insipidus. *Annu Rev Physiol* 2001;63:607-630.
- 14 Robben JH, Knoers NV, Deen PM: Characterization of vasopressin v2 receptor mutants in nephrogenic diabetes insipidus in a polarized cell model. *Am J Physiol Renal Physiol* 2005;289:F265-272.
- 15 Bonilla-Felix M: Development of water transport in the collecting duct. *Am J Physiol Renal Physiol* 2004;287:F1093-1101.
- 16 Svenningsen NW, Aronson AS: Postnatal development of renal concentration capacity as estimated by ddavp-test in normal and asphyxiated neonates. *Biol Neonate* 1974;25:230-241.
- 17 Halperin ML, Bichet DG, Oh MS: Integrative physiology of basal water permeability in the distal nephron: Implications for the syndrome of inappropriate secretion of antidiuretic hormone. *Clin Nephrol* 2001;56:339-345.
- 18 Arthus MF, Lonergan M, Crumley MJ, Naumova AK, Morin D, De Marco LA, Kaplan BS, Robertson GL, Sasaki S, Morgan K, Bichet DG, Fujiwara TM: Report of 33 novel avpr2 mutations and analysis of 117 families with x-linked nephrogenic diabetes insipidus. *J Am Soc Nephrol* 2000;11:1044-1054.

- 19 Kocan M, See HB, Seeber RM, Eidne KA, Pflieger KD: Demonstration of improvements to the bioluminescence resonance energy transfer (bret) technology for the monitoring of g protein-coupled receptors in live cells. *J Biomol Screen* 2008;13:888-898.
- 20 Hamdan FF, Rochdi MD, Breton B, Fessart D, Michaud DE, Charest PG, Laporte SA, Bouvier M: Unraveling g protein-coupled receptor endocytosis pathways using real-time monitoring of agonist-promoted interaction between beta-arrestins and ap-2. *J Biol Chem* 2007;282:29089-29100.
- 21 Birnbaumer M, Gilbert S, Rosenthal W: An extracellular congenital nephrogenic diabetes insipidus mutation of the vasopressin receptor reduces cell surface expression, affinity for ligand, and coupling to the gs/adenylyl cyclase system. *Mol Endocrinol* 1994;8:886-894.

Table 1: Pertinent clinical data

Subject:	II-1	II-4	II-8	III-1	III-2	III-3	III-4	III-5	III-6	III-7	III-8	III-10	III-13	IV-1
Sex	F	F	F	M	M	F	F	M	F	F	F	M	F	M
V88M	ND	yes	yes	ND	ND	no	yes	no	no	yes	no	yes	yes	yes
Age at testing, years	adult	34	54	0.4	7	23	21	19	17	14	11	0.9	29	6
24-hour urine														
Volume, ml	ND	3,487	3,474	275	ND	876	705	283	2,540	1,770	926	ND	1,648	1,542
Sodium, mmol	ND	ND	275	5	ND	134	126	82	40	113	82	ND	77	35
Osmolality, mosm/kg	ND	231	191	ND	ND	509	490	996	215	482	453	ND	330	189
Creatinine, mmol/kg	ND	0.1	0.15	0.07 ^a	ND	0.12	0.15	0.29	0.04 ^a	0.14	0.16	ND	0.14	0.11
Max. urine osmolality														
After DDAVP, mosm/kg	208 ^b	450	508	366 ^b	1,090 ^b	ND	ND	ND	ND	ND	ND	89	ND	570
After water deprivation, mosm/kg	111	413	323	377	953	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND

Results on 24-hour urine collection as well as maximal urine concentration, as far as available. Note that maximum urine osmolality in tested male patients ranges from 89 (III-10) to 570 mosm/kg (IV-1) and from 208 (II-1) to 508 mosm/kg (II-8) in tested female patients. ND = No data.

^a Urine collection was incomplete by self-report.

^b These individuals received pitressin tannate in oil instead of DDAVP.

Figures legends:**Figure 1: Pedigree**

The status of affected (filled symbol) was assigned by clinical symptoms, but without genetic confirmation in individuals I-1, II-1 and III-1. In the other affected members, the V88M mutation was identified, as also in the clinically unaffected females III-4, III-7 and III-13 (dotted symbol)

Figure 2: V88M-V₂R has decreased expression *in-vitro*

HEK293 cells were transfected with the indicated amount of plasmids encoding myc-tagged WT-V₂R or V88M-V₂R. After 16 hours incubation in presence or absence of 10 μM of SR121463, total and cell surface expression were assessed by western blot analysis (A) and cell surface ELISA (B) using an anti-myc antibody. Black arrows indicate the mature form of the V₂R. Data are the mean ± S.E. of at least three experiments. Statistical significance of the difference was assessed using paired Student's *t* test. ***, *p* < 0.0001; *, *p* < 0.05. Note that substantial expression of V88M-V₂R can only be achieved with the maximum amount of plasmid (1000 ng) for transfection, but that surface expression of the mutant can be enhanced by treatment with the pharmacological chaperone SR121463.

Figure 3: cAMP production and AVP binding affinity is impaired in V88M-V₂R

Levels of cAMP were assessed using the BRET²-based EPAC biosensor as indicated in the material and method section (A) HEK293 cells were transfected with either WT-V₂R or plasmids and the EPAC biosensor coding plasmid. After a 15-min incubation of transfected cells with the indicated concentrations of AVP, BRET² measurements were performed. EC₅₀ values obtained are shown in inset and reveal an approximately 100-fold decreased cAMP production with V88M-V₂R compared to WT-V₂R that cannot be rescued with SR121463. (B) Radioligand binding experiments were performed using HEK293 cells transiently transfected with either WT-V₂R or V88M-V₂R constructs or salmon sperm DNA (Mock). Cells were then incubated for two hours in presence of increasing concentrations of [³H]arginin vasopressin up to 40 nM. Inset:

Incubation of cells expressing V88M-V₂R in presence of higher concentrations of [³H] arginin vasopressin was performed in order to detect specific binding. More than 10-fold higher concentrations are necessary for specific binding in V88M-V₂R compared to WT-V₂R.

Figure 1

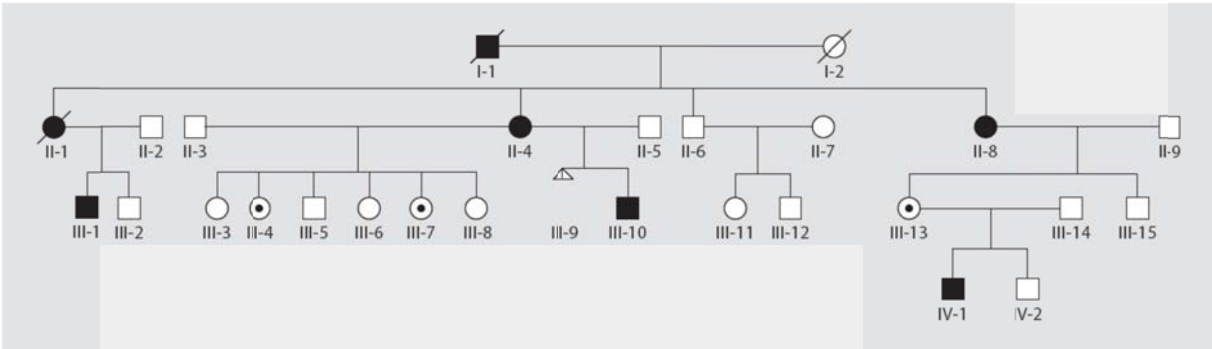
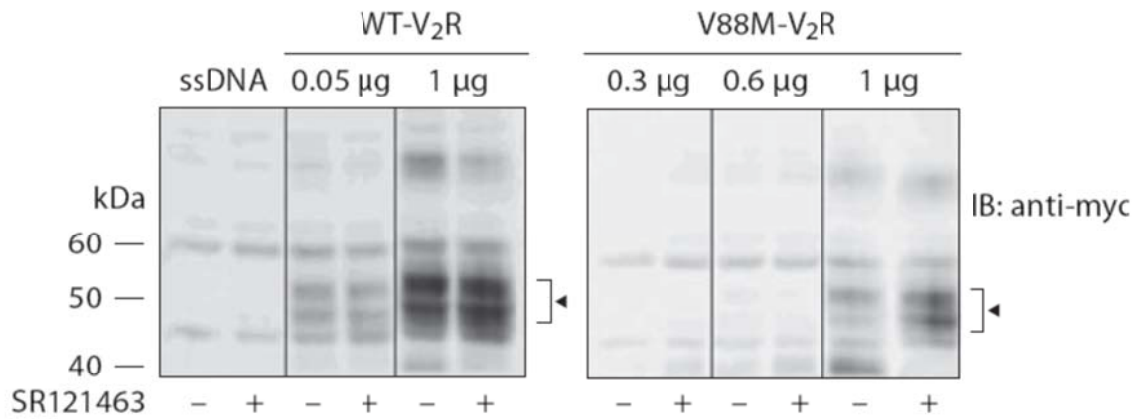
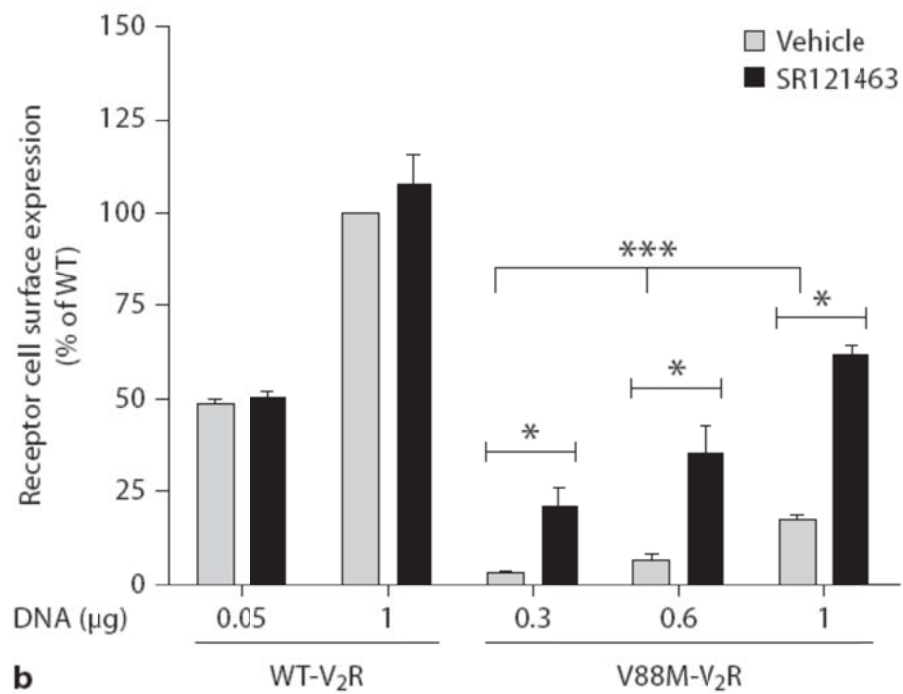


Figure 2

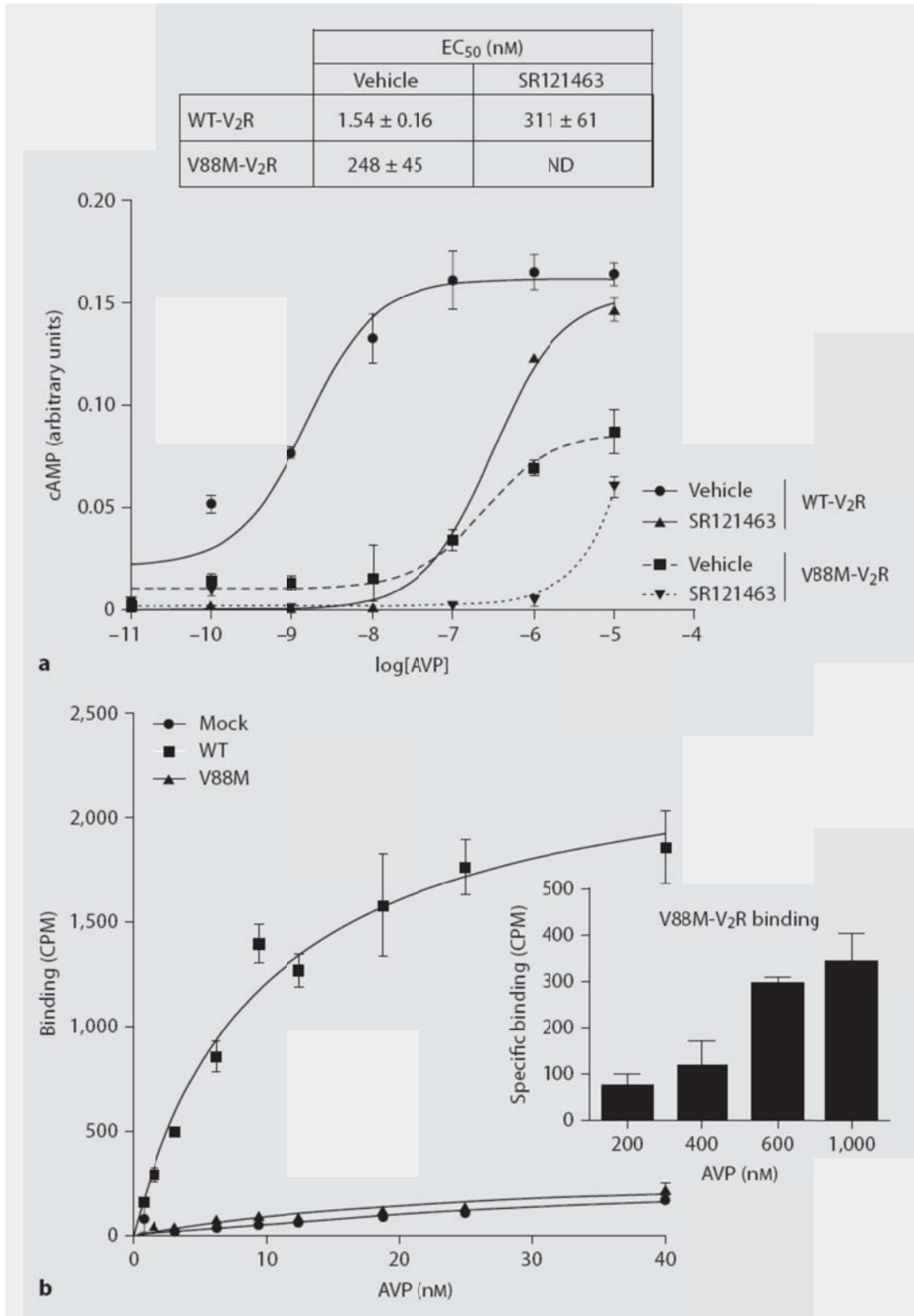


a



b

Figure 3



ARTICLE 2

Functional characterization of vasopressin type 2 receptor substitutions (R137H/C/L) leading to nephrogenic diabetes insipidus and nephrogenic syndrome of inappropriate antidiuresis: implications for treatments

Rochdi MD, Vargas GA, Carpentier E*, Oligny-Longpré G, Chen S, Kovoov A, Gitelman SE, Rosenthal SM, von Zastrow M, Bouvier M. 2010. Publié dans *Mol Pharmacol* 77(5): 836-845

La substitution de l'arginine 137 du récepteur de la vasopressine de type 2 (V2R) par une histidine (R137H-V2R) occasionne le diabète insipidus néphrogénique (DIN) tandis que la substitution du même résidu par une cystéine ou une leucine (R137C/L-V2R) entraîne le syndrome néphrogénique de l'anti-diurèse inappropriée (NSIAD), deux pathologies ayant des conséquences cliniques totalement opposées. L'analyse des trois récepteurs mutants a montré qu'ils ont tout de même en commun plusieurs caractéristiques, comme le recrutement constitutif de la β -arrestine menant à l'endocytose des récepteurs, une résistance à l'action de la vasopressine sur la voie de l'AMPc et de la kinase activée par les mitogènes (MAPK) et une expression de surface compromise, ce qui soulève des questions quant à la contribution de ces différentes caractéristiques sur l'ontologie des maladies impliquées et des traitements à apporter aux patients atteints de ces mutations. L'inhibition de l'endocytose des récepteurs a eu pour effet d'augmenter le niveau basal déjà élevé d'AMPc généré par les mutants R137C/L-V2R sans affecter le niveau de base d'AMPc chez les cellules exprimant le R137H-V2R, démontrant que la substitution de l'arginine 137 par une cystéine ou une leucine, mais pas une histidine, induit une augmentation de l'activité constitutive de base du récepteur conduisant au NSIAD. Ce résultat suggère aussi que le niveau élevé d'endocytose constitutive observée pour les mutants R137C/L-V2R atténue l'accumulation d'AMPc générée par ces récepteurs et contribue probablement à réduire la sévérité de la maladie, tandis que le haut niveau d'endocytose constitutive du mutant R137H-V2R est probablement la cause majeure du DIN. L'activité basale des mutants R137C/L-

V2R n'a pu être inhibée par un traitement avec le satavaptan (SR121463), un inverse agoniste spécifique au V2R. En fait, dû à ses propriétés de chaperon pharmacologique, le traitement au SR121463 a eu pour effet d'augmenter leur expression de surface, exacerbant l'accumulation d'AMPC de base, disqualifiant ainsi l'utilisation de cette drogue pour le traitement des patients atteints de NSIAD causé par les substitutions R137C/L. Par contre, l'internalisation constitutive dépendante des β -arrestines déjà élevée des mutants R137C/L-V2R a été accrue par un traitement à la vasopressine, favorisant une diminution du nombre de récepteurs à la surface cellulaire et se traduisant par une diminution de la production basale d'AMPC induite par ces récepteurs, soulevant la possibilité d'utiliser l'hormone, ou ses substituts, comme agents thérapeutiques pour le traitement des patients porteurs des substitutions R137C/L-V2R.

* : Malgré le fait que je sois 3ième auteur, ma contribution à ces travaux fut hautement significative, par l'exécution de plusieurs expériences impliquant la caractérisation fonctionnelle des récepteurs à l'étude, à la rédaction de la partie 'discussion', la correction du texte et au processus de révision. J'ai entièrement réalisé les expériences demandées par les critiques mandatés par le journal et fait les ajustements nécessaires au manuscrit.

Functional Characterization of V2-Vasopressin Receptor Substitutions (R137H/C/L) Leading to Nephrogenic Diabetes Insipidus and Nephrogenic Syndrome of Inappropriate Antidiuresis; Implications for treatments.

Moulay D. Rochdi, Gabriel A. Vargas, Eric Carpentier, Geneviève Oligny-Longpré, Stanford Chen, Abraham Kovoov, Stephen E. Gitelman, Stephen M. Rosenthal, Mark von Zastrow and Michel Bouvier*

Institut de Recherche en Immunologie et Cancérologie, Département de Biochimie and Groupe de Recherche Universitaire sur le Médicament, Université de Montréal, Montréal, Québec, H3C 3J7, Canada (M.D.R., E.C., G.O.-L., M.B.); Department of Psychiatry (G.A.V., S.C., A.K., M.vZ), Department Cellular & Molecular Pharmacology (M.vZ), and Department of Pediatrics, Division of Endocrinology (S.E.G., S.M.R.), UCSF, San Francisco, CA, USA

Running Title: Signalling and trafficking of NDI and NSIAD V2R mutations

Corresponding author:

Michel Bouvier

IRIC, Université de Montréal



Number of text pages: 35

Number of tables: 1

Number of figures: 8

Number of references: 32

Number of words in the *Abstract*: 249

Number of words in the *Introduction*: 593

Number of words in the *Discussion*: 1086

Abbreviations: AVP, arginine vasopressin; AQP2, aquaporin 2 water channel; V2R, V2-vasopressin receptor; GPCR, G protein-coupled receptors; PKA, cAMP-dependent protein kinase; NDI, nephrogenic diabetes insipidus; NSIAD, nephrogenic syndrome of inappropriate antidiuresis; MAPK, mitogen-activated protein kinase; DMEM, Dulbecco's modified Eagle's medium; G418, Geneticin; ERK, extracellular signal-regulated kinase; BRET¹, first generation of bioluminescence resonance energy transfer; HTRF, homogeneous time resolved fluorescence technology; Rluc, Renilla luciferase; EYFP, enhanced yellow fluorescent protein; DynK44A, dominant negative mutant of dynamin, HEK, human embryonic kidney; SDS-PAGE, SDS-polyacrylamide gel electrophoresis, PBS, phosphate-buffered saline; pCREluc, cAMP-responsive luciferase reporter plasmid; WT, wild-type; GIRK, G protein-activated inwardly rectifying potassium channel subunits.

ABSTRACT

Substitution of arginine-137 of the vasopressin type 2 receptor (V2R) for histidine (R137H-V2R) leads to nephrogenic diabetes insipidus (NDI) whereas substitution of the same residue to cysteine or leucine (R137C/L-V2R) causes the nephrogenic syndrome of inappropriate antidiuresis (NSIAD), two diseases with opposite clinical outcomes. Still, the three mutant receptors were shown to share constitutive β -arrestin recruitment and endocytosis, resistance to vasopressin-stimulated cAMP production and MAPK activation as well as compromised cell surface targeting, raising questions about the contribution of these phenomena to the diseases and their potential treatments. Blocking endocytosis exacerbated the elevated basal cAMP levels promoted by R137C/L-V2R but not the cAMP production elicited by R137H-V2R, demonstrating that substitution of R137 to C/L, but not H, leads to constitutive V2R-stimulated cAMP accumulation that most likely underlies NSIAD. The constitutively elevated endocytosis of R137C/L-V2R attenuates the signalling and most likely reduces the severity of NSIAD whereas the elevated endocytosis of R137H-V2R probably contributes to NDI. The constitutive signalling of R137C/L-V2R was not inhibited by treatment with the V2R inverse agonist SR121463. In contrast, owing to its pharmacological chaperone property, SR121463 increased the R137C/L-V2R maturation and cell surface targeting, leading to a further increase in basal cAMP production thus disqualifying it as a potential treatment for R137C/L-V2R NSIAD

patients. However, vasopressin was found to promote β -arrestin/AP2-dependent internalization of R137H/C/L-V2R beyond their already elevated endocytosis levels, raising the possibility that vasopressin could have a therapeutic value for R137C/L NSIAD patients by reducing steady state surface receptor levels, thus lowering basal cAMP production.

INTRODUCTION

The arginine vasopressin (AVP) system plays a crucial role in water homeostasis. AVP is synthesized in the hypothalamus and is released upon increased plasma osmolality, decreased arterial pressure and heart volume reduction (Treschan et Peters, 2006; Ball, 2007). In the distal collecting tubules of the kidney, AVP promotes water reabsorption through the aquaporin 2 water channel (AQP2) by binding to, and activating the vasopressin type 2 receptor (V2R). This receptor, which belongs to the family of G protein-coupled receptors (GPCR), promotes cAMP production through the activation of G α s and adenylyl cyclase. It has been suggested that the resulting phosphorylation of AQP2 by the cAMP-dependent protein kinase (PKA) promotes its insertion into the apical plasma membrane of the renal collecting duct principal cells, leading to increased water permeability (Treschan et Peters, 2006; Ball, 2007). Renal insensitivity to AVP results in a failure to reabsorb water, leading to excessive water excretion (>30 ml/kg body wt/d for adults) and diluted urine (<250 mmol/kg) causing dehydration and pathological hypernatremia; a disease known as nephrogenic diabetes insipidus (NDI) (Fujiwara et Bichet, 2005). Most NDI cases result from mutations in the V2R gene (*AVPR2*). To date, over 200 NDI-causing mutations in *AVPR2* has been associated with loss-of-function of V2R signalling (Fujiwara et Bichet, 2005; Spanakis *et al.*, 2008). One of these missense mutations, leading to substitution of an arginine to a histidine at position 137 (R137H), was shown to cause loss-of-function of the V2R as a results of a dramatic decrease in cell surface expression induced by both constitutive internalization and intracellular retention of the receptor due to its impaired maturation (Barak *et al.*, 2001; Bernier *et al.*, 2004). Unexpectedly, Feldman and colleagues (2005) reported that substitution of the same arginine residue by either cysteine or leucine (R137C or R137L) was causing a distinct renal disorder associated with a V2R gain-of-function, leading to excessive water reabsorption, hyponatremia and seizures. This newly described syndrome was termed nephrogenic syndrome of inappropriate antidiuresis (NSIAD) (Feldman *et al.*, 2005). Characterization of the R137C- and R137L-V2R signalling properties revealed a constitutively elevated basal V2R-promoted cAMP production (Feldman *et al.*, 2005). Although the structural mechanisms involved in GPCRs activation are still incompletely understood, the well conserved DR¹³⁷Y/H motif is thought to be involved in the intramolecular interactions that stabilize inactive and/or activated conformations of various GPCRs (Rovati *et al.*, 2007).

While previous studies have extensively investigated the loss-of-function R137H-V2R (Barak *et al.*, 2001; Bernier *et al.*, 2004), only limited data are available for the R137C- and R137L-V2R. Recently, Kocan *et al.* (2009) reported that, as previously shown for R137H-V2R (Bernier *et al.*, 2004), R137C- and R137L-V2R promote agonist-independent recruitment of β -arrestin to the receptor and the subsequent internalization of the receptor/ β -arrestin complex. Despite this increased constitutive β -arrestin recruitment, which should blunt the $G\alpha_s$ signalling activity, a significant elevated cAMP production was observed. This contrasts with the absence of spontaneous $G\alpha_s$ activation for the R137H substitution and most likely contributes to the opposite pathological outcomes resulting from these different substitutions at position 137. To determine if other functional properties, specific to the R137C- and R137L-V2R, contribute to the gain-of-function associated with these V2R mutants, we characterized multiple functional properties of the R137C- and R137L-V2R by investigating their maturation and cell surface targeting, basal and agonist-stimulated cAMP production and mitogen-activated protein kinase (MAPK) activation as well as their constitutive and ligand-regulated endocytosis. Finally, we investigated the potential therapeutic benefit of using a V2R-specific inverse agonist (SR121463B) on the gain-of-function of the R137C- and R137L-V2R mutant receptors and thus, its suitability as a potential therapeutic agent for NSIAD.

MATERIALS AND METHODS:

Materials. Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM), fetal bovine serum, Geneticin (G418), L-glutamine and penicillin-streptomycin were purchased from Wisent. Fugene6 was obtained from Roche Diagnostics. Coelenterazine-*h* was from Prolume. Poly-D-lysine and 8-arginine-vasopressin (AVP) as well as the antibodies against the FLAG epitope (M1 and M2) were obtained from Sigma-Aldrich Canada. Antibodies recognizing the extracellular signal-regulated kinases (ERK) and their phosphorylated forms (P-ERK) were from Santa Cruz Biotechnology Inc. whereas anti-mouse and anti-rabbit HRP-conjugated IgG were from GE Healthcare. The enhance chemiluminescence lightening substrat was obtained from PerkinElmer. The white opaque and clear bottom 96-well plates were from Corning. The Cy3-conjugated donkey anti-mouse secondary antibody was from Jackson ImmunoResearch. The Mithras LB940 from Berthold was the plate reader used to measure the first generation of bioluminescence resonance energy transfer (BRET¹) while the ARTEMIS TR-FRET microplate reader (Cosmo Bio Co., Ltd) was used to read the homogeneous time resolved fluorescence (HTRF) technology assays in this study.

Plasmid constructs and mutagenesis. A FLAG epitope tagged human V2R was described previously (Klein et al., 2001). FLAG-R137L-V2R, FLAG-R137C-V2R and FLAG-R137H-V2R mutant constructs were generated from the FLAG-WT-V2R using site-directed mutagenesis (QuikChange; Stratagene) according to the manufacturer's instructions in order to replace R137 by the appropriate amino acid. The same strategy was used to generate the enhanced yellow fluorescent protein-tagged (EYFP) mutant V2R using the previously published EYFP-WT V2R (Charest et Bouvier, 2003). The Renilla luciferase tagged β -arrestin2 (β -arrestin2-*Rluc*) and the EYFP tagged β 2-adaptin (β 2-adaptin-EYFP) (Hamdan et al., 2007) as well as the dominant negative mutant of dynamin (DynK44A) (Rochdi and Parent, 2003) constructs were described previously.

Cell culture and plasmid transfections. Unless otherwise stated, human embryonic kidney (HEK) 293 cells were cultured in high glucose DMEM supplemented with 10% fetal bovine serum, 100 units/ml penicillin-streptomycin, and 2 mM-glutamine at 37°C in a humidified chamber at 95% air and 5% CO₂. For transfections in 6-well plates, 4x10⁵ HEK293 cells were

seeded and transfected the next day using Fugene6 according to manufacturer's recommendations.

Measurement of cell surface expression and AVP-induced internalization. Agonist-promoted internalization was assessed as described previously (Rochdi et Parent, 2003) using HEK293 cells transiently expressing the different V2R constructs. Briefly, the culture medium was removed and replaced with DMEM/0.5% bovine serum albumin/20 mM HEPES in the presence or absence of AVP. After 60-min incubation at 37°C, the medium was removed and cells were fixed with Tris-buffered saline/3.7% formaldehyde for 5 min at room temperature. Cell surface expression was measured using an ELISA-based assay and anti-FLAG M2 monoclonal antibody. The percentage of agonist-promoted receptor internalization was determined as follows: $(1 - \text{stimulated/unstimulated}) \times 100$.

Total cell extract analysis by western blot. Proteins from total cell lysates were resolved by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) before being transferred onto a nitrocellulose membrane. Protein immunodetection on membranes was done using the Anti-FLAG M2 (0.2 µg/ml) antibody.

BRET¹ measurement of β-arrestin2/β2-adaptin interaction. A stable β2-adaptin-EYFP cell line generated as described previously (Hamdan et al., 2007) was transfected with β-arrestin2-Rluc and either the WT-V2R, R137H-V2R, R137C-V2R or R137L-V2R construct. Approximately 18 h after transfection, cells were detached by trypsinization and seeded ($\sim 5 \times 10^4$ cells/well) into opaque 96-well (white wall, clear bottom) tissue culture plates previously treated with poly-D-lysine, and re-incubated at 37 °C for another 18 h. On the day of the experiment, the culture medium was replaced by phosphate-buffered saline (PBS) and incubated with or without agonist at room temperature for the specified time. To measure the BRET¹ signal, the clear bottom of the 96-well white plate was covered with a white-backed tape adhesive (PerkinElmer Life Sciences), and the BRET¹ substrate for Rluc, coelenterazine-*h*, was added to all wells (5 µM final concentration), followed by BRET¹ measurement on the Mithras LB940 plate reader, which allows the sequential integration of signals detected in the 480 ± 20 nm and 530 ± 20 nm windows. The BRET¹ signal was calculated as a ratio of the light emitted by EYFP (530 ± 20 nm)

over the light emitted by *Rluc* (480 ± 20 nm). Total luciferase and EYFP values were comparable in each condition tested.

BRET¹ measurement of β -arrestin recruitment to WT- and mutant V2R. EYFP-tagged WT and mutant V2R were transiently co-expressed with the β -arrestin2-*Rluc* in HEK293 cells. Forty eight hours after transfection, cells were detached in PBS and distributed in an opaque 96-wells plate. Cells were then stimulated for 20 min at 37°C with increasing amount of AVP (from 10^{-15} to 10^{-5} M) prior to the addition of coelenterazine-*h* (5 μ M final) and BRET measurement using the Mithras LB940 plate reader. Potency values (EC50) of the AVP-promoted β -arrestin recruitment to the receptors were determined using the GraphPad Prism software (San Diego, CA).

Visualization of receptor localization and internalization by fluorescence Microscopy. FLAG-tagged mutant receptors present at the plasma membrane were specifically labelled with the M1 monoclonal antibody and subsequent internalization was visualized using a minor modification of a method described previously (Gage et al., 2001). Briefly, HEK293 cells stably or transiently expressing the indicated FLAG-tagged receptor constructs were plated on glass coverslips (Corning), and surface receptors were specifically labelled by incubating intact cells with the M1 anti-FLAG monoclonal antibody (2.5 μ g/ml; Sigma) at 37°C for 30 min in the absence of agonist. The cells were then incubated (37°C for 30 min) in the presence or absence of 10 μ M AVP (Sigma), as indicated. Cells were then fixed for 10 min using 3.7% formaldehyde freshly dissolved in PBS followed by three washes using Tris-buffered saline supplemented with 1 mM CaCl_2 . Fixed specimens were permeabilized with 0.1% Triton X-100 (Sigma) in Blotto (3% dry milk in Tris-buffered saline with 1 mM CaCl_2) and incubated with Cy3-conjugated donkey anti-mouse secondary antibody (1:500 dilution) for 45 min. Fluorescence microscopy was performed using an inverted Nikon Diaphot microscope equipped with a Nikon 60x NA1.4 objective and epifluorescence optics. Images were collected using a 12-bit cooled charge-coupled device camera (Princeton Instruments) interfaced to a Macintosh computer.

cAMP accumulation measurement. cAMP accumulation was measure using the *cAMP dynamic 2* kit (Cisbio, Bedford, MA, USA) according to manufacturer's recommendations. Briefly, HEK293 cells transiently expressing either the WT-V2R, R137H-V2R, R137C-V2R or R137L-

V2R were transferred into a 384 well plate (5×10^4 cells/well). AVP or vehicle was then added to the cell suspension followed by 15 min incubation at room temperature. Thereafter, conjugate+lysis buffer as well as d2cAMP were added to each well followed by the addition of the anti-cAMP cryptate antibody. The plate was then incubated at room temperature for one hour and HTRF measured. Results were obtained by calculating the 665/620nm values ratio expressed in Delta F.

Reporter gene assay of cAMP signalling. HEK293 cells were transfected with the WT-V2R or mutant constructs along with the cAMP responsive luciferase reporter plasmid (containing 16 copies of the consensus cAMP response element (Vaisse et al., 2000)) and the *Renilla* luciferase reporter plasmid (pRL-CMV, Promega Corporation, to control for transfection efficiency) using Fugene 6 and according to the manufacturer's protocol. When stable cell lines were used (WT-V2R or R137L-V2R), cells were transfected with only the pCREluc plasmid. Twenty-four hours following transfection, cells were lysed and assayed for luciferase activity using the Dual Luciferase Reporter Assay System (Promega), as previously described (Stables *et al.*, 1999; Fluck *et al.*, 2002). Data are expressed as the mean luciferase activity, in arbitrary units, and normalized to WT-V2R-promoted luciferase activity.

cRNA synthesis, oocyte preparation, injection, and Electrophysiological recording. cDNA-containing plasmids were linearized with the PvuI restriction enzyme and used as templates for capped cRNA synthesis using mMESSAGE MACHINE kits (Ambion Corp.). *Xenopus* oocytes were prepared as described previously (Kovoor et al., 1997) and cRNA was injected (50 nl/oocyte) with a Drummond microinjector. Oocytes were incubated for 48 hr after injection in normal oocyte saline buffer solution (96 mM NaCl, 2 mM KCl, 1 mM MgCl₂, 1 mM CaCl₂, and 5 mM HEPES, pH 7.5) supplemented with sodium pyruvate (2.5 mM) and gentamycin (50 µg/ml) prior to their transfer to recording buffer (74 mM NaCl, 24 mM KCl, 1 mM MgCl₂, 1 mM CaCl₂, and 5 mM HEPES, pH 7.5) in order to enhance sensitivity for inward K⁺ conductance. For electrophysiological analysis, oocytes were clamped at -80 mV with two electrodes filled with 3 M KCl having resistances of 0.5-1.5 megohm, using a Geneclamp 500 amplifier and pCLAMP 9 software (Axon Instruments). All data were digitally recorded (Digidata, Axon Instruments) and low-pass filtered.

ERK1/2 phosphorylation assay. Cells transiently expressing the different V2R constructs were grown in 6-well plates and rendered quiescent by serum starvation for 16h prior to a 5 min stimulation with 1 μ M AVP. Plates were then put on ice and the cells were washed twice with ice-cold PBS and solubilized directly in 150 μ l of Laemmli sample buffer containing 50 mM dithiothreitol. The samples were sonicated for 15 sec and heated for 5 min at 95°C prior to SDS-PAGE. ERK1/2 phosphorylation was detected by immunoblotting and chemiluminescence using mouse monoclonal anti-P-ERK and anti-mouse HRP-conjugated antibodies. After densitometric quantification of phosphorylation, membranes were stripped of immunoglobulins and reprobed with a rabbit polyclonal anti-ERK antibody. ERK phosphorylation was normalized according to the protein loads by expressing the data as a ratio of P-ERK over total ERK. Immunoreactivities were determined by densitometric analysis of the films using the Quantity One software (Bio-Rad). Statistical analysis and curve fitting were done using the GraphPad Software (San Diego, CA). Statistical significance of the differences was assessed using one-way analysis of variance and post hoc Bonferroni's test.

RESULTS

Cell surface expression of R137H-, R137C- and R137L-V2R mutants. It has previously been shown that several mutations within the coding sequence of V2R affect the level of receptor cell surface expression (Bichet *et al.*, 1994; Wenkert *et al.*, 1996; Ranadive *et al.*, 2008). In particular, the R137H-V2R has been reported to have low steady state surface expression, owing in part to its constitutive internalization once it reaches the cell surface (Barak *et al.*, 2001; Bernier *et al.*, 2004; Hamdan *et al.*, 2007). To determine if substitutions of arginine 137 to either leucine or cysteine residues also affect receptor cell surface density, ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) were carried-out on intact HEK293 cells transiently expressing the R137C-, R137L-R137H- and wild type-(WT) V2R bearing a FLAG epitope at the N-terminus to allow immunodetection. Fig. 1A shows that, compared to the WT-V2R, the R137C and R137L exhibit a ~40% reduction in cell surface expression, which is equivalent to what is observed for the R137H-V2R. The reduced cell surface expression of one of the mutant receptors (R137L-V2R) was further confirmed by radioligand binding experiments using [³H]AVP as the tracer (Supplementary Fig. 1A). Saturable high-affinity binding was observed with both transiently expressing WT-V2R and R137L-V2R cells but significantly lower maximal binding was systematically observed in cells expressing the mutant receptor. Moreover, affinity towards AVP was similar for all V2R constructs, as determined by radio-ligand binding saturation experiments (see Supplementary Table 1).

To determine if, as shown for R137H-V2R, the reduced cell surface expression of the R137C- and R137L-V2R results from constitutive internalization, we quantitatively assessed the effect of a dynamin dominant negative mutant, DynK44A, that has been shown to inhibit both constitutive and agonist-induced internalization by preventing the pinching-off of the endocytic vesicles without preventing the assembly of the internalization machinery (Damke *et al.*, 1994; Hamdan *et al.*, 2007). As shown in Fig. 1A, co-transfecting DynK44A modestly increased the cell surface expression of the WT receptor (by less than 10%) whereas surface expression of R137H, R137C and R137L-V2R increased by 48%, 29% and 40%, respectively, indicating that constitutive endocytosis is involved in the reduced steady state cell surface expression of the three mutants.

To explore further the mechanism underlying the constitutive endocytosis, we took advantage of the recently developed BRET-based assay, monitoring the interaction between β -arrestin2 and the

β 2 subunit of the clathrin adaptor AP-2 (β 2-adaptin) (Hamdan et al., 2007). The basal BRET between β 2-adaptin-EYFP and β -arrestin2-luciferase was significantly higher in cells transiently expressing the R137C-, R137L- or R137H-V2R when compared to cells expressing the WT-V2R (Fig. 1B), indicating that the mutant receptors constitutively promote the assembly of the β -arrestin2/AP2 complex resulting into spontaneous endocytosis. In all cases, inhibition of this spontaneous endocytosis with DynK44A led to a significant increase of the BRET signal, reflecting the accumulation of the receptor/ β -arrestin/AP2 complex in the unsevered endocytotic vesicles (Fig. 1B).

Agonist-promoted internalization of R137H-, R137C- and R137L-V2R. In order to investigate if, in addition to their constitutive internalization, the R137C-, R137L- and R137H-V2R could still undergo agonist-promoted internalization, immunofluorescence microscopy, cell surface ELISA, and β -arrestin2/AP2 BRET experiments were performed on transiently expressing cells, in the presence or absence of AVP stimulation. As shown in Fig. 2A, the WT-V2R is located almost exclusively at the cell surface in the absence of AVP stimulation, while the R137C-, R137L- and R137H-V2R are seen in intracellular vesicles, confirming their constitutive endocytosis. AVP treatment (10 μ M) led to a massive redistribution of the WT-V2R from the plasma membrane into endocytic vesicles and promoted additional endocytosis of the mutant receptors. The ability of the mutant receptors to undergo agonist-promoted endocytosis despite their already high level of spontaneous endocytosis was further confirmed and quantified by cell surface ELISA (Fig. 2B). Similarly, although the β -arrestin2/AP2 BRET signal was already elevated for the three mutant receptors, 1 μ M AVP further increased the BRET signal (Fig. 2C), indicating that hormone binding promotes additional engagement of the endocytic machinery. Such agonist-promoted engagement of the endocytic machinery by the mutant receptors was further confirmed by performing dose-response curves of β -arrestin2 recruitment directly to the receptors by BRET using transiently expressed EYFP-tagged versions of the WT-, R137H-, R137C- and R137L-V2R, in combination with the *Rluc*-tagged β -arrestin construct (Table 1). The results show that the EC50 values are similar for all receptors, confirming that the mutations do not affect the affinity for AVP or the ability of the AVP-bound receptors to recruit β -arrestin2.

Signalling properties of the R137C and R137L-V2R mutants. It has been previously shown that the R137H substitution causes a loss of AVP-induced cAMP production (Barak *et al.*, 2001; Bernier *et al.*, 2004). For the R137L- and R137C-V2R, which were shown to promote elevated basal cAMP production, no information is available about the AVP-stimulated response. Basal and AVP-stimulated cAMP production was therefore investigated in cells transiently expressing the WT, R137H-, R137L or R137C-V2R. Whether measured using a cAMP-responsive reporter gene assay (CRE-luciferase) (Fig. 3A), or a FRET-based cAMP immune-detection assay (Fig. 3B), an elevated basal cAMP production was observed for both R137L- or R137C-V2R compared to WT-V2R, confirming their increased constitutive activity towards the cAMP production pathway. The higher basal cAMP production promoted by the R137C- and R137L-V2R was further exacerbated when preventing their internalization with DynK44A (Fig. 3B), suggesting that the manifestation of their constitutive activity is dampened by their concomitant endocytosis. The elevated basal cAMP levels observed did not result from different expression levels since clonal populations of cells stably expressing similar number of WT- and R137L-V2R (Supplementary Fig. 2 and Supplementary Table 1) confirmed that R137L-V2R promotes significantly higher cAMP production than its WT counterpart (Fig. 3C). It should be noted that, as was observed in transiently expressing cells, the affinity for [³H]AVP was the same for the WT and mutant form of the receptor (Supplementary Table 1). Despite the elevated basal activity observed in cells transiently expressing R137L- and R137C-V2R, no further increase in cAMP production could be detected following 1 μ M AVP stimulation (Fig. 4A); a loss of responsiveness that was also observed for the R137H-V2R. These results were further confirmed using the highly sensitive CRE-luciferase reporter gene assay in cells stably expressing the same level of WT- and R137L-V2R (see Supplementary Fig 2). Although the R137L-V2R basal activity was higher than the WT-V2R, no increase in luciferase activity could be observed after a 24 hours stimulation with 1 μ M AVP in cells expressing R137L-V2R whereas a 6-fold increase was observed in cells expressing the WT receptor (Fig. 4B).

The loss of AVP-promoted Gas pathway activation by V2R was further confirmed for the R137L mutant by monitoring GIRK channel activation in frog oocytes co-expressing Gas and the G protein-activated inwardly rectifying potassium channel subunits (GIRK1 and GIRK4) (Lim *et al.*, 1995; Kooor *et al.*, 1997). As shown in Fig. 4C, 1 μ M AVP stimulation induced a robust

inward current in oocytes expressing the WT-V2R while no response was detected in R137L-V2R expressing oocytes.

AVP binding to V2R has been shown to promote activation of the extracellular signal-regulated kinase (ERK1/2) (Pequeux et al., 2004). To assess whether substitution of R137 for C, L or H could also affect this signalling pathway, AVP-promoted ERK1/2 phosphorylation was measured in transiently expressing V2R cells. As expected, the WT-V2R receptor induced a robust ERK1/2 phosphorylation upon 1 μ M AVP stimulation whereas no AVP-induced phosphorylation of ERK1/2 was observed in cells expressing R137H-, R137C- or R137L-V2R (Fig. 5), indicating that the loss of AVP responsiveness is not limited to the cAMP production pathway.

Although elevated constitutive endocytosis and loss of both AVP-stimulated cAMP production and ERK1/2 activation are shared by R137H-, R137C- and R137L-V2R, the increased basal cAMP production promoted by R137L- and R137C-V2R was not observed for R137H-V2R, whether constitutive endocytosis was blocked or not (Fig. 3A and B), revealing at least one intrinsic difference (constitutive activity toward the cAMP pathway) between the R137 substitutions causing NDI vs NSIAD.

Maturation and pharmacological chaperoning of R137H-, R137C- and R137L-V2R. The R137H-V2R mutant has previously been shown to have impaired folding, leading to a decrease expression of the mature form of the receptor as monitored by its glycosylation state (Morello et Bichet, 2001). Such impaired maturation was partially corrected by sustained treatment with selective lipophilic ligands acting as pharmacological chaperones (Morello *et al.*, 2000; Bernier *et al.*, 2004; Bernier *et al.*, 2004). To determine if these properties are shared by R137L- and R137C-V2R, we assessed their maturation profiles in transiently expressing cells, in the absence and presence of the pharmacological chaperone SR121463. Our results show that, similarly to the NDI-associated R137H-V2R, the NSIAD-causing R137C and R137L substitutions affect receptor maturation, as indicated by a reduction of the fully glycosylated form (~50kDa) of the three mutant receptors compared to the WT (Fig. 6). Similarly to what was observed for R137H-V2R, the SR121463 treatment (10 μ M) favoured maturation of R137C- and R137L-V2R, as revealed by the marked increase of the fully glycosylated form of the receptor.

Effect of V2R-specific inverse agonist on the constitutive signalling of R137C and R137L-V2R mutants. It has previously been shown that, in addition to its pharmacological chaperone property, the V2R antagonist SR121463 is endowed with inverse agonist activity toward the artificially designed constitutively active mutant D136A-V2R (Morin et al., 1998). We therefore assessed the ability of this compound to silence the constitutive activity of transiently expressed R137C- and R137L-V2R. Fig. 7A shows that a short term (30 min) treatment with 10 μ M SR121463 did not affect the elevated basal cAMP production promoted by R137C and R137L, indicating that SR121463 does not act as an inverse agonist on these mutants. Longer term (16h) treatment with SR121463 also did not reveal any inverse agonist effects. In fact, it potentiated the elevated basal cAMP accumulation observed in cells expressing R137C- and R137L-V2R. This potentiating effect is most likely due to the increased number of constitutively active receptor at the cell surface, due to the pharmacological chaperone property of SR121463 (Fig. 6).

Since R137H, R137C- and R137L-V2R were all found to promote constitutive association of β -arrestin2 with AP2, leading to the internalization of the receptor (Fig. 2B), we assessed whether it could be blocked by SR121463. As shown in Fig. 7B, the elevated BRET between β -arrestin2-Rluc and β 2-adaptin-EYFP promoted by the transient expression of the three mutant receptors was not reduced upon SR121463 treatment. In fact, the treatment tended to increase the BRET signal promoted by the receptors most likely, again, as a result of the SR121463-promoted elevation of cell surface receptor number.

Combined effects of misfolding and constitutive internalization on the constitutive activity of the R137C- and R137L-V2R mutants. Our results show that both constitutive internalization and partial intracellular retention of the NSIAD-causing R137C- and R137L-V2R contribute to lower cell surface receptor levels. Together, these two phenomena should therefore reduce the extent of constitutive activity detected in cells expressing the NSIAD-causing mutant receptors. To test this hypothesis, we assessed the effect of inhibiting receptor endocytosis (using DynK44A co-transfection) in combination with increasing receptor targeting to the cell surface (using 10 μ M SR121463) on basal cAMP production. As shown in Fig. 8, the combined over-expression of DynK44A and long term SR121463 treatment resulted in an additive increase in cAMP accumulation in HEK293 cells expressing the R137C- or R137L-V2 receptors but not in cells expressing either the R137H- or the WT-V2 receptors.

DISCUSSION

Our characterization of the molecular defects of NSIAD-causing mutant R137L- and R137C-V2R has revealed a high degree of similarity with the previously described NDI-causing mutant R137H-V2R. First, the three mutant receptors were shown to undergo elevated constitutive endocytosis, as revealed by a considerably reduced steady state cell surface level that could be partly normalized by inhibiting constitutive internalization. These results are consistent with a recent study reporting that the three receptors were constitutively localized in intra-cellular vesicles (Kocan *et al.*, 2009). For the three mutant receptors, our results show that the elevated endocytosis arises from the same mechanism involving the constitutive engagement of the clathrin-dependent pathway, as revealed by the increased basal BRET observed between β -arrestin2 and β 2-adaptin. These results are in agreement with previous reports demonstrating that R137H-V2R, as well as R137L- and R137C-V2R spontaneously recruit β -arrestin2 in the absence of agonist stimulation (Bernier *et al.*, 2004; Kocan *et al.*, 2009). Despite their constitutive internalization, the three mutant receptors can still recruit β -arrestin and engage the β -arrestin2/AP2 complex upon AVP stimulation, leading to additional internalization. These results indicate that the substitutions only partially mimic or stabilize the receptor conformation recruiting the endocytic machinery.

The three mutant receptors also shared altered maturation, as revealed by a decreased proportion of the fully glycosylated form of the receptors, indicative of reduced Golgi processing. This altered processing is also revealed by the ability of pharmacological chaperones to promote receptor maturation and cell surface targeting. These results contrast with the recent suggestion, based on qualitative immunofluorescence analyses, that R137C- and R137L-V2R forward trafficking is not impaired and that their constitutive endocytosis is solely responsible for the decreased cell surface expression (Kocan *et al.*, 2009). The authors concluded that this represents a major difference between R137H-V2R on one hand and R137C- and R137L-V2R on the other. In contrast, our results show that both impaired maturation and elevated constitutive endocytosis contribute to the reduced steady state cell surface expression of R137C- and R137L- as well as R137H-V2R. Consistent with this notion, inhibition of endocytosis only partially restored cell surface expression of the three mutant receptors.

An additional characteristic shared by the three mutants is their inability to promote both cAMP production and ERK1/2 activation upon AVP stimulation, indicating a common loss of functional responsiveness. One cannot exclude that the mutant receptors could allow a weak agonist-promoted G α s signalling that fell below the detection threshold. However, this is unlikely since no AVP-stimulated cAMP production could be observed for R137L, even when the highly amplified CRE-Luc reporter assay was used. The loss of responsiveness does not originate from a loss of AVP binding to the receptor since AVP affinity, as determined by radio-ligand binding studies, were similar for all receptors studied and, as indicated above, AVP-induced recruitment of the endocytic machinery and subsequent endocytosis was observed for all mutant receptors. The fact that AVP is able to promote internalization but is unable to stimulate detectable cAMP production or ERK1/2 activation suggests that the active conformation required for β -arrestin2 and downstream endocytic effectors recruitment are different from those leading to G α s and ERK1/2 activation.

The only difference observed between the loss-of-function R137H mutant and the two gain-of-function mutants R137C- and R137L-V2R resides in their basal constitutive activity toward the cAMP pathway. Indeed, whereas R137H-V2R basal activity is undistinguishable from that of the WT-receptor, R137C- and R137L-V2R promoted higher basal cAMP levels in accordance with what we previously reported (Feldman et al., 2005).

Interestingly, the elevated basal activity of the R137C and R137L-V2R was observed despite the constitutive recruitment of β -arrestin2, known to abrogate receptor-promoted Gas signalling (Barki-Harrington et Rockman, 2008). This raises the intriguing possibility that the balance between the constitutive engagement of Gas and β -arrestin2 may determine the extent of basal cAMP production and may explain the difference between the NSIAD and NDI-causing mutations described herein.

Inverse agonists have recently emerged as a group of bioactive compounds that can bind to constitutively active receptors and reduce their basal signalling (Rodriguez-Puertas et Barreda-Gomez, 2006) and thus could represent a potential therapeutic avenue. The inverse agonist SR121463, which was shown to reduce the constitutive cAMP production promoted by the artificially designed D136A-V2R, was however unable to silence the constitutive activity of R137C- and R137L-V2R. In fact, the effect of the compound increased basal cAMP level promoted by the receptors, most likely as a consequence of the increased receptor number

reaching the cell surface due to its pharmacological chaperone action. The lack of inverse agonist effect of SR121463 on the R137C- and R137L-V2R-promoted cAMP production is consistent with the absence of therapeutic activity in hyponatremic NSIAD patients carrying the mutation leading to the R137C substitution in their *AVPR2* gene (Decaux et al., 2007). At the mechanistic level, the inability of SR121463 to silence the constitutive activity of R137C- and R137L-V2R suggests that the structural changes causing the constitutive activation of the mutant receptors cannot be reversed by the inverse agonist binding. Although less likely, the resistance of the spontaneous activity to the inhibitory action of SR121463 could indicate that the elevated cAMP production could result from the increased expression or activation of another Gas or adenylyl cyclase-activating protein as a result of the expression of the mutant V2R.

Although inactive for treating NSIAD patients harbouring the R137C and R137L substitutions, the pharmacological chaperone properties of SR121463 made it an effective treatment for NDI patients carrying R137H-V2R (Bernier et al., 2006). In contrast, the ideal compound to treat NSIAD would have inverse agonist efficacy toward the cAMP pathway while lacking pharmacological chaperone activity. Thus screening for such ligands, using R137C and R137L-V2R expressing cells, would be a rational approach for the discovery of a NSIAD treatment. Reducing cell surface expression of the receptor by either inhibiting receptor targeting to the cell surface or promoting its endocytosis could also represent alternative therapeutic avenues since reduced steady state surface receptor levels would result in lower basal cAMP production. AVP administration could represent such a therapeutic avenue for these patients since we found that AVP promoted a reduction in cell surface receptor without activating the cAMP or the ERK1/2 pathways.

In conclusion, our study shows that, although they lead to some common receptor anomalies, distinct substitutions occurring at a same position also have distinct consequences that are responsible for the opposite clinical outcomes observed for R137H vs R137L/C. This illustrates the importance of a detailed characterization of the functional consequences of receptor mutants in order to understand the molecular basis of the disease and to provide clues for the development of therapeutic avenues.

ACKNOWLEDGEMENTS:

We would like to thank Monique Lagacé for valuable insights and thorough reading of the manuscript.

References:

Ball SG (2007) Vasopressin and disorders of water balance: the physiology and pathophysiology of vasopressin. *Ann Clin Biochem* **44**(Pt 5):417-431.

Barak LS, Oakley RH, Laporte SA and Caron MG (2001) Constitutive arrestin-mediated desensitization of a human vasopressin receptor mutant associated with nephrogenic diabetes insipidus. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**(1):93-98.

Barki-Harrington L and Rockman HA (2008) Beta-arrestins: multifunctional cellular mediators. *Physiology (Bethesda)* **23**:17-22.

Bernier V, Bichet DG and Bouvier M (2004a) Pharmacological chaperone action on G-protein-coupled receptors. *Curr Opin Pharmacol* **4**(5):528-533.

Bernier V, Lagace M, Lonergan M, Arthus MF, Bichet DG and Bouvier M (2004b) Functional rescue of the constitutively internalized V2 vasopressin receptor mutant R137H by the pharmacological chaperone action of SR49059. *Mol Endocrinol* **18**(8):2074-2084.

Bernier V, Morello JP, Zarruk A, Debrand N, Salahpour A, Lonergan M, Arthus MF, Laperriere A, Brouard R, Bouvier M and Bichet DG (2006) Pharmacologic chaperones as a potential treatment for X-linked nephrogenic diabetes insipidus. *J Am Soc Nephrol* **17**(1):232-243.

Bichet DG, Birnbaumer M, Lonergan M, Arthus MF, Rosenthal W, Goodyer P, Nivet H, Benoit S, Giampietro P, Simonetti S and et al. (1994) Nature and recurrence of AVPR2 mutations in X-linked nephrogenic diabetes insipidus. *Am J Hum Genet* **55**(2):278-286.

Charest PG and Bouvier M (2003) Palmitoylation of the V2 vasopressin receptor carboxyl tail enhances beta-arrestin recruitment leading to efficient receptor endocytosis and ERK1/2 activation. *J Biol Chem* **278**(42):41541-41551.

Damke H, Baba T, Warnock DE and Schmid SL (1994) Induction of mutant dynamin specifically blocks endocytic coated vesicle formation. *J Cell Biol* **127**(4):915-934.

Decaux G, Vandergheynst F, Bouko Y, Parma J, Vassart G and Vilain C (2007) Nephrogenic syndrome of inappropriate antidiuresis in adults: high phenotypic variability in men and women from a large pedigree. *J Am Soc Nephrol* **18**(2):606-612.

Feldman BJ, Rosenthal SM, Vargas GA, Fenwick RG, Huang EA, Matsuda-Abedini M, Lustig RH, Mathias RS, Portale AA, Miller WL and Gitelman SE (2005) Nephrogenic syndrome of inappropriate antidiuresis. *N Engl J Med* **352**(18):1884-1890.

Fluck CE, Martens JW, Conte FA and Miller WL (2002) Clinical, genetic, and functional characterization of adrenocorticotropin receptor mutations using a novel receptor assay. *J Clin Endocrinol Metab* **87**(9):4318-4323.

Fujiwara TM and Bichet DG (2005) Molecular biology of hereditary diabetes insipidus. *J Am Soc Nephrol* **16**(10):2836-2846.

Gage RM, Kim KA, Cao TT and von Zastrow M (2001) A transplantable sorting signal that is sufficient to mediate rapid recycling of G protein-coupled receptors. *J Biol Chem* **276**(48):44712-44720.

Hamdan FF, Rochdi MD, Breton B, Fessart D, Michaud DE, Charest PG, Laporte SA and Bouvier M (2007) Unraveling G protein-coupled receptor endocytosis pathways using real-time monitoring of agonist-promoted interaction between beta-arrestins and AP-2. *J Biol Chem* **282**(40):29089-29100.

Klein U, Muller C, Chu P, Birnbaumer M and von Zastrow M (2001) Heterologous inhibition of G protein-coupled receptor endocytosis mediated by receptor-specific trafficking of beta-arrestins. *J Biol Chem* **276**(20):17442-17447.

Kocan M, See HB, Sampaio NG, Eidne KA, Feldman BJ and Pflieger KD (2009) Agonist-independent interactions between beta-arrestins and mutant vasopressin type II receptors associated with nephrogenic syndrome of inappropriate antidiuresis. *Mol Endocrinol* **23**(4):559-571.

Kovoor A, Nappay V, Kieffer BL and Chavkin C (1997) Mu and delta opioid receptors are differentially desensitized by the coexpression of beta-adrenergic receptor kinase 2 and beta-arrestin 2 in xenopus oocytes. *J Biol Chem* **272**(44):27605-27611.

Lim NF, Dascal N, Labarca C, Davidson N and Lester HA (1995) A G protein-gated K channel is activated via beta 2-adrenergic receptors and G beta gamma subunits in Xenopus oocytes. *J Gen Physiol* **105**(3):421-439.

Morello JP and Bichet DG (2001) Nephrogenic diabetes insipidus. *Annu Rev Physiol* **63**:607-630.

Morello JP, Salahpour A, Laperriere A, Bernier V, Arthus MF, Lonergan M, Petaja-Repo U, Angers S, Morin D, Bichet DG and Bouvier M (2000) Pharmacological chaperones rescue cell-surface expression and function of misfolded V2 vasopressin receptor mutants. *J Clin Invest* **105**(7):887-895.

Morin D, Cotte N, Balestre MN, Mouillac B, Manning M, Breton C and Barberis C (1998) The D136A mutation of the V2 vasopressin receptor induces a constitutive activity which permits discrimination between antagonists with partial agonist and inverse agonist activities. *FEBS Lett* **441**(3):470-475.

Pequeux C, Keegan BP, Hagelstein MT, Geenen V, Legros JJ and North WG (2004) Oxytocin- and vasopressin-induced growth of human small-cell lung cancer is mediated by the mitogen-activated protein kinase pathway. *Endocr Relat Cancer* **11**(4):871-885.

Ranadive SA, Ersoy B, Favre H, Cheung CC, Rosenthal SM, Miller WL and Vaisse C (2008) Identification, characterization and rescue of a novel vasopressin-2 receptor mutation causing nephrogenic diabetes insipidus. *Clin Endocrinol (Oxf)*.

Rochdi MD and Parent JL (2003) Galphaq-coupled receptor internalization specifically induced by Galphaq signaling. Regulation by EBP50. *J Biol Chem* **278**(20):17827-17837.

Rodriguez-Puertas R and Barreda-Gomez G (2006) Development of new drugs that act through membrane receptors and involve an action of inverse agonism. *Recent Patents CNS Drug Discov* **1**(2):207-217.

Rovati GE, Capra V and Neubig RR (2007) The highly conserved DRY motif of class A G protein-coupled receptors: beyond the ground state. *Mol Pharmacol* **71**(4):959-964.

Spanakis E, Milord E and Gragnoli C (2008) AVPR2 variants and mutations in nephrogenic diabetes insipidus: review and missense mutation significance. *J Cell Physiol* **217**(3):605-617.

Stables J, Scott S, Brown S, Roelant C, Burns D, Lee MG and Rees S (1999) Development of a dual glow-signal firefly and Renilla luciferase assay reagent for the analysis of G-protein coupled receptor signalling. *J Recept Signal Transduct Res* **19**(1-4):395-410.

Treschan TA and Peters J (2006) The vasopressin system: physiology and clinical strategies. *Anesthesiology* **105**(3):599-612; quiz 639-540.

Vaisse C, Clement K, Durand E, Hercberg S, Guy-Grand B and Froguel P (2000) Melanocortin-4 receptor mutations are a frequent and heterogeneous cause of morbid obesity. *J Clin Invest* **106**(2):253-262.

Wenkert D, Schoneberg T, Merendino JJ, Jr., Rodriguez Pena MS, Vinitsky R, Goldsmith PK, Wess J and Spiegel AM (1996) Functional characterization of five V2 vasopressin receptor gene mutations. *Mol Cell Endocrinol* **124**(1-2):43-50.

Footnotes:

This work was supported by research grants from the National Institute of Health [Grant 1 K08 MH68691-01] and the Kidney Foundation of Canada as well as studentships, fellowships and awards from the Canadian Institute of Health Research; the National Institute of Health training grant [1 K08 MH68691-01]; the Fond de la Recherche en Santé du Québec and the Canada Research Chair in Signal Transduction and Molecular Pharmacology.

FIGURE LEGENDS

Fig. 1. Cell surface expression of the WT-, R137H-, R137C- and R137L-V2R and their constitutive internalization. **A**, HEK293 cells, transiently expressing the indicated V2R constructs along with the over-expression of DynK44A or an empty vector (pcDNA3), were assessed for receptor surface expression by ELISA using an anti-FLAG antibody, as described in *Material and Methods*. **B**, HEK293 cells stably expressing the β 2-adaptin-EYFP subunit of the AP2 complex were transfected with the indicated V2R constructs and β -arrestin2-Rluc, with or without DynK44A over-expression. β -arrestin2 and AP2 interaction was monitored by BRET. Data shown are the mean \pm S.E.M. of three to five independent experiments. Statistical significance of the difference was assessed using paired Student's *t* test. *** $p < 0.001$; ** $p < 0.01$.

Fig. 2. Agonist-induced internalization of wild-type and mutant V2R assessed by fluorescence microscopy, cell surface ELISA and BRET assays. **A**, HEK293 cells transiently expressing the FLAG-tagged WT-V2R (panels a, b), R137L-V2R (c, d), R137C-V2R (e, f) or R137H-V2R (g, h) were surface-labelled with anti-FLAG monoclonal antibody as described in *Materials and Methods* and incubated in the absence (a, c, e, g) or presence (b, d, f, h) of 10 μ M AVP for 30 minutes prior to fixation. Representative epifluorescence images are shown. **B**, HEK293 cells were transfected with the indicated constructs and receptor internalization was determined by measuring cell surface receptor expression following the incubation of the transfected cells in the absence or presence of AVP (1 μ M) using the cell surface ELISA assay and anti-FLAG antibody. **C**, HEK293 cells stably expressing the EYFP-fused β 2-adaptin subunit of the AP2 complex were transfected with the indicated V2R constructs and β -arrestin2-Rluc. BRET¹ measurements of the β -arrestin2/AP2 biosensor were done after 20 min incubation with or without AVP (1 μ M). Data shown are the mean \pm S.E.M. of three to five independent experiments. Statistical significance of the difference was assessed using paired Student's *t* test. *** $p < 0.001$. One-way ANOVA analysis of variance combined with Tukey's multiple comparison test was also performed. $\square\square p < 0.01$.

Fig. 3. Constitutive cAMP signalling of the mutant V2Rs. **A**, HEK293 cells were co-transfected with the indicated V2R and the CRE-luciferase reporter constructs, and lysates were

assayed for luciferase 24 hours later. In each experiment, reporter gene activity was measured in three replicate wells and the average value from cells expressing R137L-, R137C- or R137H-V2R mutant was normalized to the average value from cells expressing WT-V2R. The bars indicate the mean of normalized luciferase activity across three independent experiments. **B**, HEK293 cells were co-transfected with the indicated receptors and either the DynK44A construct or a control plasmid (pcDNA3). cAMP production was measured using a HTRF-based technology as described in *Material and Methods*. **C**, Stably transfected HEK293 cell clones expressing FLAG-tagged WT- or R137L-V2R, that were matched for receptor expression (see Supplementary Fig 2), were transfected with the CRE-luciferase reporter construct and lysates were assayed for luciferase activity 24 hours later. In each experiment, reporter gene activity was measured in three replicate wells and the average value from cells expressing R137L-V2R mutant was normalized to the average value from cells expressing WT-V2R. Data shown are the mean \pm S.E.M. of three to five independent experiments. Statistical significance of the difference was assessed using paired Student's *t* test. *** $p < 0.001$; * $p < 0.05$. One-way ANOVA analysis of variance combined with Tukey's multiple comparison test was also performed. $\square\square$ $p < 0.01$; \square $p < 0.05$.

Fig. 4. AVP-dependent signalling and G protein coupling estimated by cAMP production measurement and potassium channel currents in oocytes. **A**, HEK293 cells were transfected with WT or mutant V2R constructs, as indicated. Agonist-induced cAMP production was assessed after 15 min incubation in the presence or absence of AVP (1 μ M) using a HTRF-based method, as described in *Material and Methods*. **B**, HEK293 cells stably expressing the indicated V2R were transfected with the CRE-luciferase reporter construct, incubated in the absence or presence of 1 μ M AVP for 24 hours, and lysed for luciferase activity measurements. In each experiment, triplicate wells were assayed for each condition and the luminescence units measured from AVP-exposed cells were normalized to the WT-V2R expressing cells not exposed to AVP. Data shown are the mean \pm SEM from three independent experiments. **C**, Oocytes were injected with 4ng cRNA of either WT-V2R or the R137L-V2R mutant along with 1ng each of *G α s*, *GIRK1* and *GIRK4* cRNA. Current amplitude produced by the application of AVP was then measured. The inset shows a representative trace of AVP evoked current in an oocyte injected with either WT-V2R cRNA (thick grey trace) or mutant R137L-V2R cRNA (thin

black trace). The horizontal bar above the traces indicates AVP application. Data shown are the mean \pm S.E.M. of three to five independent experiments. Statistical significance of the difference was assessed using one-way ANOVA analysis of variance combined with Tukey's multiple comparison test. $\square\square p<0.01$.

Fig. 5. V2R-promoted MAPK activation. AVP-induced MAPK activation was assessed in HEK293 cells transfected with the indicated V2R constructs. Following 5 min incubation in the presence (+) or absence (-) of AVP (1 μ M), cells were lysed in Laemmli sample buffer and extracts resolved by SDS-PAGE. MAPK activity was detected by Western blot using a phospho-specific anti-ERK1/2 antibody (P-ERK1/2). Expression level of ERK1/2 was controlled using an antibody directed against the total kinase population (ERK1/2). Data are expressed as the percentage of P-ERK/ERK of the level observed for AVP-stimulated WT-V2R conditions. Data represent the mean \pm S.E.M. of at least three independent experiments. The western blot shown is representative of three independent experiments.

Fig. 6. Effects of the R137C-, R137L-V2R substitutions on receptor maturation profile. HEK293 cells transfected with the indicated receptors were incubated in the absence (upper panel) or presence (lower panel) of SR121463 (10 μ M) for 16 hours. Cells extracts were then resolved by SDS-PAGE and receptors visualized by western blotting using an anti-FLAG antibody. Filled arrow (\blacktriangleright) shows the fully glycosylated mature form of V2R. Data shown are representative of three to four experiments.

Fig. 7. Effect of V2R inverse agonist SR121463 on the constitutive cAMP production and constitutive endocytosis promoted by the R137C- and R137L-V2R. **A**, HEK293 cells were transfected with the indicated constructs. Forty-eight hours later, cells were incubated for another 16 hours in the absence or presence of SR121463 (10 μ M) and basal cAMP production was measured using a HTRF-based technology, as described in *Material and Methods*. **B**, HEK293 cells stably expressing β 2-adaptin-EYFP were transfected with the β -arrestin2-Rluc and the indicated receptor constructs. Cells were subsequently incubated for 16 hrs in the presence or absence of SR121463 (10 μ M) and BRET¹ measured as described in *Material and Methods*.

Fig. 8. Combined effects of misfolding and constitutive internalization on the constitutive activity of the R137C- and R137L-V2R. HEK293 cells were transfected with the indicated V2R construct and either DynK44A or a control plasmid. Cells were then incubated in the presence or absence of SR121463 (10 μ M) for 16 hours and basal cAMP production was measurement using a HTRF-based technology. Data shown are the mean \pm S.E.M. of three to five independent experiments. Statistical significance of the difference was assessed using paired Student's *t* test. *** $p < 0.001$; ** $p < 0.01$. One-way ANOVA analysis of variance combined with the Tukey's multiple comparison test was also performed. $\alpha\alpha\alpha p < 0.001$; $\alpha\alpha p < 0.01$.

Table 1: AVP-induced β -arrestin2 recruitment potencies.

EC50 were determined, as described in *Materials and Methods*. Data shown are the mean \pm S.E.M. of three independent experiments.

Receptor expressed	Log EC50 (M)
WT-V2R	-9.44 \pm 0.09
R137H-V2R	-9.53 \pm 0.12
R137C-V2R	-9.34 \pm 0.19
R137L-V2R	-9.64 \pm 0.17

Figure 1

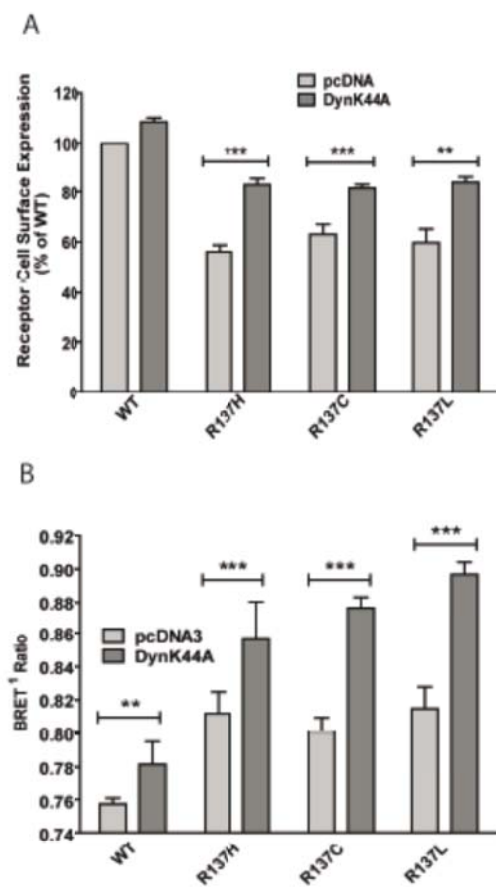


Figure 2

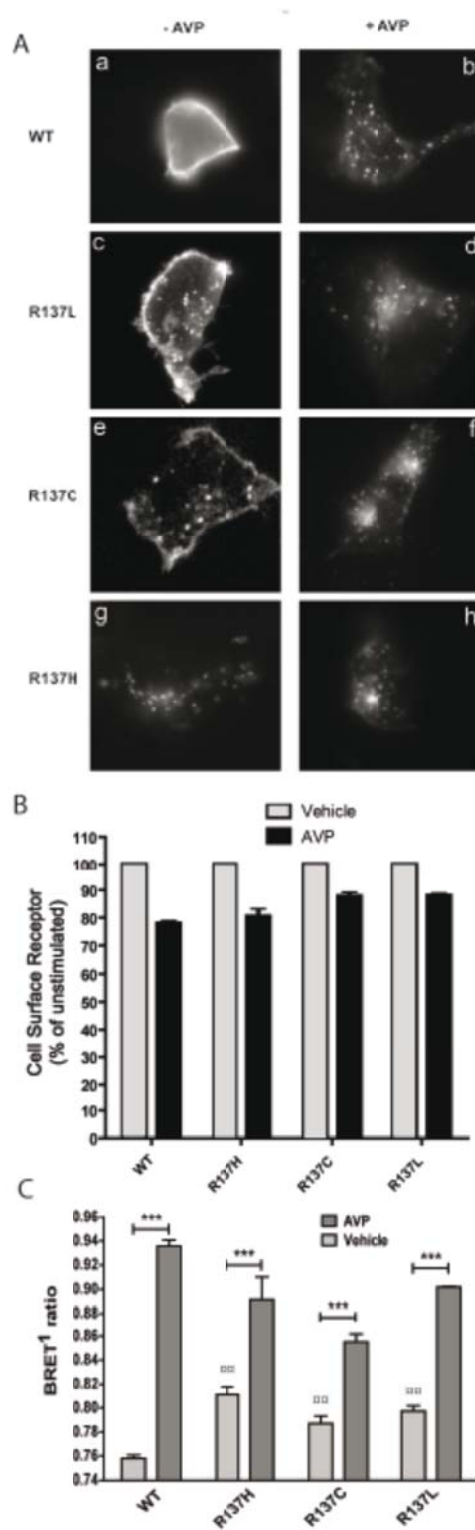


Figure 3

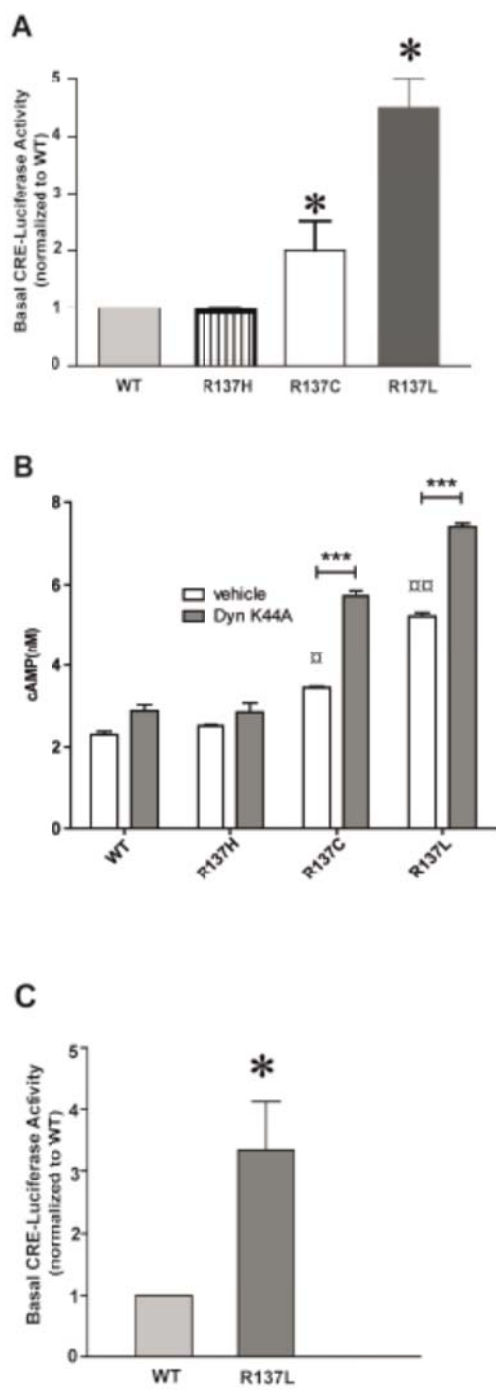


Figure 4

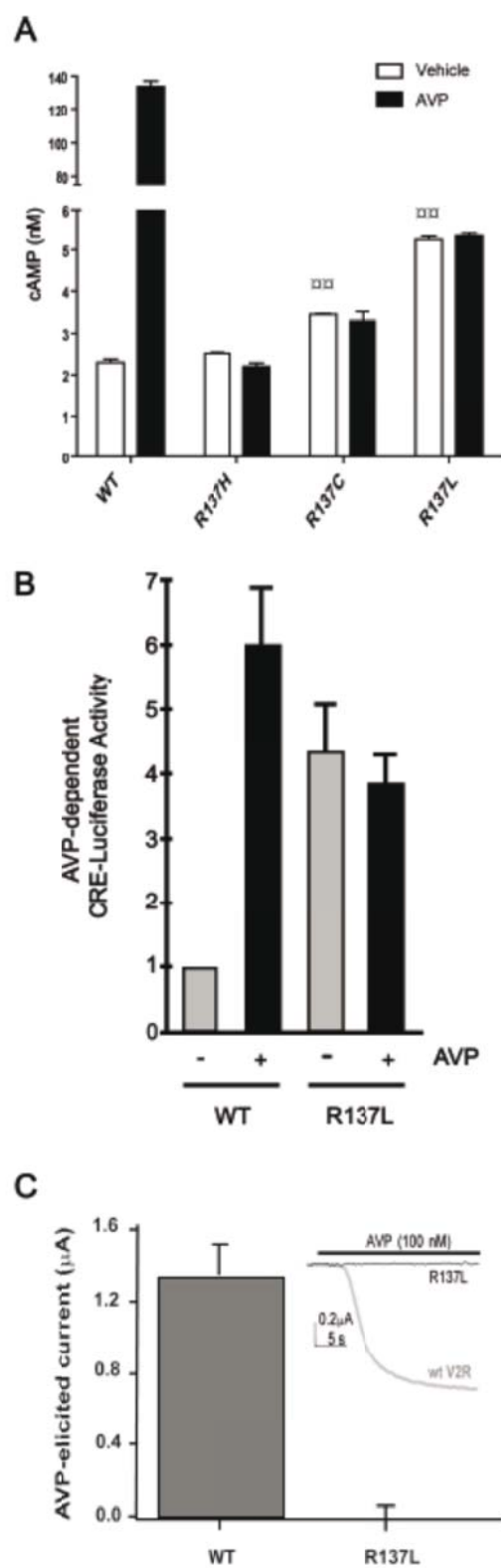


Figure 5

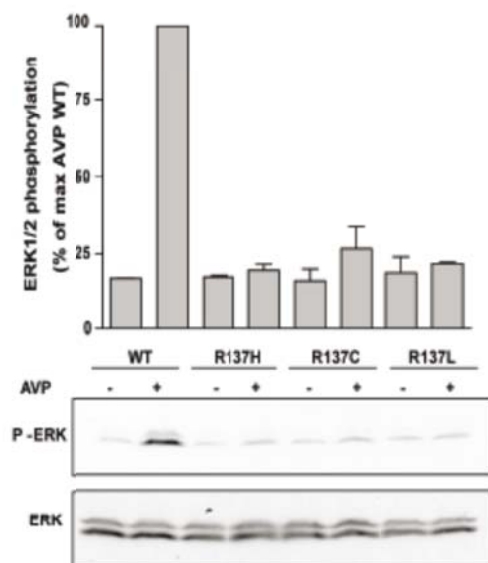


Figure 6

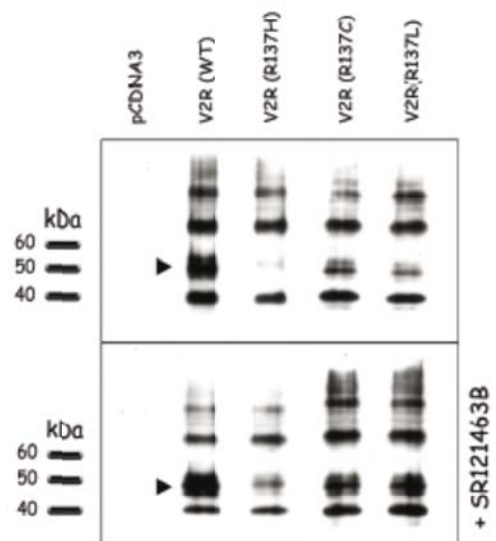


Figure 7

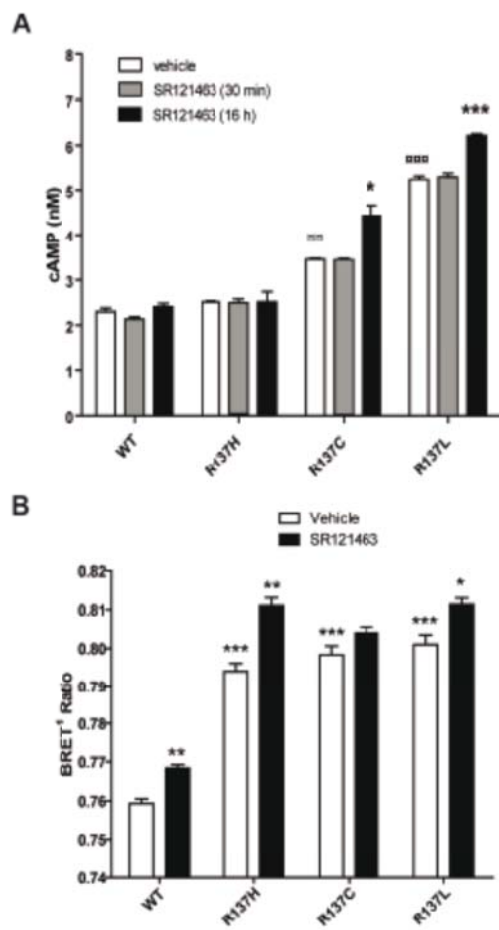
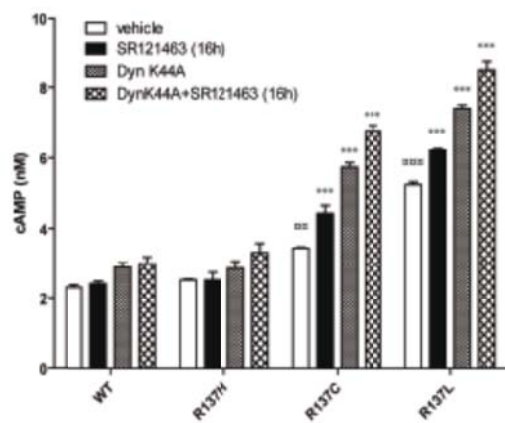
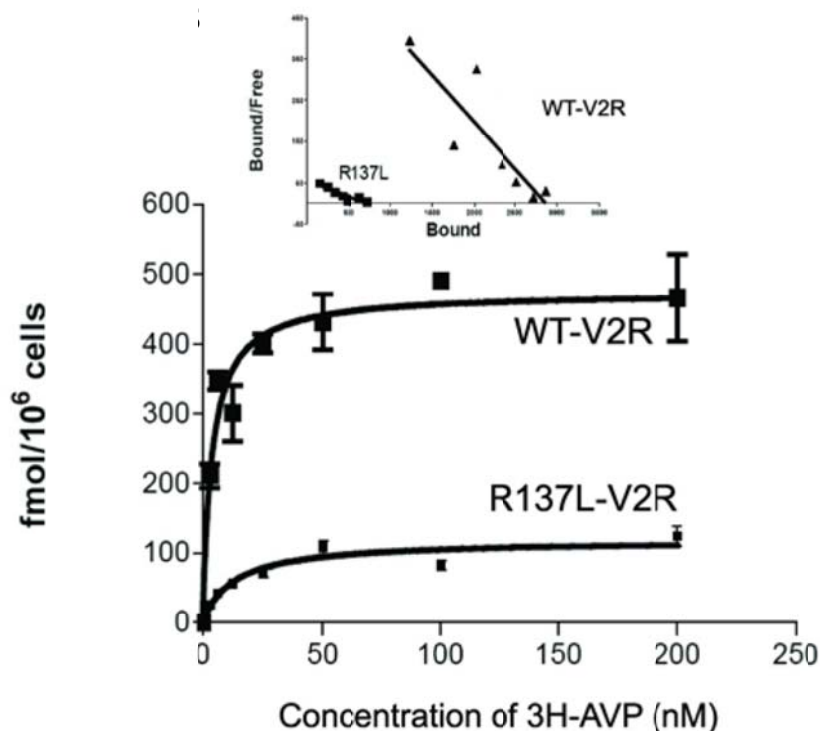


Figure 8

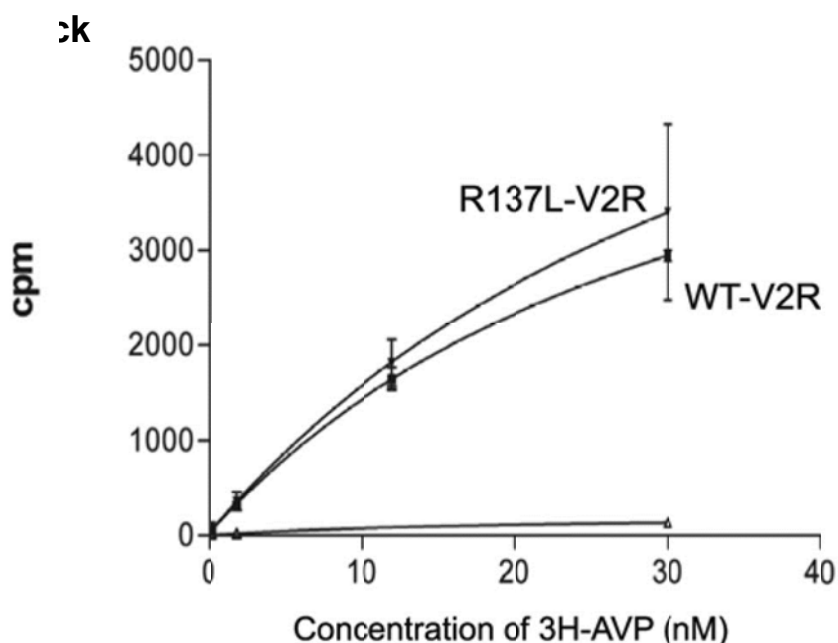




Supplementary Fig. 1. Receptor cell surface expression determined by radioligand binding assay. HEK293 cells were transiently transfected with the indicated receptor expression constructs and assayed in cell suspension using a variation of a previously published method (Tsao and von Zastrow, 2000). Equivalent number of cells were aliquoted into 96-well plates and incubated for 4 hours at 4°C with the indicated concentrations of [³H]-AVP. Incubations were terminated by vacuum filtration through glass fiber filters (Packard Instruments) and repeated washes with ice-cold Tris-buffered saline, pH 7.4. Bound radioactivity was determined by scintillation counting (Scintiverse, Fisher) using a Packard Tri-Carb 2100TR instrument. Normalized saturation isotherms were plotted, and binding parameters were determined by non-linear curve fitting to a single-site binding model using the GraphPad software. Results shown are representative of three independent experiments where each points correspond to the mean ± standard deviation from triplicates. Inset, scatchard transformation of the mean binding data..

Reference:

Tsao PI and von Zastrow M (2000) Type-specific sorting of G protein-coupled receptors after endocytosis. *J Biol Chem* **275**(15):11130-11140.



Supplementary Fig. 2. Cell surface expression of WT- and R137L-V2R stable cell lines. HEK293 cells stably expressing WT-V2R or R137L-V2R were selected from similar surface receptor immunoreactivity. Cell surface expression was confirmed using a whole cell radioligand binding assay (Barak et al., 2001; Morin et al., 1998). HEK293 cells plated into 12-well plates were washed twice in ice-cold PBS/2% BSA and incubated with the indicated concentration of [³H]-AVP (Perkin-Elmer Life Sciences, 68.5 Ci/mmol) for 4 h at 4 degree Celcius. The binding mixture was removed by aspiration and cells washed three times with cold PBS/ 2% BSA. Cell-bound [³H]-AVP was extracted with 250 μ l of 0.5 M NaOH in PBS, neutralized with an equal volume of 0.5 M HCl, and measured using a liquid scintillation counter. Nonspecific binding was determined in the presence of a 100-fold excess of unlabeled AVP. The amount of specifically bound radioligand was normalized to total protein in the cell extract. Each assay determinations were averaged from three replicate wells. A representative binding curve (from a total of five experiments) is shown where each point correspond to the mean value from triplicates. Specific binding measured at 30 nM yielded an estimated Bmax of $0.21 \pm .08$ and 0.22 ± 0.08 pmol/mg protein for WT-V2R and R137L-V2R, respectively. No detectable binding was measured in non-transfected HEK293 cells (Mock).

References:

- Barak LS, Oakley RH, Laporte SA and Caron MG (2001) Constitutive arrestin-mediated desensitization of a human vasopressin receptor mutant associated with nephrogenic diabetes insipidus. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**(1):93-98.
- Morin D, Cotte N, Balestre MN, Mouillac B, Manning M, Breton C and Barberis C (1998) The D136A mutation of the V2 vasopressin receptor induces a constitutive activity which permits discrimination between antagonists with partial agonist and inverse agonist activities. *FEBS Lett* **441**(3):470-475.

Supplementary Table 1: Radio-ligand binding data of all V2R constructs used in this study. Kd and Bmax were determined as described in *Methods* (see below). Values are expressed as the mean \pm SD of at least two independent experiments.

Stably expressing cell lines			Transient expression	
Receptor	KD values	Bmax	Receptor	Kd values
	<i>nM</i>	<i>pmol/mg protein</i>		<i>nM</i>
WT	3.2 \pm 0.8	0.21 \pm .08	FLAG-WT	7.26 \pm 1.20
R137L	8.3 \pm 1.9	0.22 \pm 0.08	FLAG-R137H	63.82 \pm 40.01
			FLAG-R137C	12.58 \pm 3.06
			FLAG-R137L	16.71 \pm 2.09
			EYFP-WT	10.58 \pm 1.49
			EYFP-R137H	10.21 \pm 1.79
			EYFP-R137C	9.54 \pm 1.49
			EYFP-R137L	18.61 \pm 2.09

Methods: HEK293 cells stably or transiently expressing the specified V2R constructs were subjected to whole cell radio-ligand binding assays (Barak et al., 2001; Morin et al., 1998). Cells plated into 12-well plates were washed twice in ice-cold PBS/2% BSA and incubated with increasing concentrations (0.76–40 nM) of [³H]AVP (Perkin-Elmer Life Sciences, 68.5 Ci/mmol) for 2 h at 4°C. The binding medium was removed by aspiration and cells washed with cold PBS/2% BSA. Cell-bound [³H]AVP was extracted with 250 μ l of 0.5 M NaOH, neutralized with an equal volume of 0.5 M HCl, and measured using a liquid scintillation counter. Nonspecific binding was determined in parental cells not expressing the receptor. Kd and Bmax values were determined using the GraphPad Prism software.

References:

Barak LS, Oakley RH, Laporte SA and Caron MG (2001) Constitutive arrestin-mediated desensitization of a human vasopressin receptor mutant associated with nephrogenic diabetes insipidus. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**(1):93-98.

Morin D, Cotte N, Balestre MN, Mouillac B, Manning M, Breton C and Barberis C (1998) The D136A mutation of the V2 vasopressin receptor induces a constitutive activity which permits discrimination

ARTICLE 3

A novel NSIAD-causing mutation leads to a constitutive activation of the vasopressin type 2 receptor that can be inhibited by inverse agonists

Eric Carpentier*¹, Larry A. Greenbaum*², Driss Rochdi¹, Daniel G. Bichet³ & Michel Bouvier¹

¹ Department of Biochemistry, Groupe de recherche universitaire sur le médicament and Institute of Research in Immunology and Cancer, Université de Montréal. ² Emory University and Children's Healthcare of Atlanta, Georgia and ³ Department of Medicine and Physiology, Université de Montréal, and Unité de recherche clinique, Centre de recherche et Service de néphrologie, Hôpital du Sacré-Coeur de Montréal, Montréal, Qc, Canada

*These authors have contributed equally to this work

Cet article a été soumis au New England Journal of Medicine et est en attente de publication. Des données cliniques seront ajoutées au document dès leur disponibilité.

Résumé

Les patients atteints du syndrome néphrogénique de l'antidiurèse inappropriée (NSIAD) sont porteurs d'une mutation dans le gène codant pour le récepteur de la vasopressine de type 2 (V2) menant à un gain de fonction de ce dernier, ce qui se traduit par une diminution de la diurèse et l'hyponatrémie. À ce jour, les 25 cas de NSIAD rapportés dans la littérature partagent tous une mutation impliquant la substitution de l'arginine 137 du récepteur V2 par une cystéine ou une leucine (R137C/L). Nous décrivons ici un patient atteint de NSIAD dont la cause est une nouvelle mutation (F229V) menant à une activité spontanée élevée du récepteur V2, une caractéristique compatible avec l'antidiurèse inappropriée observée. Cette nouvelle mutation, lorsque comparée aux R137C/L, est particulière en deux points. Premièrement, le récepteur

mutant F229V n'est pas sujet à une désensibilisation spontanée, ce qui engendre une activité de base plus élevée. Deuxièmement, l'activité basale est complètement inhibée par les deux agonistes inverse satavaptan et tolvaptan, indiquant que la mutation F229V n'induit pas un état conformationnel actif irréversible. Ces résultats démontrent que, contrairement à ce qui avait été énoncé pour les mutants R137C/L, les agonistes inverses sont des agents thérapeutiques potentiels pour les patients porteurs de la mutation F229V et tout autre mutation causant le NSIAD dont la conformation n'est pas bloquée dans son état actif, mettant l'emphase sur l'importance des analyses génétiques et la caractérisation fonctionnelle des formes mutantes du récepteur V2 afin d'identifier des stratégies thérapeutiques adaptées aux patients atteints de NSIAD.

A novel NSIAD-causing mutation leads to a constitutive activation of the vasopressin type 2 receptor that can be inhibited by inverse agonists.

Eric Carpentier*¹, Larry A. Greenbaum*², Driss Rochdi¹, Daniel G. Bichet³ & Michel Bouvier¹

¹ *Department of Biochemistry, Groupe de recherche universitaire sur le médicament and Institute of Research in Immunology and Cancer, Université de Montréal.* ²*Emory University and Children's Healthcare of Atlanta, Georgia and* ³ *Department of Medicine and Physiology, Université de Montréal, and Unité de recherche clinique, Centre de recherche et Service de néphrologie, Hôpital du Sacré-Coeur de Montréal, Montréal, Qc, Canada*

**These authors have contributed equally to this work*

Abstract

In the nephrogenic syndrome of inappropriate antidiuresis (NSIAD), patients have a gain of function mutation in the vasopressin type 2 receptor, resulting in diminished renal excretion of water and hyponatremia. The 25 cases reported to date all share mutations leading to the substitution of arginine 137 by either a cysteine or leucine (R137C/L) in the V2R. We describe a patient with NSIAD due to a novel mutation (F229V) in the V2R gene that results in a constitutively active V2R, compatible with a spontaneous antidiuretic action of the receptor. This gain of function mutation has two unique properties when compared to the R137C/L mutations. First, F229V-V2R does not undergo spontaneous desensitization, resulting in a higher basal signaling activity. Second, the high basal signaling activity of F229V-V2R is completely silenced by the two inverse agonists tolvaptan and satavaptan, indicating that the F229V mutation does not lock the V2R in an irreversible active state. These findings indicate that, in contrast with what has been proposed for R137C/L, inverse agonists are promising therapeutics for patients carrying the F229V mutation or other NSIAD-causing mutations that do not maintain the V2R in a locked active state, emphasizing the importance of genetic testing and functional characterization for the identification of potential therapeutic strategies for patients with NSIAD.

Introduction:

The vasopressin type 2 receptor (V2R), located at the basolateral membrane of the principal cells in the collecting duct of the kidney, plays a central role in the control of water homeostasis. Its activation by arginine-vasopressin (AVP) leads to water reabsorption through the water channel aquaporin-2, an event requiring V2R-promoted cAMP production and ensuing protein kinase A (PKA) activation (Treschan et Peters, 2006; Ball, 2007). Mutations in the V2R gene (*AVPR2*) cause nephrogenic diabetes insipidus (NDI) (Fujiwara et Bichet, 2005; Spanakis *et al.*, 2008), an X-linked disease characterized by polyuria and polydipsia due to an inability to concentrate the urine despite normal or elevated plasma concentrations of AVP (Morello et Bichet, 2001). Conversely, activating *AVP2R* mutations cause nephrogenic syndrome of inappropriate antidiuresis (NSIAD). Patients with NSIAD have reduced free water excretion and a concentrated urine despite hyponatremia and low or undetectable circulating AVP levels (Feldman *et al.*, 2005). In contrast, the syndrome of inappropriate antidiuretic hormone secretion (SIADH) has the same clinical presentation, but is associated with inappropriately normal or elevated serum AVP levels (Feldman *et al.*, 2005).

NSIAD occurs due to gain-of-function mutations in the *AVPR2* gene. In the previously described cases, there is a substitution of arginine-137 by either a cysteine (R137C) or a leucine (R137L), causing a spontaneously active V2R, as reflected by elevated basal cAMP levels observed in cells expressing R137C- and R137L-V2R as compared to the wild-type (WT) receptor (Feldman *et al.*, 2005; Kocan *et al.*, 2009; Rochdi *et al.*, 2010). The elevated constitutive signaling activity was accompanied by an increased spontaneous desensitization and internalization of the mutant receptors that limits the exaggerated production of second messenger (Rochdi *et al.*, 2010). Surprisingly, an inverse agonist known to inhibit the spontaneous activity of WT V2R (Azzi *et al.*, 2003) and a man-made constitutively active V2R mutant (D136A-V2R) (Morin *et al.*, 1998) have minimal (Tenenbaum *et al.*, 2009) or no effect (Rochdi *et al.*, 2010) on the cAMP levels produced by the two NSIAD-causing mutant V2R, suggesting that the R137C and R137L substitutions lock the receptor in a constitutively active state that cannot be reversed by inverse agonists. Treatment of a patient carrying the R137C mutation with the inverse agonist satavaptan (SR121463) did not affect renal water excretion,

leading the authors to conclude that inverse agonists are not a viable option for the treatment of NSIAD (Decaux *et al.*, 2007).

We report a novel gain of function V2R mutation, F229V-V2R, which leads to NSIAD. In contrast to R137C- and R137L-V2R, inverse agonists block the constitutive activity of F229V-V2R, indicating that compounds such as tolvaptan or satavaptan represent promising therapeutics for patients with NSIAD harboring the F229V mutation.

METHODS

Materials

Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM), fetal bovine serum (FBS) and phosphate-buffered saline (PBS) were all from Wisent (Quebec City, Canada). Cell culture plates and dishes were obtained from BD Biosciences (Franklin Lakes, NJ). Bovine serum albumin (BSA), poly-D-lysine, arginine-8 vasopressin (AVP) and PMSF (phenyl-methane-sulfonyl fluoride) were purchased from Sigma-Aldrich (St-Louis, MO). SR121463 was a generous gift from Sanofi-Aventis (Paris, France) while OPC41061 were obtained from Otsuka (Tokyo, Japan). Nitrocellulose membranes were purchased from Whatman International (Dassel, Germany). The mouse anti-myc antibody (9E10 clone) was produced by our core facility as ascites fluids, while the HRP-conjugated rabbit anti-myc was from Santa Cruz Biotechnologies (Santa Cruz, CA) and the AP-conjugated goat anti-mouse was from Bio-Rad (Hercules, CA). The DeepBlueC coelenterazine and white Optiplate were from Perkin Elmer Life-Sciences (Waltham, MA) while Coelenterazine-*h* was from Prolume (Pinetop, AZ). The Firefly luciferase assay substrate and lysis buffer were obtained from Biotium (Hayward, CA). The Firefly luciferase activity was assessed in the Veritas luminometer (Turner Biosystems, Sunnyvale, CA). The plate reader used to measure BRET was the Mithras LB940 from Berthold (Bad Wildbad, Germany). Absorbance readings at 405 nm in 96-well plates were done in the OASYS UVM340 microplate reader (Montreal Biotech inc., Montreal, Canada).

Cell Culture and Transfections

HEK293T and β -adaplin2-YFP (AP2-YFP) stable cells (Hamdan *et al.*, 2007) were maintained in DMEM supplemented with 10% FBS in a 37°C humidified incubator with a 5% CO₂ atmosphere. Transfections were performed using FuGENE6 (Roche Diagnostics, Qc, Canada) according to the manufacturer's recommendations.

DNA Constructs

The myc-tagged WT-V2R, WT-V2R-YFP and the R137C- and R137L-V2R plasmids were described previously (Morello *et al.*, 2000; Charest et Bouvier, 2003; Rochdi *et al.*, 2010). The myc-tagged F229V-V2R and F229V-V2R-YFP constructs were generated by site-directed mutagenesis of the myc-WT-V2R and WT-V2R-YFP respectively, using the Quick Change™ mutation kit (Agilent Technologies, Santa-Clara, USA) using the manufacturer's protocol. The EPAC (exchange protein directly activated by cAMP) protein-based bioluminescence resonance energy transfer (BRET) biosensor (EPAC-BRET) was already described (Breton *et al.*, 2010). The β -arrestin2-Rluc and dominant negative Dynamin2 (K44A) constructs were also described previously (Hamdan *et al.*, 2007). The pCRE-luciferase plasmid was purchased from Clontech (Mountain View, CA) and the pRluc vector was obtained from Perkin-Elmer (Waltham, MA). All DNA constructs and mutations were confirmed by direct sequencing.

Measurement of cell surface expression

Cell surface receptor expression was assessed by surface ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) as described previously (Hamdan *et al.*, 2007).

Total cell extract analysis by Western blotting

Total cell lysates were obtained by solubilizing the cells in lysis buffer (50 mM HEPES, 150 mM NaCl, 1% Triton X-100, 0.5% Na-deoxycholate, 1 mM PMSF) 48 hours after being transfected with either the WT- or F229V-V2R construct, or an empty vector (mock). SR121463 treatments (10 μ M) were performed 18 hours prior to cell solubilization. Protein extracts were then resolved on a 10% SDS-PAGE before transfer onto a nitrocellulose membrane. Westerns were probed using the HRP-conjugated goat anti-myc and chemiluminescence was revealed using the Western Lightning™ chemiluminescence substrate (Perkin Elmer, MA) and the LAS-3000 Imaging System (Fujifilm, Tokyo, Japan).

cAMP level measurements

Intracellular cAMP was monitored using either the CRE-Luciferase reporter assay or the BRET-based EPAC biosensor. For the CRE-luciferase reporter assay, the cells were transfected with both pCRE-Luc and pRluc plasmids along with the corresponding receptor construct. Twenty-four hours after transfection, the cells were treated or not with ligands (10 μ M) for 18 hours prior to analysis. The cells were then harvested in lysis buffer and luciferases activities of the lysates were measured separately, either after the injection of the assay substrate containing D-luciferine for the firefly luciferase or after the addition of Coelenterazine *h* for *Renilla* luciferase. Firefly luciferase activity measurements were performed using the Veritas luminometer while *Renilla* luciferase activity was assessed in a Mithras LB940 instrument. Values obtained for the firefly luciferase were divided by the *Renilla* luciferase activity (internal control) to correct for experimental variability caused by potential differences in cell viability or transfection efficiency between samples. The EPAC BRET-based sensor was previously described (Breton *et al.*, 2010). Briefly, HEK293T cells were transfected with the EPAC BRET-based sensor along with either the WT- or F229V-V2R construct. Forty-eight hours after transfection, the cells were detached in PBS and transferred into 96-well plates at a density of $8 \text{ to } 10 \times 10^4$ cells/well. After the addition of DeepBlueC coelenterazine (final concentration, 5 μ M) to each well, the plate was read into the Mithras. For chronic treatments, the cells were exposed to SR121463 or OPC41061 (10 μ M each) for 18 hours prior to BRET measurement. For acute treatments, the drug were added just before reading and each well read every 33 seconds, for 20 min. BRET measurements were performed in the Mithras LB940 equipped with acceptor (515 \pm 15 nm) and donor (410 \pm 40 nm) filters. Signal integration was performed by the MicroWin 2000 software (Berthold Technologies). Since BRET values decrease upon cAMP binding to EPAC, the obtained values were subtracted from basal BRET (BRET obtained with cells transfected only with the EPAC construct) to yield positive numbers.

Monitoring of β -arrestin2/receptor and β -arrestin2/ β -adaptin2 interaction using BRET

For β -arrestin2/receptor interactions, cells were co-transfected with the β -arrestin2-Rluc and receptor-YFP constructs. For β -arrestin2/ β -adaptin2 interaction, the stably expressing β -adaptin2-EYFP (AP2-YFP) cell line was co-transfected with β -arrestin2-Rluc and either the WT- or F229V-V2R construct along with the Dynamin2 (K44A) construct, when mentioned.

Approximately 24 h after transfection, cells were detached and seeded ($\sim 5 \times 10^4$ cells/well) into 96-well (white wall, clear bottom) tissue culture plates previously treated with poly-D-lysine, and re-incubated at 37°C for 18 h. On the day of the experiment, the culture medium was replaced by PBS and incubated with or without AVP (1 μ M) for 30 minutes. To measure the BRET signal, the transparent bottom of the 96-well plate was covered with a white-backed tape adhesive (PerkinElmer Life Sciences), and the BRET substrate for *Rluc*, coelenterazine-*h*, was added to all wells (5 μ M final concentration), followed by BRET measurement on the Mithras LB940 plate reader, which allows the sequential integration of signals detected in the 480 ± 20 nm and 530 ± 20 nm windows. The BRET signal was calculated as a ratio of the light emitted by the YFP (530 ± 20 nm) over the light emitted by *Rluc* (480 ± 20 nm). Net BRET was obtained by subtracting the BRET value obtained with cells only expressing the β -arrestin2-luc construct (basal BRET).

Statistical analyses

Data are presented as mean \pm S.E.M., and statistical significance of the differences were assessed by ANOVA. Pair-wise comparisons were made by post hoc Bonferroni's multiple comparison test. Differences with $P < 0.05$ were considered significant.

Results and Discussion

Case Report

A 3 month old male infant presented with an episode of apnea associated with a 1 week history of an upper respiratory infection due to respiratory syncytial virus. He had been born at term by normal spontaneous vaginal delivery and weighed 2.67 kg at birth; his past medical history was unremarkable. His physical examination was notable for scattered wheezing and rhonchi. Initial evaluation was notable for a serum sodium of 120 mEq/L. Other laboratory results included normal serum levels of potassium (3.8 mEq/L), bicarbonate (21 mmol/L), and creatinine (0.2 mg/dL). 17-alpha-hydroxyprogesterone (56 ng/dL; normal = 3 – 90 ng/dL), AM cortisol (13.6 ug/dl) and aldosterone (34 ng/dL; normal = 5 – 90 ng/dL). A repeat aldosterone level was 3.8 ng/dL. His thyroid stimulating hormone and free T4 were normal and he had a normal sweat chloride test. His BUN (blood urea nitrogen content) was 3 mg/dL (normal: 8-28 mg/dL). His antidiuretic hormone level was < 0.5 pg/mL (reference range: 0.0 to 4.7 pg/mL). His urine osmolality was 351 milliosmoles/kg and his urine sodium was 107 mEq/L when his serum sodium was 127 mEq/L. He was initially treated with intravenous fluids (D5 0.45 normal saline), but had no improvement in his serum sodium and his blood pressure became mildly elevated. His serum sodium and hypertension improved with fluid restriction. He was given a diagnosis of syndrome of inappropriate antidiuretic hormone (SIADH) due to bronchiolitis.

At 6 months the patient had a second apneic episode, but no laboratory tests were performed. A third apneic episode occurred at 9 months of age, prompting a second hospitalization. Laboratory evaluation was notable for a serum sodium of 124 mEq/L, urine sodium of 177 mEq/L and urine osmolality of 544 milliosmoles/kg. His uric acid level was 1.3 mg/dL (normal: 2.0-6.2 mg/dL), his plasma renin was <20 ng/dL/hour (normal: 235 – 3700), and BUN was 2 mg/dL. His antidiuretic hormone level was < 0.5 pg/mL. He had 6 determinations of urine osmolality during his two hospitalizations and they ranged from 185-648 milliosmoles/kg; all were performed when the patient had hyponatremia and no evidence of volume depletion. The patient was given a diagnosis of nephrogenic syndrome of inappropriate antidiuresis and his

DNA was sent for sequencing of the *AVPR2* gene ADH receptor, which revealed a T to G change at nucleotide 1046. This results in a change of phenylalanine to valine at amino acid position 229 (F229V-V2R).

The patient has subsequently been managed with a combination of fluid restriction, sodium supplementation and oral furosemide. He has had no further hospitalizations and his serum sodium has ranged from 132 to 138 mEq/L. The patient's younger brother is similarly affected, suggesting the mother is probably a carrier.

Maturation and cell surface expression of F229V-V2R

To determine how the F229V mutation could lead to NSIAD, the functional characteristics of F229V-V2R were compared to those of the wild-type (WT) receptor in HEK293T cells. Cell surface ELISA revealed a slightly reduced expression level for F229V (80% of WT-V2R) (Fig. 1A). Consistent with this decreased cell surface targeting, Western blot analysis showed a reduced proportion of the mature, fully glycosylated (45-55 kDa, black triangle) vs the core-glycosylated and deglycosylated (40 and 37kDa respectively, white triangle) receptor forms for F229V-V2R when compared to the WT-V2R (Fig. 1B). Such a reduced maturation and cell surface targeting is a common feature observed for many GPCR mutants (Morello *et al.*, 2000; Conn *et al.*, 2007; Rene *et al.*, 2010; Valenzano *et al.*, 2010). For several V2R mutations, such altered trafficking has been shown to result from the intracellular retention of the receptor by the endoplasmic reticulum quality control system (Conn *et al.*, 2007) and to cause a loss of function phenotype leading to nephrogenic diabetes insipidus (NDI) (Morello et Bichet, 2001). Since treatment of NDI-causing V2R mutations with pharmacological chaperones was shown to rescue cell surface targeting (Morello *et al.*, 2000; Morello *et al.*, 2001; Bernier *et al.*, 2004; Wuller *et al.*, 2004; Robben *et al.*, 2007) and represent a viable therapy for NDI patients (Bernier *et al.*, 2006), the effect of the pharmacological chaperone SR121463 (sativaptan) was assessed on the maturation and cell surface expression of F229V-V2R. Treatment with SR121463 for 18 hours promoted a significant increased (21% for the WT and

76% for F229V-V2R) of the mature/immature ratio. The increase in the maturation efficiency did not result in a notable change in cell surface targeting for the WT receptor, but led to a significant (25%) augmentation of the F229V-V2R surface expression. These data indicate that the F229V mutation decreases the maturation efficiency of the V2R, resulting in a reduced plasma membrane targeting. However, this observation does not account for NSIAD since decreased expression should not cause a gain of receptor function.

The F229V mutation leads to constitutive activity that is inhibited by inverse agonists

To assess the signaling activity of F229V-V2R, cAMP production was assessed in cells expressing either the WT or F229V-V2R using a CRE-luciferase (CRE; cAMP response element) gene reporter assay (Figure 2A) or the EPAC BRET-based biosensor (Breton *et al.*, 2010) (Figure 2A inset). Despite its lower surface expression level, F229V-V2R produces significantly higher levels of basal (in the absence of agonist stimulation) cAMP accumulation than the WT receptor, indicating that the mutation induces constitutive activity of the receptor. When compared with the previously identified NSIAD-causing mutants, R137L-V2R and R137C-V2R, which also showed increased basal activity (Feldman *et al.*, 2005; Tenenbaum *et al.*, 2009; Rochdi *et al.*, 2010), the constitutive F229V-V2R-promoted cAMP accumulation was much greater. F229V-V2R cAMP levels were ~28-fold higher than WT level, whereas these levels only reached 5.2 and 1.85-fold over WT for R137L-V2R and R137C-V2R, respectively (Figure 2A).

The pharmacological chaperone SR121463 was shown to act as an inverse agonist by inhibiting the agonist-independent cAMP production of the WT V2R (Azzi *et al.*, 2003) and an artificially designed, constitutively active D136A-V2R mutant (Morin *et al.*, 1998). Attempts to reduce the constitutive activity of the NSIAD-causing R137C- and R137L-V2R by SR121463 were unsuccessful, either *in-vitro* (Rochdi *et al.*, 2010) or in patients harboring the R137C mutation (Decaux *et al.*, 2007), suggesting that these receptors were ‘locked’ in their active state and insensitive to the action of inverse agonists. This led some investigators to conclude that inverse agonists do not represent an avenue for NSIAD treatment. To determine if F229V-V2R

is also locked in an active conformation that is insensitive to inverse agonists, we assessed the effect of SR121463 and of the recently FDA-approved antagonist OPC41061 (tolvaptan™) (Ghali *et al.*, 2009). Treatment with either compound for 18 hours significantly reduced the F229V-V2R-promoted constitutive cAMP production (Figure 2A and inset). As shown in Fig. 2B, the inhibitory effect of both SR121463 and OPC41061 occurred rapidly after drug addition and reached their maximum effect within 5 minutes. The inverse agonist activity of SR121463 and OPC41061 were not detected following short term treatment in cells expressing WT-V2R (Figure 2C), but were apparent with longer exposure (Figure 2A), confirming a low level of constitutive activity for the WT receptor. These data indicate that SR121463 and OPC41061 act as inverse agonists and can silence the high constitutive activity of the mutant F229V-V2R, a finding which is in contrast with observations with the two other NSIAD-causing V2R mutations.

Despite the elevated basal cAMP levels promoted by the F229V-V2R, AVP stimulation led to a further cAMP increase that reached levels similar to those observed in cells expressing the WT-V2R. These results indicate that the F229V mutation, while causing constitutive activity, does not ‘lock’ the V2R in a rigid active state, making it amenable to pharmacological modulation.

F229V-V2R does not undergo constitutive desensitization

Previous studies have shown that the constitutively activating R137L and R137C mutations lead to a desensitization of the receptor resulting from the spontaneous recruitment of the regulatory protein β -arrestin (Kocan *et al.*, 2009; Tenenbaum *et al.*, 2009; Rochdi *et al.*, 2010) and subsequent interaction with the clathrin adaptor protein, AP-2 (Rochdi *et al.*, 2010). In contrast, no elevated constitutive recruitment of β -arrestin2 was observed for F229V despite its constitutive activity. In a BRET-based assay monitoring the interaction between V2R and β -arrestin2, virtually identical basal BRET values were obtained for the WT and F229V-V2R whereas a significantly increased BRET was observed for R137C-V2R (Fig. 3A). Similar results were obtained when monitoring receptor-promoted β -arrestin2/AP-2 assembly, which is

indicative of clathrin-mediated endocytosis. Indeed, contrary to R137C-V2R, F229V-V2R did not promote interaction between AP-2 and β -arrestin2 above what is observed for the WT receptor (Fig. 3B). Even upon inhibition of endocytosis with a dominant-negative mutant of dynamin-2 (DynK44A), which potentiates the BRET signal between β -arrestin2 and AP-2 (Hamdan *et al.*, 2007), no significant difference between WT and F229V-V2R was observed, indicating that the F229V mutation does not increase constitutive endocytosis. Collectively, these observations indicate that F229V-V2R does not undergo constitutive desensitization, thus providing an explanation for the much higher basal cAMP levels observed in cells expressing F229V-V2R as compared to R137C-V2R and R137L-V2R (Figure 2A). The lack of constitutive β -arrestin recruitment and AP-2 engagement does not arise from an intrinsic defect of F229V-V2R to recruit β -arrestin since AVP stimulation led to an increase interaction between β -arrestin and F229V-V2R similar to the one observed for the WT receptor. Therefore, the F229V mutation produces a receptor that possesses high constitutive adenylyl cyclase activity, but does not affect β -arrestin recruitment. Such biased effect of a mutation is consistent with the notion that these two pathways can be controlled independently by distinct conformational changes (Azzi *et al.*, 2003; Galandrin *et al.*, 2007; Violin et Lefkowitz, 2007).

In addition to determining the molecular basis of NSIAD due to the F229V-V2R mutation, our study reveals that inverse agonists such as satavaptan and tolvaptan represent promising candidates for the treatment of patients carrying this mutation or new constitutively activating mutations that do not maintain the V2 receptor in a 'locked' active state. This is particularly important when considering that 10-20% of the patients diagnosed with SIADH have undetectable serum AVP levels upon water restriction (Zerbe *et al.*, 1980), suggesting that some of these patients may in fact have NSIAD due to activating mutation in their *AVPR2* gene (Feldman *et al.*, 2005). Another interesting outcome of this study is that the same medications could be used to treat two diseases with opposite clinical manifestations. Indeed, satavaptan and tolvaptan, used as pharmacological chaperones to rescue intracellularly-retained receptors, make them good candidates for treatment of NDI (Bernier *et al.*, 2006), whereas their inverse agonist property could be exploited for NSIAD therapy. Finally, our study demonstrates that a disease resulting from distinct mutations of the same gene may respond differently to a given therapy,

highlighting the importance of a clear understanding of the functional consequences of the mutations that will allow appropriate personalized medicine.

References

1. Ball, S.G. 2007. Vasopressin and disorders of water balance: the physiology and pathophysiology of vasopressin. *Ann Clin Biochem* 44:417-431.
2. Treschan, T.A., and Peters, J. 2006. The vasopressin system: physiology and clinical strategies. *Anesthesiology* 105:599-612; quiz 639-540.
3. Fujiwara, T.M., and Bichet, D.G. 2005. Molecular biology of hereditary diabetes insipidus. *J Am Soc Nephrol* 16:2836-2846.
4. Spanakis, E., Milord, E., and Gragnoli, C. 2008. AVPR2 variants and mutations in nephrogenic diabetes insipidus: review and missense mutation significance. *J Cell Physiol* 217:605-617.
5. Morello, J.P., and Bichet, D.G. 2001. Nephrogenic diabetes insipidus. *Annu Rev Physiol* 63:607-630.
6. Feldman, B.J., Rosenthal, S.M., Vargas, G.A., Fenwick, R.G., Huang, E.A., Matsuda-Abedini, M., Lustig, R.H., Mathias, R.S., Portale, A.A., Miller, W.L., et al. 2005. Nephrogenic syndrome of inappropriate antidiuresis. *N Engl J Med* 352:1884-1890.
7. Kocan, M., See, H.B., Sampaio, N.G., Eidne, K.A., Feldman, B.J., and Pflieger, K.D. 2009. Mutant vasopressin type II receptors associated with nephrogenic syndrome of inappropriate antidiuresis interact with β -arrestin in an agonist-independent manner. *Mol Endocrinol*.
8. Rochdi, M.D., Vargas, G.A., Carpentier, E., Oligny-Longpre, G., Chen, S., Koor, A., Gitelman, S.E., Rosenthal, S.M., von Zastrow, M., and Bouvier, M. 2010. Functional Characterization of V2-Vasopressin Receptor Substitutions (R137H/C/L) Leading to

Nephrogenic Diabetes Insipidus and Nephrogenic Syndrome of Inappropriate Antidiuresis; Implications for treatments. *Mol Pharmacol*.

9. Azzi, M., Charest, P.G., Angers, S., Rousseau, G., Kohout, T., Bouvier, M., and Pineyro, G. 2003. Beta-arrestin-mediated activation of MAPK by inverse agonists reveals distinct active conformations for G protein-coupled receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:11406-11411.

10. Morin, D., Cotte, N., Balestre, M.N., Mouillac, B., Manning, M., Breton, C., and Barberis, C. 1998. The D136A mutation of the V2 vasopressin receptor induces a constitutive activity which permits discrimination between antagonists with partial agonist and inverse agonist activities. *FEBS Lett* 441:470-475.

11. Tenenbaum, J., Ayoub, M.A., Perkowska, S., Adra-Delenne, A.L., Mendre, C., Ranchin, B., Bricca, G., Geelen, G., Mouillac, B., Durroux, T., et al. 2009. The constitutively active V2 receptor mutants conferring NSIAD are weakly sensitive to agonist and antagonist regulation. *PLoS One* 4:e8383.

12. Rochdi, M.D., Vargas, G.A., Carpentier, E., Oligny-Longpre, G., Chen, S., Kovoov, A., Gitelman, S.E., Rosenthal, S.M., von Zastrow, M., and Bouvier, M. 2010. Functional characterization of vasopressin type 2 receptor substitutions (R137H/C/L) leading to nephrogenic diabetes insipidus and nephrogenic syndrome of inappropriate antidiuresis: implications for treatments. *Mol Pharmacol* 77:836-845.

13. Decaux, G., Vandergheynst, F., Bouko, Y., Parma, J., Vassart, G., and Vilain, C. 2007. Nephrogenic syndrome of inappropriate antidiuresis in adults: high phenotypic variability in men and women from a large pedigree. *J Am Soc Nephrol* 18:606-612.

14. Hamdan, F.F., Rochdi, M.D., Breton, B., Fessart, D., Michaud, D.E., Charest, P.G., Laporte, S.A., and Bouvier, M. 2007. Unraveling G protein-coupled receptor endocytosis pathways using real-time monitoring of agonist-promoted interaction between beta-arrestins and AP-2. *J Biol Chem* 282:29089-29100.

15. Morello, J.P., Salahpour, A., Laperriere, A., Bernier, V., Arthus, M.F., Lonergan, M., Petaja-Repo, U., Angers, S., Morin, D., Bichet, D.G., et al. 2000. Pharmacological chaperones rescue cell-surface expression and function of misfolded V2 vasopressin receptor mutants. *J Clin Invest* 105:887-895.

16. Charest, P.G., and Bouvier, M. 2003. Palmitoylation of the V2 vasopressin receptor carboxyl tail enhances beta-arrestin recruitment leading to efficient receptor endocytosis and ERK1/2 activation. *J Biol Chem* 278:41541-41551.
17. Breton, B., Sauvageau, E., Zhou, J., Bonin, H., Le Gouill, C., and Bouvier, M. 2010. Multiplexing of multicolor bioluminescence resonance energy transfer. *Biophys J* 99:4037-4046.
18. Valenzano, K.J., Benjamin, E.R., René, P., and Bouvier, M. 2010. Pharmacological chaperones: Potential for the treatment of hereditary diseases caused by mutations in G protein-coupled receptors. In *GPCR molecular pharmacology and drug targeting: Shifting paradigms and new directions*: John Wiley and Sons, Inc. 460-510.
19. Conn, P.M., Ulloa-Aguirre, A., Ito, J., and Janovick, J.A. 2007. G protein-coupled receptor trafficking in health and disease: lessons learned to prepare for therapeutic mutant rescue in vivo. *Pharmacol Rev* 59:225-250.
20. Rene, P., Le Gouill, C., Pogozheva, I.D., Lee, G., Mosberg, H.I., Farooqi, I.S., Valenzano, K.J., and Bouvier, M. 2010. Pharmacological chaperones restore function to MC4R mutants responsible for severe early-onset obesity. *J Pharmacol Exp Ther* 335:520-532.
21. Morello, J.P., Salahpour, A., Petaja-Repo, U.E., Laperriere, A., Lonergan, M., Arthus, M.F., Nabi, I.R., Bichet, D.G., and Bouvier, M. 2001. Association of calnexin with wild type and mutant AVPR2 that causes nephrogenic diabetes insipidus. *Biochemistry* 40:6766-6775.
22. Bernier, V., Lagace, M., Lonergan, M., Arthus, M.F., Bichet, D.G., and Bouvier, M. 2004. Functional rescue of the constitutively internalized V2 vasopressin receptor mutant R137H by the pharmacological chaperone action of SR49059. *Mol Endocrinol* 18:2074-2084.
23. Wuller, S., Wiesner, B., Loffler, A., Furkert, J., Krause, G., Hermosilla, R., Schaefer, M., Schulein, R., Rosenthal, W., and Oksche, A. 2004. Pharmacochaperones post-translationally enhance cell surface expression by increasing conformational stability of wild-type and mutant vasopressin V2 receptors. *J Biol Chem* 279:47254-47263.
24. Robben, J.H., Sze, M., Knoers, N.V., and Deen, P.M. 2007. Functional rescue of vasopressin V2 receptor mutants in MDCK cells by pharmacochaperones: relevance to therapy of nephrogenic diabetes insipidus. *Am J Physiol Renal Physiol* 292:F253-260.

25. Bernier, V., Morello, J.P., Zarruk, A., Debrand, N., Salahpour, A., Lonergan, M., Arthus, M.F., Laperriere, A., Brouard, R., Bouvier, M., et al. 2006. Pharmacologic chaperones as a potential treatment for X-linked nephrogenic diabetes insipidus. *J Am Soc Nephrol* 17:232-243.
26. Ghali, J.K., Hamad, B., Yasothan, U., and Kirkpatrick, P. 2009. Tolvaptan. *Nat Rev Drug Discov* 8:611-612.
27. Galandrin, S., Oligny-Longpre, G., and Bouvier, M. 2007. The evasive nature of drug efficacy: implications for drug discovery. *Trends Pharmacol Sci* 28:423-430.
28. Violin, J.D., and Lefkowitz, R.J. 2007. Beta-arrestin-biased ligands at seven-transmembrane receptors. *Trends Pharmacol Sci* 28:416-422.
29. Zerbe, R., Stropes, L., and Robertson, G. 1980. Vasopressin function in the syndrome of inappropriate antidiuresis. *Annu Rev Med* 31:315-327.

Figure legends:

Figure 1: **Surface expression and maturation profile of the F229V-V2R mutant.**

HEK293T cells were transfected with the myc-WT-V2R or myc-F229V-V2R coding plasmids 48 hours prior to analysis. After 18 hours incubation in presence or absence of 10 μ M SR121463, receptor cell surface and total expression were assessed by surface ELISA (**A**) and Western blot analysis (**B**) using an anti-myc antibody. The black triangle indicates the mature fully glycosylated form of the V2R while the white triangle shows the immature forms. **C**) Densitometric ratios of mature over immature forms of the receptors are plotted. Data shown in **A** are the mean \pm S.E.M. of three independent experiments. The Western result shown is representative of three independent experiments and densitometric ratios were performed on the 3 independent results and are expressed as the mean \pm S.E.M. $\square P < 0.05$, * and $\square\square P < 0.001$

Figure 2: **Constitutive activity and silencing of the F229V-V2R mutant.**

A) HEK293T cells transiently expressing either the myc tagged WT-, F229V-, R137C- or R137L-V2R along with the pCRE-luc and pRluc vector were treated or not with SR121463 or OPC41061 (10 μ M) for 18 hours before luciferase activities assessment. The myc-WT- and myc-F229V-V2R were also co-transfected with the EPAC BRET-based biosensor (inset) and treated the same way prior to BRET measurements (see material & method section). **B**) Myc-F229V- or **C**) myc-WT-V2R coding plasmids were co-transfected with the EPAC-BRET biosensor. Forty-eight hours after transfection, DeepblueC coelenterazine was added to all wells and the cells were either treated with AVP (1 μ M), SR121463, OPC41061 (both at 10 μ M) or left untreated. BRET values were then immediately acquired every 33 seconds for a period of 20 min. Data obtained from the receptor-expressing cells were subtracted from those obtained with cells expressing only the EPAC-BRET biosensor treated in the same conditions to yield positive net BRET values. In **A**, data are the mean \pm S.E.M. of three independent experiments while the data shown in **B** are from one, which is representative of three independent experiments. * $P < 0.05$, $\square\square P < 0.01$, ** and $\square P < 0.001$

Figure 3: **Desensitization of the F229V-V2R mutant.**

In **A**, HEK293T cells were transfected with the YFP-tagged WT-V2R, F229V-V2R or R137C-V2R along with the β -arrestin2-RLuc construct. For **B** HEK293T cells stably expressing the AP2-YFP fusion protein were transfected with the WT-, F229V, or R137C-V2R construct along with the β -arrestin2-RLuc coding plasmid. Parallel transfections were also performed adding the DynK44A construct to the above DNA mixtures. BRET readings were performed 48 hours post-transfection, just after the addition of Coelenterazine *h*. In **A**, the cells were stimulated with 1 μ M AVP (when mentioned) for 20 min prior to BRET readings. Data are the mean \pm S.E.M. of three independent experiments. * and \square $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, $\square\square$ $P < 0.001$, *NS*; non-significant.

Figure 1

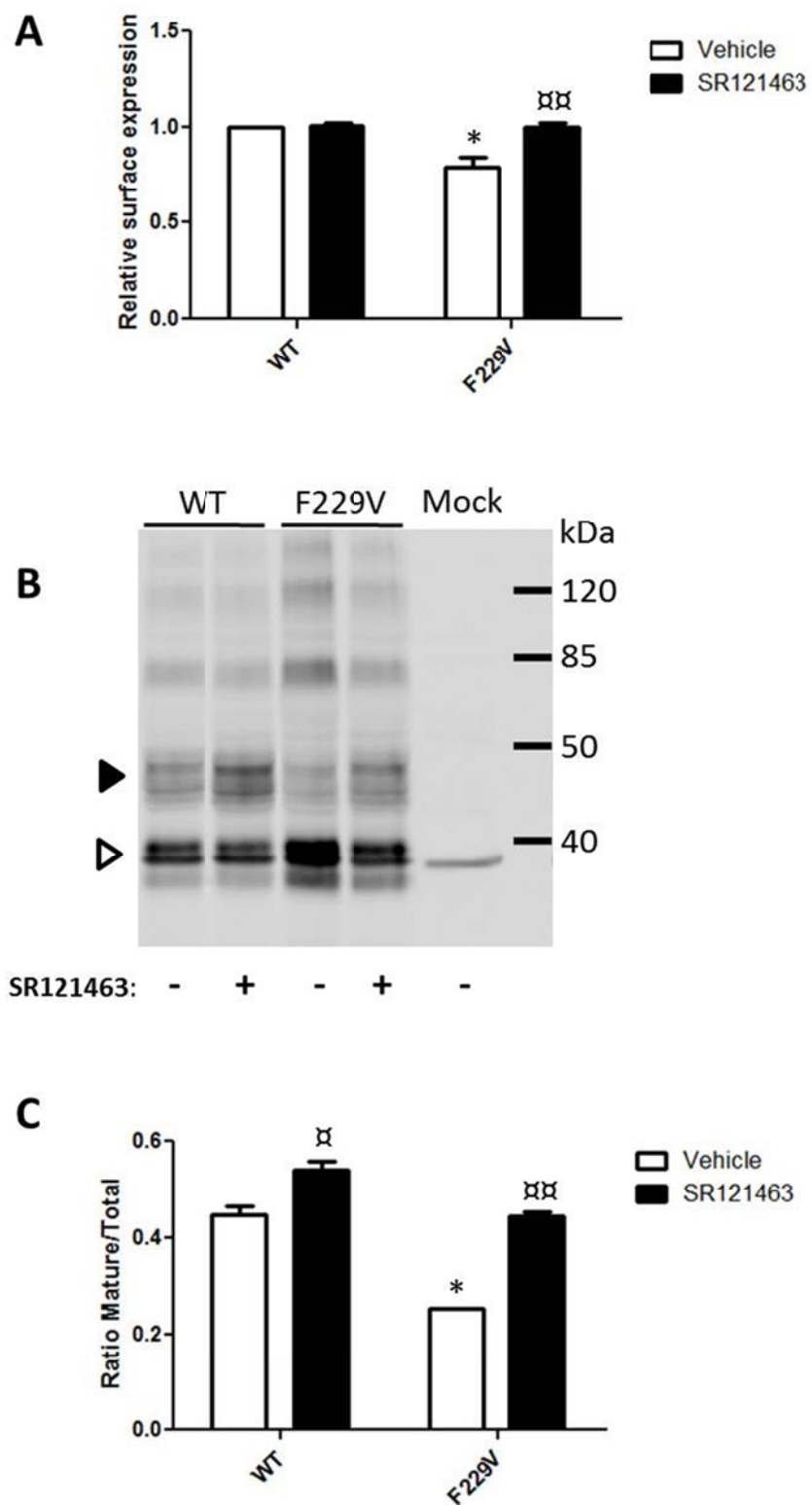


Figure 2

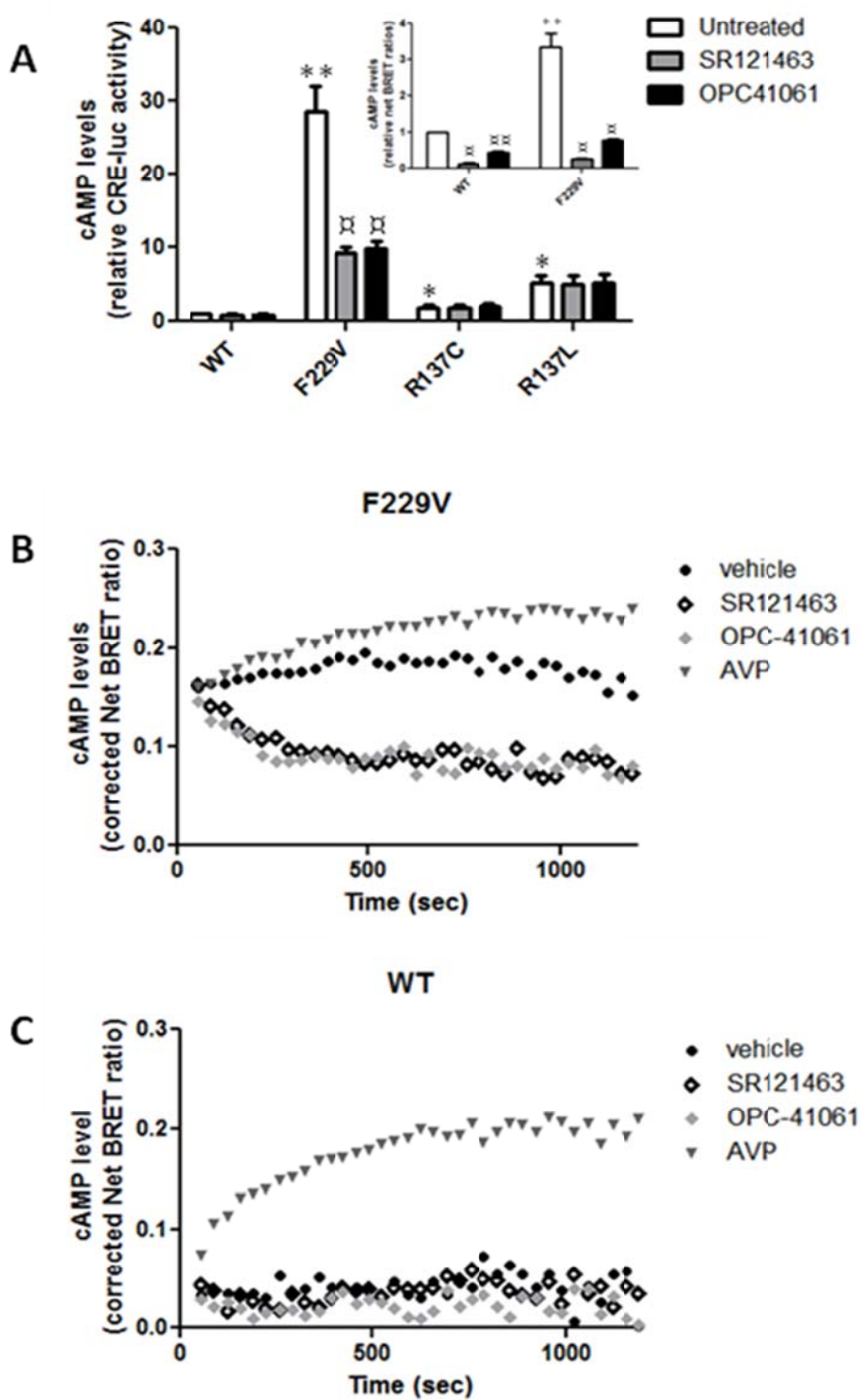
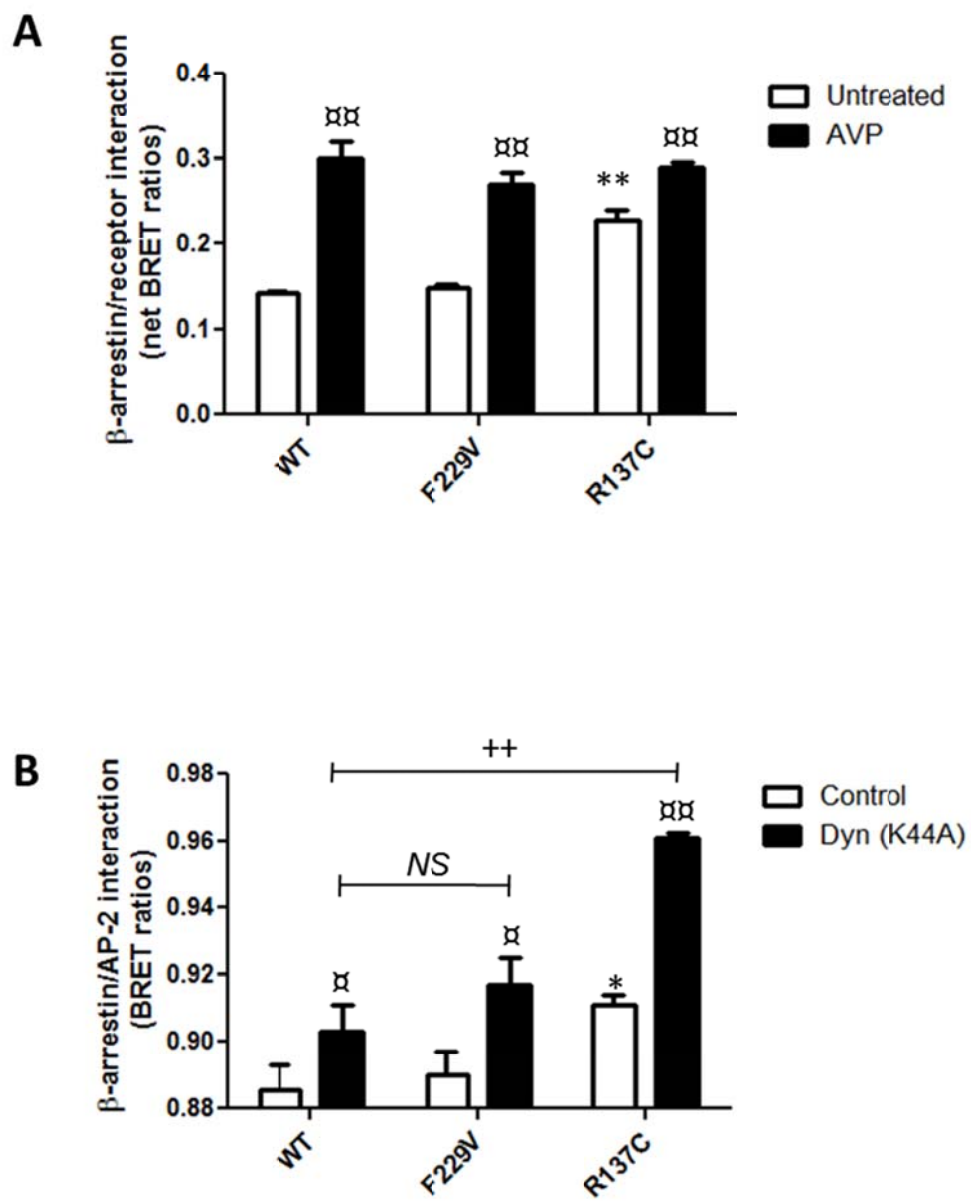


Figure 3



ARTICLE 4

Role of N-glycosylation on the maturation and trafficking of NDI-causing V2 vasopressin receptor mutants

Eric Carpentier, Etienne Sauvageau, Yves Durocher, Daniel G. Bichet & Michel Bouvier. À soumettre à *Biochemistry*

Résumé :

Les récepteurs couplés aux protéines G (RCPGs) sont des protéines membranaires dont le rôle est de percevoir les signaux extracellulaires pour ensuite les traduire en une réponse cellulaire adéquate visant à maintenir l'homéostasie corporelle et permettre l'adaptation aux changements environnementaux. Plusieurs pathologies ont été associées à des mutations dans la séquence codante de RCPGs et ont parfois comme conséquence un mauvais repliement, ce qui provoque leur rétention intracellulaire dû à leur reconnaissance par le système de contrôle de qualité du réticulum endoplasmique. Puisque les mécanismes de repliement et de maturation des RCPGs ainsi que les mécanismes de reconnaissance et de rétention des formes mutantes sont peu connus, nous avons entrepris d'investiguer l'implication de la N-glycosylation et du système de contrôle de qualité basé sur un réseau de protéines lectines sur ces mécanismes pour deux formes mutantes du récepteur de la vasopressine de type 2 (V2) responsables du diabète insipide néphrogénique congénital (DINc) et occasionnant des symptômes cliniques de différentes sévérités. Nos résultats ont démontré que bien que la N-glycosylation soit requise pour l'interaction des récepteurs avec la Calnexine, elle n'est pas essentielle pour le repliement et la maturation du mutant légèrement compromis Y128S (manifestations cliniques peu sévères). En contrepartie, l'abolition de la N-glycosylation d'un mutant dont la maturation est plus fortement compromise, le W164S (manifestations cliniques sévères), a eu pour effet de produire la synthèse d'une forme tronquée du récepteur et son accumulation intracellulaire. L'efficacité du traitement au chaperon pharmacologique n'a pas été affectée par l'absence de N-glycosylation

pour le mutant Y128S tandis qu'aucune récupération de fonction n'a pu être obtenue pour le mutant W164S non-glycosylé. Ces résultats suggèrent que la reconnaissance et la rétention des mutants du V2R ne reposent pas sur des interactions dépendantes des sucres et que l'importance des sucres liés aux asparagines dans le processus de repliement et de maturation des récepteurs V2 occasionnant le DINc est une caractéristique 'mutation-spécifique'. Le temps d'interaction entre calnexine et le mutant W1642 s'est avéré plus long que pour le mutant Y128S, en accord avec leur efficacité intrinsèque de repliement. De façon intéressante, malgré une amélioration significative de la maturation des deux mutants testés, un traitement au chaperon pharmacologique a eu pour effet de diminuer le temps d'interaction entre calnexine et le mutant Y128S sans affecter celui du mutant W164S. Ces résultats suggèrent que l'action 'chaperon' de ces composés peut survenir à différentes étapes de la maturation des mutants du V2R, selon la mutation impliquée. Considérés collectivement, nos résultats démontrent que les processus de maturation et la prise en charge des mutants par la voie de sécrétion sont élaborés et ne dépendent pas exclusivement des interactions basées sur la N-glycosylation et sont grandement influencés par la nature de la mutation.

Role of N-glycosylation on the maturation and trafficking of V2 vasopressin receptor mutants.

Eric Carpentier¹, Etienne Sauvageau¹, Yves Durocher², Daniel G. Bichet³ & Michel Bouvier¹

¹Institut de Recherche en Immunologie et Cancérologie, Département de Biochimie, Université de Montréal, Montréal, Québec, Canada.

²Animal Cell Technology Group, Biotechnology Research Institute, National Research Council Canada, 6100 Royalmount Avenue, Montreal, Québec, Canada.

³Department of Medicine and Physiology, Université de Montréal, and Unité de recherche clinique, Centre de recherche et Service de néphrologie, Hôpital du Sacré-Coeur de Montréal, Montréal, Québec, Canada

Abstract:

A number of inherited disorders have been traced to mutations within G-protein coupled receptors that sometimes compromise cell surface expression due to their retention by the endoplasmic reticulum quality control system (ERQCS). We thus examine the involvement of N-linked glycosylation and the lectin-based network on the ERQCS for two misfolded vasopressin type 2 receptors (V2Rs) mutants linked to the etiology of congenital nephrogenic diabetes insipidus (NDI) causing either a mild or severe phenotype in patients. Our results show that the N-linked glycans, although required for Cnx interaction, are not essential for the recognition and intracellular retention of both mutants. Abolishing N-glycosylation on the mild phenotype-associated mutant (Y128S-V2R) did not affect its cellular processing while it resulted in the synthesis of a truncated misfolded entity that accumulates heavily inside the cell for the severe phenotype-associated mutant W164S-V2R. Moreover, pharmacological chaperoning was not compromised in absence of N-linked sugars for Y128S-V2R but failed to rescue the N-glycan deficient W164S-V2R, indicating that the requirement for N-linked glycosylation is mutant-specific. The interaction time between Cnx and the different N-glycosylated mutants was found longer for W164S than Y128S, in relation with their folding efficiency. While pharmacological chaperone promoted the maturation of the two mutants studied, it decreased the duration of Cnx interaction for Y128S but had no effect in the case of the W164S, suggesting that the chaperoning action of these compounds can occur at different steps in the maturation process, depending on the nature of the mutation. Taken together, these results show that the ER

processing of mutant receptors is an elaborate and multi-step mechanism that does not solely rely on lectin-based interaction and is highly influenced by the mutant itself.

Introduction:

G-protein-coupled receptors (GPCR) are the largest family of cell surface receptors, converting external stimuli into intracellular responses. Surface trafficking of newly formed receptors, together with the endocytotic pathway, determine steady-state receptor expression levels and thereby dictate the magnitude of the cellular response (for review, see (Tan *et al.*, 2004)). Numerous inherited disorders have been traced to mutations within GPCRs that sometimes affect their maturation, which result in a reduced cell surface expression (Sung *et al.*, 1991; Birnbaumer *et al.*, 1994; Valverde *et al.*, 1996; Biebermann *et al.*, 1997; Bradbury *et al.*, 1997; Tanaka *et al.*, 1998; Ho et MacKenzie, 1999; Fuchs *et al.*, 2001; D'Souza-Li *et al.*, 2002; Gromoll *et al.*, 2002; Janovick *et al.*, 2002; Rannikko *et al.*, 2002; Vassart et Costagliola, 2011). Congenital nephrogenic diabetes insipidus (NDI) is a hereditary disease associated with renal tubular resistance to arginine-vasopressin (AVP). Patients with NDI are unable to efficiently concentrate their urine, resulting in the excretion of large volumes of hypotonic urine leading to dehydration. In ~75% of all cases, the X-linked recessive form of the disease is caused by mutations in the gene encoding the type 2 vasopressin receptor (V2R) (Fujiwara *et al.*, 1995), a member of the GPCR family. More than 200 distinct NDI-causing V2R mutations have been identified in more than 250 unrelated affected families (Conn *et al.*, 2007; Bichet, 2008; Spanakis *et al.*, 2008). Approximately 50% of the mutations in the coding region of the V2R are missense, leading to a single amino acid substitution, while the remainder are deletions or nonsense mutations that lead to frameshifts and premature termination of the coding sequence (Conn *et al.*, 2007). The majority of missense mutations (75 out of 95 identified) were found to affect receptor cell surface expression levels, and in most cases, this was attributed to the recognition and intracellular retention of the mutant receptors by the endoplasmic reticulum (ER) quality control system (Conn *et al.*, 2007). We and others have demonstrated previously that sustained exposition of ER-retained NDI-V2R mutants to cell permeable V2R antagonists, termed pharmacological chaperones (PC), could restore cell surface expression and rescue function of a subset of these mutant receptors (Morello *et al.*, 2000; Morello *et al.*, 2001; Bernier *et al.*, 2004; Wuller *et al.*, 2004; Robben *et al.*, 2007). Although not fully understood, a PC is believed to act by binding to partially misfolded receptors, allowing them to adopt and/or restraining them in specific conformations that are compatible with the ER quality control

system and forward trafficking (Morello *et al.*, 2000; Bernier *et al.*, 2004). PCs have been shown to improve maturation efficiency of multiple GPCRs and other classes of proteins and are thus a promising avenue to treat conformational diseases (Bernier *et al.*, 2004; Rajan *et al.*, 2011). The therapeutic potential of PCs for patients with NDI was validated by a pilot clinical trial, which led to a reduction in urine output and increase urine osmolality without affecting sodium, potassium, and creatinine excretion, or plasma sodium levels (Bernier *et al.*, 2006).

Studies on the ER quality control system have positioned asparagine-linked glycans (N-linked glycans) and a network of ER-resident lectins at the center of the recognition and retention processes of aberrant proteins. Asparagine glycosylation occurs co-translationally in a N-X-S/T amino acid context on most membrane proteins including all GPCRs. Glycans are bulky hydrophilic modifications that serve a variety of structural and functional roles within the cell. In the ER, N-linked glycans are the target of enzymes that continuously add and remove sugars from the core, and the resulting composition of the glycan moiety is the basis of systems that recognize the folding state of the protein (Shimizu et Hendershot, 2007). Central to the ER lectin network is the well known molecular chaperone calnexine (Cnx), a type I membrane protein that interacts with folding glycoproteins via lectin-oligosaccharide interactions as well as through polypeptide-based recognition of non-native conformers (Hammond *et al.*, 1994; Hebert *et al.*, 1995; Ware *et al.*, 1995; Ihara *et al.*, 1999; Brockmeier *et al.*, 2009). Cnx has been shown to interact with many GPCRs (Rozell *et al.*, 1998; Morello *et al.*, 2001; Butz *et al.*, 2003; Lu *et al.*, 2003; Lanctot *et al.*, 2006; Ge *et al.*, 2009), suggesting a role for this lectin in the folding and quality control of this class of receptors. The human V2R was shown to contain one consensus N-linked glycosylation site at asparagine 22 in the N-terminal extracellular segment of the protein and although the wild-type (WT) V2R does not require N-linked glycans for proper processing (Sadeghi et Birnbaumer, 1999), the interaction between Cnx and the V2R was longer for mutant forms compared to the WT receptor, suggesting a role for this molecular chaperone in the retention of NDI-causing V2R mutants (Morello *et al.*, 2001).

The goal of the present study is thus to determine the role of N-glycosylation in the recognition, retention and pharmacological chaperoning of NDI-causing V2R mutants. For this purpose, the effect of mutating the receptor N-glycosylation site on the ER processing and cell

surface targeting of W164S-, Y128S- (Bichet, 2008) and WT-V2R was assessed. The W164S- and Y128S-V2R mutant forms were selected as they are representative of mutations leading to either mild (Y128S) or severe NDI clinical manifestations. Our results show that although the N-linked sugars are important for the interaction of the three receptor forms with calnexin, the impact on their processing and response to the PC was mutations-specific. Our data show that, as is the case for the WT-V2R, N-glycosylation and calnexin binding does not play an essential role for the maturation or retention of Y128S by the quality control system. In contrast, N-glycosylation was found to play an essential role in the processing of W164S-V2R and the co-translational modification was found to be essential for the action of the PC on this highly compromised receptor mutant form. Our findings also indicate that although PC can modify the time of interaction between WT- and Y128S-V2R and calnexin, the influence of the compound on the cell surface targeting of the mutant receptor must involve another site of action in the quality control sequence of events.

Materials and Methods

Materials:

Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM), fetal bovine serum (FBS) and phosphate-buffered saline (PBS) were all from Wisent (Qc, Canada). Cell culture plates and dishes were obtained from BD Biosciences (Franklin Lakes, NJ). Bovine serum albumine (BSA), poly-D-lysine, arginine-8 vasopressin (AVP), DDM (n-dodecyl-beta-D-maltoside,), 2-mercaptoethanol, and PMSF (phenylmethanesulfonyl fluoride) were purchased from Sigma Chemical Co.(St. Louis, MO). Digitonin and Cycloheximide were obtained from EMD Chemicals (Gibbstown, NJ). SR121463 was a generous gift from Sanofi-Aventis (Toulouse, France). The antibodies used were purchased from the following companies: rabbit anti-calnexin antibody was from Enzo Life Sciences (Plymouth Meeting, PA), HRP-conjugated rabbit anti-myc was from Santa Cruz Biotechnologies (Santa Cruz, CA), and HRP-coupled anti-mouse and anti-rabbit secondary antibodies were from GE Healthcare (Chalfont St. Giles, UK). The mouse anti-myc antibody (9E10 clone) was produced by our core facility as ascite fluids. Sepharose-conjugated protein G was obtained from (GE Healthcare). EndoH and PNGase enzymes were obtained from Roche (Laval, Qc). The DeepBlueC coelenterazine and white Optiplate were from Perkin Elmer Life-Sciences (Waltham, MA) while Coelenterazine-*h* was from Prolume (Pinetop, AZ). The plate reader used to measure BRET was a Mithras LB940 from Berthold (Bad Wildbad, Germany). Absorbance readings at 405 nm in 96-well plates were done in a OASYS UVM340 microplate reader (Montreal Biotech inc. Montreal, Canada).

Cell Culture and Transfections

HEK293T cells were maintained in Dulbecco's modified Eagles's medium (DMEM; Wisent) supplemented with 10% foetal bovine serum (Wisent) in a 37°C humidified incubator with a 5% CO₂ atmosphere. Transfections were performed with Fugene6 following the manufacturer's indications.

DNA constructs

The myc-tagged WT-V2R (Morello *et al.*, 2000) and the WT-V2R-*Renilla*-luciferase (WT-V2R-*Rluc*) were already described elsewhere (Bernier *et al.*, 2004). The different V2R mutations were

generated on these vectors by site-directed mutagenesis with the *Quick Change*TM mutation kit (Agilent Technologies, Santa-Clara, USA) using the manufacturer's protocol. The coding sequence of Calnexin (human transcript variant 1) was subcloned from pCMV6-XL5 and inserted in-frame in 5' of the Venus (YFP) fluorescent protein in the pcDNA3.1 vector (Invitrogen, Carlsbad, CA). The EPAC (exchange protein directly activated by cAMP) protein-based bioluminescence resonance energy transfer (BRET) biosensor (EPAC-BRET²) was also already described (Breton *et al.*, 2010). All DNA constructs and mutations were confirmed by direct sequencing.

Co-immunoprecipitation and Western blotting

For whole cell immunoprecipitations, the cells were lysed in immunoprecipitation buffer (25 mM Tris pH7.4, 10 mM CaCl₂, 0.5% Digitonin and 1 mM PMSF) and centrifuged for 30 min at 145 000 g to get rid of insoluble material. Ascite mouse anti-myc (2.5 µL) or rabbit anti-calnexin antibody (1 µg) was then added to the clarified lysate with protein-G-conjugated sepharose beads for 16 hours at 4°C. After washing the beads with immunoprecipitation buffer (3 washes), the immunopurified receptors or calnexin were subsequently resolved on a 10% SDS-PAGE and transferred onto a nitrocellulose membrane (Perkin Elmer). Immunoblotting of the receptors or calnexin were performed using the HRP-conjugated anti-myc antibody or a rabbit anti-calnexin followed by incubation with a HRP-coupled goat anti-rabbit secondary antibody, respectively. Immune complexes were visualized by chemiluminescence using the Western LightningTM chemiluminescence substrate (Perkin Elmer, MA) using the LAS-3000 Imaging System (Fuji, Japan).

Cell surface ELISA.

Cell surface receptor expression was assessed by ELISA (enzyme-linked immunosorbant assay) as described previously (Hamdan *et al.*, 2007). Briefly, HEK293T cells were seeded in 6-well plates (4x10⁵ cells/well) and transfected with the indicated receptors constructs the next day. 24h following transfection, cells were transferred into poly-D-lysine-coated 24 well plates and treated or not with the PC SR121463. Cells were fixed the next day with Tris-buffered saline (TBS; 10 mM Tris, 150 mM NaCl, pH7.4) containing 3.7% formaldehyde for 5 min at room temperature, washed with TBS and incubated with 1% BSA-containing TBS (TBS-B) for blockage. The

blocking buffer was then replaced with the 9E10 mouse monoclonal anti-myc antibody diluted in TBS-B (1:1000), incubated 1 hour, and washed again before being incubated with an alkaline phosphatase-conjugated anti-mouse antibody (1:1000; BIO-RAD Mississauga, Ont.) in TBS-B. After washing, cell surface expression was determined by the colorimetric reaction initiated by the addition of the *Alkaline phosphatase conjugate substrate kit* (BIO-RAD) which was stopped by adding an equivalent volume of NaOH to the wells. The intensity of the reaction was quantified by spectrophotometry using the OASYS UVM340 microplate reader (Montreal Biotech inc. Montreal, Canada) at 405 nm. Net surface expression was determined by subtracting the absorbance values obtained for the mock transfected wells.

Deglycosylation of immunoprecipitated receptors

Cells were transfected with the indicated receptor construct 48 hours prior to solubilization. For PC treated samples, addition of SR121463 was done 18 hours before the harvest. Total receptors were immuno-precipitated as described above and eluted from the protein-G-conjugated sepharose beads with 1% (w/v) SDS, 50 mM sodium phosphate, pH 7.5. Before starting the enzymatic reactions, the eluates were diluted 10-fold with 0.5% (w/v) DDM in 50 mM sodium phosphate pH 5.5, 50 mM EDTA, 1% 2-mercaptoethanol, 0.5 mM PMSF for Endo H, or 50 mM Na-phosphate pH 7.5, 50 mM EDTA, 1% 2-mercaptoethanol, 0.5 mM PMSF, for PNGase F. The enzymes were added at final concentrations of 25 milliunits/ml (Endo H) or 20 units/ml (PNGase F). The enzymatic reactions were left overnight at 37°C prior to SDS-PAGE and western blotting.

cAMP production measurement

An EPAC BRET²-based biosensor was used to semi-quantitatively assess cAMP production, as described (Barak *et al.*, 2008). Briefly, HEK-293T cells were co-transfected with the EPAC BRET²-based sensor and either WT- or mutant V2R constructs. Following a 48-h incubation at 37°C, the cells were detached and transferred into 96-well plates at a density of 8 to 10x10⁴ cells/well in PBS. When cells were treated overnight with SR121463 (10 µM), three PBS washes (5 min interval between each wash) were performed prior to cell transfer into 96-well plates. Vehicle or AVP (10 µM) was then added and followed by a 15-min incubation at 37°C. After the addition of DeepBlueC coelenterazine (final concentration, 5 µM) to each well, the plate was

read into a Mithras LB940 instrument (Berthold Technologies, Bad Wildbad, Germany) using the MicroWin 2000 software (Berthold Technologies). The BRET signal was determined by calculating the ratio of the light emitted at 505 to 555 nm (YFP) to the light emitted at 465 to 505 nm (Luciferase). Since BRET values decrease upon cAMP binding to EPAC, the obtained values for AVP or SR+AVP treated cells were subtracted from basal BRET (BRET obtained with cells treated with vehicle) to yield positive numbers.

Calnexin/Receptors proximity assessment by BRET

The cells were transfected in 6-well plates with the calnexin-YFP (200ng) and receptor-Rluc (20 ng) constructs, or receptor-Rluc constructs alone (to obtain basal BRET values). SR121463 (10 μ M) was added to the cells and BRET was measured every hour thereafter for 7 hours. At each time point, the cells were rinsed and resuspended in PBS, transferred into a white 96-well Optiplate (1 X 10⁴ cells/well), and coelenterazine-*h* was added (5 μ M final). After 5 min incubation, the plate was read using the Mithras LB940 instrument and data collected by the MicroWin 2000 software. The BRET signal was determined by calculating the ratio of the light emitted at 505 to 555 nm (YFP) to the light emitted at 465 to 505 nm (Luciferase). BRET values were determined using the Net BRET which is calculated by subtracting basal BRET value (Luciferase construct alone) to the BRET value obtained with both interacting partners. Relative BRET was calculated by dividing net BRET at each time point by the net BRET value obtained for untreated samples.

Cycloheximide chase of V2R/calnexin interaction

Cells were transfected in 6-well plates with the indicated receptor constructs 24 hours prior to the chase. For SR121463 treated samples, the PC (10 μ M) was added 3 hours after transfection. Cycloheximide (20 μ M in DMSO) was added at different time points and the cells were harvest and processed as described in the immunoprecipitation section. Densitometric quantifications of the immunoreactive bands were done using the Muligauge software (Fuji, Japan). Values are presented as a percentage of the calnexin-bound receptors obtained in the untreated wells (time 0). The data were analyzed with the GraphPad Prism software using one phase decay equation. The results are from three independent experiments.

Statistical analyses

Data are presented as mean \pm S.E.M., and statistical significance of the differences were assessed by ANOVA. Pair-wise comparisons were made by post hoc Bonferroni's multiple comparison test. Differences with $P < 0.05$ were considered significant. Symbols used: * when comparing the different receptors and \square when comparing between untreated and treated samples.

Results:

Clinical outcome severity of patients carrying the W164S or Y128S mutations

Two NDI-causing V2R mutations, W164S- and Y128S-V2R, were selected for the present study. As shown in table 1, these two mutant forms of the receptor are representative of mutation at each end of the spectrum of NDI clinical manifestations. Indeed, a male patient bearing the Y128S mutation was found to have a relatively mild phenotype since maximal urine osmolality during dehydration was 321 mOsm/kg H₂O with concomitant plasma sodium of 154 mEq/L. Also, he increased his urine osmolality from 101 to 243 mOsm/kg of H₂O after a pharmacological (24 µg) intravenous dose of dDAVP (desmopressin). He was never hospitalized for dehydration episodes. Another male patient bearing the Y128S mutation (in an unrelated family) was found to have a similar mild phenotype, with urine osmolality of 314 after dehydration (plasma sodium 152 mEq/L), and urine osmolality 387 mOsm/kg H₂O post dDAVP administration. In contrast, the male patient bearing the W164S mutation has a severe phenotype, with a maximal urine osmolality during dehydration of 80.5 mOsm/kg H₂O with concomitant plasma sodium of 158mEq/L. His urine osmolality was unchanged after a dDAVP treatment: 79 mOsm/kg H₂O before administration and 72 mOsm/kg H₂O after. Overall, these physiological data illustrate well the difference in the clinical outcome severity of patients with either the Y128S or W164S mutations.

Maturation profile and surface expression of WT-, W164S- and Y128S-V2R.

To assess the maturation profile of the receptors, total cell lysates from HEK293T cells transiently expressing WT-, W164S- or Y128S-V2R that were treated or not with the PC SR121463, were subjected to SDS-PAGE and Western blot analysis using the anti-myc antibody (9E10) that recognizes the myc epitope present at the N-terminus of each construct (Fig 1A). The presence and the nature of oligosaccharide chains were assessed by treatment with Endoglycosidase H (endoH) and Peptide: N-Glycosidase F (PNGaseF). For the WT and the two mutant receptors, a doublet at 37 and 40 kDa was observed (Fig 1A, bands A & B). The 37 kDa band corresponds to the unglycosylated species, as it migrates at the predicted molecular weight

of the receptor. Since addition of N-linked glycans is a co-translational process, the presence of such specie results from the accumulation of deglycosylated receptors targeted for degradation after unproductive folding attempts (Petaja-Repo *et al.*, 2000). The 40 kDa entity (band B) represents the ER-core glycosylated receptor, as determined by its sensitivity to endoH treatment (Fig. 1B). An additional diffuse band, spanning 45 to 55 kDa (Fig 1A, band C) is observed. EndoH treatment had no effect on the mobility of these bands while PNGaseF treatment reduces its apparent molecular weight to approximately 43 kDa (figure 1B, lanes 2 & 3), indicating that the 45-55 kDa bands corresponds to the fully glycosylated, mature receptors harbouring complex sugars. PNGaseF treatment did not yield the 37 kDa species corresponding to the deglycosylated receptor but rather a 43 kDa species representing the O-glycosylated form, as previously reported (Sadeghi et Birnbaumer, 1999), indicative of a transit of the receptor through the Golgi apparatus where O-glycosylation occurs. The intensity of the 45-55 kDa mature form was dramatically reduced for both W164S- and Y128S-V2R as compared to the WT receptor, consistent with the impaired maturation previously reported for those NDI-causing mutant receptors. Using the densitometric ratio of mature/immature forms as an estimate (band C over band A + band B), the maturation efficiency of W164S- and Y128S-V2R was found to be 21 and 29% of the WT respectively (Fig 1a inset). Upon treatment with SR121463, a 1.74- and 2.24-fold increase in the mature/immature ratio was observed for W164S- and Y128S-V2R respectively, indicating that their maturation and processing was promoted by the PC (Fig. 1a and inset). A small increase of the WT mature forms was also observed but did not reach statistical significance. The higher molecular weight species (bands D & E) observed for all receptors represent SDS-resistant oligomeric forms, as regularly reported for GPCRs.

Whole cell ELISAs were performed to assess relative surface expression of the different receptors. As seen in Figure 1C, the two mutant receptors have a significantly compromised cell surface expression (~16 and ~28% of the WT for the W164S- and Y128S-V2R, respectively), consistent with the altered maturation observed. SR121463 treatment led to a significant increase of cell surface expression for both receptor mutants reaching ~67.5 and 89.5% of the untreated WT level for W164S- and Y128S-V2R respectively. In contrast, the PC treatment did not significantly affect the cell surface expression of WT-V2R.

Analysis of N-linked glycosylation mutants

Sadeghi and Birnbaumer (Sadeghi et Birnbaumer, 1999) have shown that mutagenesis of asparagine 22 to glutamine abolishes N-linked glycosylation of the V2 receptor (N22Q-V2R) without altering its function or expression level. However, the role of this N-glycan on the maturation and PC-mediated rescue of NDI-causing V2R mutants has never been assessed. We thus generated N22Q versions for the three V2R variants and looked at their maturation profile, cell surface expression, and rescue by a PC. Mutating the unique N-glycosylation site in the WT-V2R (WT-N22Q) led to the disappearance of the ~45-55 kDa leaving the ~43 kDa band (Fig 2A) corresponding to the O-glycosylated form of the receptor as observed after PNGase F digestion of the WT receptor (Fig. 1B) and the non-glycosylated ~37 kDa species. For Y128S/N22Q-V2R, the 37 kDa band was the main receptor species observed and only a faint 43 kDa band was observed, indicating that the absence of the N-linked sugar did not favor the release of the receptor from the ER and its further processing through the Golgi apparatus. A similar finding was obtained for the N-glycosylation deficient mutant W164S-V2R (W164S/N22Q). However, W164S/N22Q-V2R did not yield any 37 kDa product but rather a ~33 kDa species that accumulated heavily in the cell, (only 1/5 of the lysate was loaded on gel to yield comparable immunoreactivity). This increased mobility of the W164S/N22Q-V2R may be due to cleavage of its C-terminus (immune detection being dependent on an intact N-terminus) or to an early interruption of the elongation process. In any case, the intracellular accumulation and the reduced molecular weight of the W164S/N22Q-V2R suggest that in contrast to what was observed for Y128S-V2R, N-linked glycans plays a critical role in its processing of W164S-V2R since its removal resulted in impaired processing.

As was the case for the glycosylated V2R mutant forms, SR121463 treatment facilitated the maturation of Y128S/N22Q-V2R, as indicated by the net increase in the mature, 43 kDa species (Fig 3) and the rescue of its cell surface expression (Fig 2B) and signaling activity (Fig 2C), indicating that the N-glycan is not required for the pharmaco-chaperoning of Y128S-V2R. In sharp contrast, the W164S/N22Q-V2R did not respond to the PC, as its migration pattern was not altered by the treatment (Fig 3). This also contrasts with the significant maturation rescue of its glycosylated counterpart, W164S-V2R, by SR121463 (Fig 1A) demonstrating that the

absence of N-linked sugar renders W164S-V2R irresponsive to the PC. Consistent with the lack of SR121463-promoted maturation of W164S/N22Q-V2R, neither its cell surface targeting (Fig 2B) nor its signaling activity (Fig 2C) were rescued by the PC. Taken together these data unravel a mutation-specific role of N-glycosylation on the processing of misfolded V2R and their ability to be rescued by PCs.

Calnexin interaction with the different V2Rs

Given the importance of N-glycan for the interaction of folding proteins with the molecular chaperone calnexin (Cnx), we then assessed the interaction between the receptors and this ER-resident protein. Receptors from HEK293T cells transiently expressing the different V2R constructs were immunoprecipitated and the amount of associated Cnx was visualized by Western blotting. As shown in figure 3, the N-glycan bearing WT and mutant forms of V2R interacted with Cnx. Mutating the glycosylation site (N22Q) almost completely prevented the co-immunoprecipitation of Cnx with the three receptor forms, confirming that sugars are important for receptor-Cnx interaction, as often reported for other proteins. Interestingly, the amount receptor-bound Cnx was similar between receptors suggesting that, at steady state, a similar fraction of mutant and WT receptors are in association with Cnx. Moreover, treating the cells with the PC did not affect the steady-state of Cnx/V2R interaction for any of the three receptor forms. Given the previous observations that the proportion of core-glycosylated form of the receptor (expected to interact with Cnx) is greater for the mutants than the WT receptor (see Fig. 1A) and that the PC treatment reduced the amount of ER-retained mutant receptors, these results suggest that, at these expression levels, the amount of ER-resident receptors may saturate the capacity of Cnx to process nascent receptors. No interaction was detected between any of the receptor forms and calreticulin, the soluble homolog of Cnx also known to bind N-glycosylated proteins in the ER (data not shown).

Although no change in the steady-state amount of receptor-bound CNX was observed between WT and mutant receptor forms, or upon PC treatment, the kinetic of this interaction could be affected. To test this possibility, the amount of Cnx-bound receptors was monitored by co-immunoprecipitation at different time point after the addition of the protein synthesis inhibitor cycloheximide (CHX) to assess the dissociation kinetics. Cnx-bound receptors were then probed

by Western blotting (Fig 4A & B). The results show that Cnx interacts principally with the core glycosylated (40 kDa) form of the receptors, which is consistent with the fact that N-glycans are important for this interaction. For the Y128S-V2R, the half-life of the interaction with Cnx was found to be equal to that of the WT-V2R (40 ± 7.8 and 41 ± 4.8 min respectively). The fact that Y128S-V2R has the same time of interaction with Cnx than the WT-V2R while being retained in the ER suggests that Cnx does not participate in the retention of this particular mutant, implying that other components, downstream of Cnx, are preventing the anterograde transport of Y128S-V2R. For W164S-V2R, the interaction with Cnx was found to be significantly longer than for the two other receptors with a half-time of dissociation of 60 ± 7.2 min, suggesting that Cnx interaction may contribute to the ER-retention of this mutant. These results thus suggest that the mechanisms involved in the recognition and processing of ER-retained mutants are mutation-specific. Upon SR121463 treatment, the dissociation time with Cnx was similarly reduced for both WT- and Y128S-V2R (22.2 ± 3 and 20.4 ± 1.8 min, respectively). The fact that the interaction time of Y128S-V2R with Cnx is indissociable from that of the WT receptor upon a PC treatment while its maturation is promoted by the treatment suggest that the PC may affect other retention mechanisms downstream of Cnx. Interestingly, the PC treatment did not significantly affect the length of Cnx interaction with the W164S-V2R confirming again a difference in the retention mechanism of the two receptor mutants. To validate these results, we took advantage of a BRET-based assay monitoring the proximity of receptors to Cnx. Coherent with the results presented in Figure 4A & B, the BRET decay in the presence of the PC was faster for Y128S- than for W164S-V2R (Fig. 4C), supporting the notion that that dissociation from Cnx is accelerated for Y128S but not W164S-V2R. Combining the fact that the PC treatment induced a significant rescue of the W164S-V2R's maturation and cell surface expression (Fig 1A & 1C) with the fact that the treatment did not affect the length of the prolonged receptor-Cnx interaction allows to suggest that at least two control points are contributing to the intracellular retention of this mutant and that the beneficial PC action on the maturation efficiency of W164S-V2R occurs downstream of Cnx. Taken together our results suggest that Y128S-V2R is retained after Cnx interaction while W164S-V2R is retained both during Cnx interaction and downstream of this interaction. These differences may explain the variable susceptibility of the two mutants to N-sugar removal and their efficiency of rescue by a PC treatment.

Discussion

Although there is a growing list of diseases associated with GPCR misfolding, the mechanisms involved in their maturation, and in the recognition and retention of misfolded mutant receptors are still poorly understood. The emergence of a new class of therapeutics, which are known to promote the maturation of specific ER-retained misfolded proteins, justifies a better understanding of their mode of action. Since the discovery of pharmaco-chaperoning, the V2R has been a model of choice and was intensively studied. Indeed, the folding and processing of V2R are highly sensitive to genetic alterations as indicated by the identification of more than 200 distinct mutations affecting receptor function and leading to NDI (Spanakis *et al.*, 2008), most of them as a result of misprocessing (Morello *et al.*, 2001). From what is known, pharmaco-chaperoning is restricted to a subset of mutations and its efficacy (efficiency of cell surface expression recovery) is mutation-specific (Morello *et al.*, 2000; Robben *et al.*, 2007; Rene *et al.*, 2010). These data suggest that the intracellular retention of different mutations may involve distinct quality control mechanism. Consistent with this notion, some NDI-causing V2R mutations were found to be retained in the ER while others were found to progress to the ERGIC compartment before being retro-translocated to the ER (Hermosilla *et al.*, 2004). In order to investigate further how distinct mutations could be differentially recognized by the quality control system, we took advantage of two NDI-causing V2R mutations leading to different severity of the disease.

We found that the receptor harbouring a mutation leading to a severe NDI phenotype (W164S) was less efficiently targeted to the cell surface than the Y128S-V2R which is linked to a mild clinical outcome. This difference in cell-surface targeting was reflected in the cAMP accumulation promoted by AVP stimulation in cells expressing these receptors. Also, whereas the PC treatment only partially restored the cell surface expression and signalling of W164S, it promoted the cell surface targeting and signalling of Y128S-V2R to levels similar to that of the WT-V2R. Taken together, these data demonstrate a difference in the capacity of the cells to fold

and process the two mutants. The difference in the extent of cell surface targeting and PC responsiveness between the two mutants is not solely a quantitative gradation but most likely results from an intrinsic difference of their handling by the quality control system. Indeed, whereas mutation of the unique V2R N-glycosylation site did not affect the level of Y128S-V2R maturation and cell surface expression it completely abrogated the maturation and membrane targeting of the W164S-V2R. In addition, the lack-of N-linked glycans for W164S-V2R yielded a single receptor species that was shorter than the unglycosylated form observed for either Y128S- or WT V2R (33 kDa vs 37 kDa). This truncated receptor species that accumulates intracellularly to very high levels may represent either a degradation intermediate that is generated by proteolysis or by the premature interruption of the polypeptide elongation during translation. In any case, these data illustrate a major difference in the role of the N-linked sugars on the processing of the two NDI mutant studied herein. Whereas for Y128S-V2R, the presence or absence of N-glycosylation does not affect the receptor processing, the occurrence of this co-translational modification is essential for the normal processing and, seemingly, the degradation of the W164S-V2R. This dependence on the presence of N-linked sugars may indicate a role for lectin chaperones in the handling of W164S-V2R. Alternatively, since it has been shown that addition of large polar carbohydrates core have a role in promoting and stabilizing local structures (Petrescu *et al.*, 2004), the presence of N-glycans could directly affect the biophysical properties of the nascent polypeptide chain thus favouring the processing of W164S-V2R toward the degradation pathway.

In most cases reported, Cnx binding to nascent folding proteins was shown to involve the presence of N-linked sugars. However, Lanctot *et al.* (Lanctot *et al.*, 2006) showed that the N-glycosylation-deficient mutant AT1 receptor, which normally has two N-glycosylation sites, could still interact with Cnx. In addition, the human LH receptor (with 6 putative N-glycosylation sites) was found to interact with Cnx in the presence of the glucosidase inhibitor castanospermin (Mizrachi et Segaloff, 2004), highlighting the possibility of a protein-based interaction of the chaperone with some GPCRs. In contrast with these studies, we show here that N-glycans play a central role for the binding of V2R to Cnx. Indeed, removal of the N-glycosylation site essentially abolished the co-immunoprecipitation of the WT, and mutant forms of V2R with Cnx. When considering the kinetics of interaction with Cnx for the different receptor forms considered, W164S-V2R was found to have a significantly prolonged interaction

time when compared with WT-V2R, suggesting that the interaction with the lectin chaperone contributed to the retention of the mutant receptor. This is consistent with a previous study demonstrating that another NDI-causing V2R mutant (R337X), also showed a longer interaction time with Cnx (Morello *et al.*, 2001) indicating that at least in some cases, the Cnx complex is able to discriminate between native and defective conformations. In contrast, Y128S-V2R was found to have the same interaction time with Cnx than the WT receptor suggesting that this mutant form was not retained through its interaction with Cnx, implying the existence of another control point in the quality control system. This is consistent with the observation that mutation of the glycosylation site, which is essential for Cnx interaction, did not promote cell surface targeting of Y128S. This also suggests that the mechanism involved in the retention of Y128S-V2R is lectin-independent. Our results also confirm the previous finding that N-glycan are not essential for the normal maturation and cell surface targeting of the WT-V2R since the N22Q mutation did not affect its cell surface expression and signalling.

As previously found for many NDI-causing V2R mutations (Morello *et al.*, 2000; Robben *et al.*, 2004; Wuller *et al.*, 2004), treatment with PC rescued the cell surface and signaling capacity of both Y128S- and W164S-V2R. Consistent with the distinct effects of N-glycosylation site removal on the processing of Y128S- and W164S-V2R, the N22Q mutation led to dramatically different consequences on the responsiveness of the two receptors to PC. Indeed, whereas the unglycosylated Y128S-V2R responded to the PC treatment as well as its glycosylated form, the lack of glycosylation on W164S-V2R completely abolished the ability of the PC to rescue its maturation and cell surface targeting. The difference between the two mutants could also be appreciated when considering the effect of the PC on the kinetics of interaction between the receptors and Cnx. For both WT- and Y128S-V2R, PC treatment accelerated their dissociation from Cnx. Similar effects were previously reported for mutant forms of the V1b receptor (Robert *et al.*, 2005) and hERG channel (Gong *et al.*, 2006). This effect however, is probably not responsible for the rescue of the Y128S-V2R by the PC since the decrease was of similar magnitude for both WT- and Y128S-V2R. Furthermore, and as previously discussed, preventing Cnx interaction by mutating the N-glycosylation site did not prevent intracellular retention nor PC-mediated rescue of this particular mutant. This suggests again the existence of another quality control point that may represent the export limiting step overcome by the binding of PC to the mutant receptor. Interestingly, despite the suspected role of

Cnx in the retention of W164S-V2R that is suggested by its prolonged interaction with the lectin-chaperone, the PC treatment did not affect this interaction time. This suggests that, similarly to what was concluded for Y128S-V2R the rescue action of the PC does not occur at the receptor-Cnx interaction step. The mechanism involved in the intracellular retention of the mutants downstream of Cnx is still unknown, but it could be the similar for the two mutants studied herein. Nevertheless, the different PC effect on the interaction time between the two mutants and Cnx reflect a differential handling of the two mutants by the ER quality control system. Moreover, N-glycans were shown essential for the folding, degradation and PC-mediated rescue of the W164S mutant while being dispensable in all these processes for Y128S, stressing again the intrinsic difference between the mutant receptors. Our results also indicate that the pharmacological chaperoning can occur either before or during Cnx interaction for some mutant, and after this interaction for others, suggesting that the 'prise en charge' of mutant V2R by the secretory pathway could be mutant specific. Although we cannot conclude on the precise molecular determinants leading to the distinct handling of W164S- and Y128S-V2R by the quality control system, our study highlight that this system does not rely on a binary process simply distinguishing between properly folded and misfolded proteins but rather depends on an elaborate process that involves distinct mechanisms depending on the nature of the conformational defects promoted by a given mutation.

References

1. Tan, C. M., Brady, A. E., Nickols, H. H., Wang, Q., and Limbird, L. E. (2004) Membrane trafficking of G protein-coupled receptors, *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 44, 559-609.
2. Sung, C. H., Davenport, C. M., Hennessey, J. C., Maumenee, I. H., Jacobson, S. G., Heckenlively, J. R., Nowakowski, R., Fishman, G., Gouras, P., and Nathans, J. (1991) Rhodopsin mutations in autosomal dominant retinitis pigmentosa, *Proc Natl Acad Sci U S A* 88, 6481-6485.
3. Bradbury, F. A., Kawate, N., Foster, C. M., and Menon, K. M. (1997) Post-translational processing in the Golgi plays a critical role in the trafficking of the luteinizing hormone/human chorionic gonadotropin receptor to the cell surface, *J Biol Chem* 272, 5921-5926.
4. Birnbaumer, M., Gilbert, S., and Rosenthal, W. (1994) An extracellular congenital nephrogenic diabetes insipidus mutation of the vasopressin receptor reduces cell surface expression, affinity for ligand, and coupling to the Gs/adenylyl cyclase system, *Mol Endocrinol* 8, 886-894.
5. Janovick, J. A., Maya-Nunez, G., and Conn, P. M. (2002) Rescue of hypogonadotropic hypogonadism-causing and manufactured GnRH receptor mutants by a specific protein-folding template: misrouted proteins as a novel disease etiology and therapeutic target, *J Clin Endocrinol Metab* 87, 3255-3262.
6. Gromoll, J., Schulz, A., Borta, H., Gudermann, T., Teerds, K. J., Greschniok, A., Nieschlag, E., and Seif, F. J. (2002) Homozygous mutation within the conserved Ala-Phe-Asn-Glu-Thr motif of exon 7 of the LH receptor causes male pseudohermaphroditism, *Eur J Endocrinol* 147, 597-608.
7. Rannikko, A., Pakarinen, P., Manna, P. R., Beau, I., Misrahi, M., Aittomaki, K., and Huhtaniemi, I. (2002) Functional characterization of the human FSH receptor with an inactivating Ala189Val mutation, *Mol Hum Reprod* 8, 311-317.
8. Biebermann, H., Schoneberg, T., Krude, H., Schultz, G., Gudermann, T., and Gruters, A. (1997) Mutations of the human thyrotropin receptor gene causing thyroid hypoplasia and persistent congenital hypothyroidism, *J Clin Endocrinol Metab* 82, 3471-3480.

9. D'Souza-Li, L., Yang, B., Canaff, L., Bai, M., Hanley, D. A., Bastepe, M., Salisbury, S. R., Brown, E. M., Cole, D. E., and Hendy, G. N. (2002) Identification and functional characterization of novel calcium-sensing receptor mutations in familial hypocalciuric hypercalcemia and autosomal dominant hypocalcemia, *J Clin Endocrinol Metab* 87, 1309-1318.
10. Valverde, P., Healy, E., Sikkink, S., Haldane, F., Thody, A. J., Carothers, A., Jackson, I. J., and Rees, J. L. (1996) The Asp84Glu variant of the melanocortin 1 receptor (MC1R) is associated with melanoma, *Hum Mol Genet* 5, 1663-1666.
11. Ho, G., and MacKenzie, R. G. (1999) Functional characterization of mutations in melanocortin-4 receptor associated with human obesity, *J Biol Chem* 274, 35816-35822.
12. Tanaka, H., Moroi, K., Iwai, J., Takahashi, H., Ohnuma, N., Hori, S., Takimoto, M., Nishiyama, M., Masaki, T., Yanagisawa, M., Sekiya, S., and Kimura, S. (1998) Novel mutations of the endothelin B receptor gene in patients with Hirschsprung's disease and their characterization, *J Biol Chem* 273, 11378-11383.
13. Fuchs, S., Amiel, J., Claudel, S., Lyonnet, S., Corvol, P., and Pinet, F. (2001) Functional characterization of three mutations of the endothelin B receptor gene in patients with Hirschsprung's disease: evidence for selective loss of Gi coupling, *Mol Med* 7, 115-124.
14. Vassart, G., and Costagliola, S. (2011) G protein-coupled receptors: mutations and endocrine diseases, *Nat Rev Endocrinol* 7, 362-372.
15. Fujiwara, T. M., Morgan, K., and Bichet, D. G. (1995) Molecular biology of diabetes insipidus, *Annu Rev Med* 46, 331-343.
16. Conn, P. M., Ulloa-Aguirre, A., Ito, J., and Janovick, J. A. (2007) G protein-coupled receptor trafficking in health and disease: lessons learned to prepare for therapeutic mutant rescue in vivo, *Pharmacol Rev* 59, 225-250.
17. Bichet, D. G. (2008) Vasopressin receptor mutations in nephrogenic diabetes insipidus, *Semin Nephrol* 28, 245-251.
18. Spanakis, E., Milord, E., and Gagnoli, C. (2008) AVPR2 variants and mutations in nephrogenic diabetes insipidus: review and missense mutation significance, *J Cell Physiol* 217, 605-617.
19. Morello, J. P., Salahpour, A., Laperriere, A., Bernier, V., Arthus, M. F., Lonergan, M., Petaja-Repo, U., Angers, S., Morin, D., Bichet, D. G., and Bouvier, M. (2000)

- Pharmacological chaperones rescue cell-surface expression and function of misfolded V2 vasopressin receptor mutants, *J Clin Invest* 105, 887-895.
20. Morello, J. P., Salahpour, A., Petaja-Repo, U. E., Laperriere, A., Lonergan, M., Arthus, M. F., Nabi, I. R., Bichet, D. G., and Bouvier, M. (2001) Association of calnexin with wild type and mutant AVPR2 that causes nephrogenic diabetes insipidus, *Biochemistry* 40, 6766-6775.
 21. Bernier, V., Lagace, M., Lonergan, M., Arthus, M. F., Bichet, D. G., and Bouvier, M. (2004) Functional rescue of the constitutively internalized V2 vasopressin receptor mutant R137H by the pharmacological chaperone action of SR49059, *Mol Endocrinol* 18, 2074-2084.
 22. Wuller, S., Wiesner, B., Loffler, A., Furkert, J., Krause, G., Hermosilla, R., Schaefer, M., Schulein, R., Rosenthal, W., and Oksche, A. (2004) Pharmacochaperones post-translationally enhance cell surface expression by increasing conformational stability of wild-type and mutant vasopressin V2 receptors, *J Biol Chem* 279, 47254-47263.
 23. Robben, J. H., Sze, M., Knoers, N. V., and Deen, P. M. (2007) Functional rescue of vasopressin V2 receptor mutants in MDCK cells by pharmacochaperones: relevance to therapy of nephrogenic diabetes insipidus, *Am J Physiol Renal Physiol* 292, F253-260.
 24. Bernier, V., Bichet, D. G., and Bouvier, M. (2004) Pharmacological chaperone action on G-protein-coupled receptors, *Curr Opin Pharmacol* 4, 528-533.
 25. Morello, J. P., Petaja-Repo, U. E., Bichet, D. G., and Bouvier, M. (2000) Pharmacological chaperones: a new twist on receptor folding, *Trends Pharmacol Sci* 21, 466-469.
 26. Bernier, V., Lagace, M., Bichet, D. G., and Bouvier, M. (2004) Pharmacological chaperones: potential treatment for conformational diseases, *Trends Endocrinol Metab* 15, 222-228.
 27. Rajan, R. S., Tsumoto, K., Tokunaga, M., Tokunaga, H., Kita, Y., and Arakawa, T. (2011) Chemical and pharmacological chaperones: application for recombinant protein production and protein folding diseases, *Curr Med Chem* 18, 1-15.
 28. Bernier, V., Morello, J. P., Zarruk, A., Debrand, N., Salahpour, A., Lonergan, M., Arthus, M. F., Laperriere, A., Brouard, R., Bouvier, M., and Bichet, D. G. (2006) Pharmacologic

- chaperones as a potential treatment for X-linked nephrogenic diabetes insipidus, *J Am Soc Nephrol* 17, 232-243.
29. Shimizu, Y., and Hendershot, L. M. (2007) Organization of the functions and components of the endoplasmic reticulum, *Adv Exp Med Biol* 594, 37-46.
 30. Ware, F. E., Vassilakos, A., Peterson, P. A., Jackson, M. R., Lehrman, M. A., and Williams, D. B. (1995) The molecular chaperone calnexin binds Glc1Man9GlcNAc2 oligosaccharide as an initial step in recognizing unfolded glycoproteins, *J Biol Chem* 270, 4697-4704.
 31. Hammond, C., Braakman, I., and Helenius, A. (1994) Role of N-linked oligosaccharide recognition, glucose trimming, and calnexin in glycoprotein folding and quality control, *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 913-917.
 32. Hebert, D. N., Foellmer, B., and Helenius, A. (1995) Glucose trimming and reglucosylation determine glycoprotein association with calnexin in the endoplasmic reticulum, *Cell* 81, 425-433.
 33. Ihara, Y., Cohen-Doyle, M. F., Saito, Y., and Williams, D. B. (1999) Calnexin discriminates between protein conformational states and functions as a molecular chaperone in vitro, *Mol Cell* 4, 331-341.
 34. Brockmeier, A., Brockmeier, U., and Williams, D. B. (2009) Distinct contributions of the lectin and arm domains of calnexin to its molecular chaperone function, *J Biol Chem* 284, 3433-3444.
 35. Rozell, T. G., Davis, D. P., Chai, Y., and Segaloff, D. L. (1998) Association of gonadotropin receptor precursors with the protein folding chaperone calnexin, *Endocrinology* 139, 1588-1593.
 36. Butz, J. A., Niebauer, R. T., and Robinson, A. S. (2003) Co-expression of molecular chaperones does not improve the heterologous expression of mammalian G-protein coupled receptor expression in yeast, *Biotechnol Bioeng* 84, 292-304.
 37. Lu, M., Echeverri, F., and Moyer, B. D. (2003) Endoplasmic reticulum retention, degradation, and aggregation of olfactory G-protein coupled receptors, *Traffic* 4, 416-433.
 38. Ge, X., Loh, H. H., and Law, P. Y. (2009) mu-Opioid receptor cell surface expression is regulated by its direct interaction with Ribophorin I, *Mol Pharmacol* 75, 1307-1316.

39. Lanctot, P. M., Leclerc, P. C., Escher, E., Guillemette, G., and Leduc, R. (2006) Role of N-glycan-dependent quality control in the cell-surface expression of the AT1 receptor, *Biochem Biophys Res Commun* 340, 395-402.
40. Sadeghi, H., and Birnbaumer, M. (1999) O-Glycosylation of the V2 vasopressin receptor, *Glycobiology* 9, 731-737.
41. Breton, B., Sauvageau, E., Zhou, J., Bonin, H., Le Gouill, C., and Bouvier, M. (2010) Multiplexing of multicolor bioluminescence resonance energy transfer, *Biophys J* 99, 4037-4046.
42. Hamdan, F. F., Rochdi, M. D., Breton, B., Fessart, D., Michaud, D. E., Charest, P. G., Laporte, S. A., and Bouvier, M. (2007) Unraveling G protein-coupled receptor endocytosis pathways using real-time monitoring of agonist-promoted interaction between beta-arrestins and AP-2, *J Biol Chem* 282, 29089-29100.
43. Barak, L. S., Salahpour, A., Zhang, X., Masri, B., Sotnikova, T. D., Ramsey, A. J., Violin, J. D., Lefkowitz, R. J., Caron, M. G., and Gainetdinov, R. R. (2008) Pharmacological characterization of membrane-expressed human trace amine-associated receptor 1 (TAAR1) by a bioluminescence resonance energy transfer cAMP biosensor, *Mol Pharmacol* 74, 585-594.
44. Petaja-Repo, U. E., Hogue, M., Laperriere, A., Walker, P., and Bouvier, M. (2000) Export from the endoplasmic reticulum represents the limiting step in the maturation and cell surface expression of the human delta opioid receptor, *J Biol Chem* 275, 13727-13736.
45. Morello, J. P., and Bichet, D. G. (2001) Nephrogenic diabetes insipidus, *Annu Rev Physiol* 63, 607-630.
46. Rene, P., Le Gouill, C., Pogozeva, I. D., Lee, G., Mosberg, H. I., Farooqi, I. S., Valenzano, K. J., and Bouvier, M. (2010) Pharmacological chaperones restore function to MC4R mutants responsible for severe early-onset obesity, *J Pharmacol Exp Ther* 335, 520-532.
47. Hermosilla, R., Oueslati, M., Donalies, U., Schonenberger, E., Krause, E., Oksche, A., Rosenthal, W., and Schulein, R. (2004) Disease-causing V(2) vasopressin receptors are retained in different compartments of the early secretory pathway, *Traffic* 5, 993-1005.

48. Petrescu, A. J., Milac, A. L., Petrescu, S. M., Dwek, R. A., and Wormald, M. R. (2004) Statistical analysis of the protein environment of N-glycosylation sites: implications for occupancy, structure, and folding, *Glycobiology* *14*, 103-114.
49. Mizrahi, D., and Segaloff, D. L. (2004) Intracellularly located misfolded glycoprotein hormone receptors associate with different chaperone proteins than their cognate wild-type receptors, *Mol Endocrinol* *18*, 1768-1777.
50. Robben, J. H., Knoers, N. V., and Deen, P. M. (2004) Regulation of the vasopressin V2 receptor by vasopressin in polarized renal collecting duct cells, *Mol Biol Cell* *15*, 5693-5699.
51. Robert, J., Auzan, C., Ventura, M. A., and Clauser, E. (2005) Mechanisms of cell-surface rerouting of an endoplasmic reticulum-retained mutant of the vasopressin V1b/V3 receptor by a pharmacological chaperone, *J Biol Chem* *280*, 42198-42206.
52. Gong, Q., Jones, M. A., and Zhou, Z. (2006) Mechanisms of pharmacological rescue of trafficking-defective hERG mutant channels in human long QT syndrome, *J Biol Chem* *281*, 4069-4074.

Table 1: Pertinent clinical data of patients with NDI bearing the W164S or Y128S mutations subjected to dDAVP or water deprivation challenge tests. For Y128S, data for two patients are shown (1 and 2)

Mutation:	Urine osmolality (mOsm/kg H₂O)		Response to Dehydration	
	Before dDAVP administration	After dDAVP administration	Plasma sodium (mEq/L)	Urine (mOsm/kg H₂O)
W164S	79	72	158	80.5
Y128S (1)	101	243	154	321
Y128S (2)	n.a.	387	152	314

Figure legends

Figure 1: *Maturation profile and surface expression of WT- and mutant V2R.*

Total extracts (75 μ g) of HEK293 cell transiently expressing for 48 hours the myc tagged WT-, W164S-, Y128S-V2R or transfected with an empty vector (Mock), treated or not for 18 hours with SR121463 (10 μ M) were subject to SDS-PAGE and Western blotting before (A) and after (B) endoglycosidases digestion using the HRP-coupled goat anti-myc antibody. In (A), the A band represent the unglycosylated form of the receptor, the B band is the core glycosylated immature form, and band C correspond to the fully glycosylated, mature receptor. Band D & E are oligomers of the core glycosylated and fully mature forms of the receptors, respectively. A densitometric analysis of mature over immature forms of the receptors is found in the graphic shown in inset For (B), the cells were all treated with SR121463 18 hours prior to solubilization. Surface receptor expression levels were determined with and without SR121463 treatment (18 hours) by ELISA (C) All experiments were performed three times. The ELISA data are expressed as means \pm SEM (n = 3).

Figure 2: *Maturation profile and surface expression of N-linked glycan deficient mutants V2R.*

(A) Total extract of transiently transfected HEK293 cells with either: N22Q-V2R, N22Q/W164S-V2R, N22Q/Y128S-V2R constructs or an empty vector (mock) were subject to SDS-PAGE and Western blotting using the HRP-coupled goat anti-myc antibody. (B) The relative surface expression level of the different constructs, treated or not with SR121463 (10 μ M, 18 hours), was determined by surface ELISA, as described in the methods section. (C) Relative AVP-induced cAMP production was determined using a BRET-based EPAC biosensor co-transfected with the indicated constructs. 24 hours after transfection, the cells (treated or not with 10 μ M SR121463 for 18 hours) were exposed or not to 10 μ M AVP for 15 minutes prior to BRET measurements. The BRET values obtained for the different conditions were subtracted from the BRET value obtained from cells transfected only with the biosensor to yield net BRET.

Shown values are the difference in net BRET values obtained for each receptor after stimulation from the net BRET observed for the same cells under unstimulated condition (basal net BRET) to yield delta BRET. The blots shown are representative of at least three experiments. The ELISA and cAMP measurements data are expressed as means \pm SEM (n = 3).

Figure 3: *Calnexin interaction with WT- and mutant V2Rs.*

(A) Total receptors from 48 hr transiently transfected HEK293T cells with the indicated constructs, treated or not for 18 hours with SR121463 (10 μ M), were immunoprecipitated using the myc (9E10) mouse anti-myc antibody, resolved on SDS-PAGE and probed by Western blotting using the HRP-coupled goat anti-myc (top panel) or with the rabbit anti-calnexin antibody (lower panel). The blots are representative of three independent experiments

Figure 4: *Cycloheximide chase of V2R/calnexin interaction.*

(A) HEK293 cells transiently expressing the WT-, W164S-, or Y128S-V2R for 24 hrs, treated or not with SR121463 (10 μ M, 18 hr) were exposed to the protein synthesis inhibitor cycloheximide for 0 to 3 hours before lysis and immunoprecipitation using the rabbit anti-calnexin antibody. The immunoprecipitates were resolved on SDS-PAGE and probed, by Western blotting using the HRP-coupled goat anti-myc to reveal calnexin-bound receptors. The immunoreactive bands were quantified by densitometry. Values are presented as a percentage of the calnexin-bound receptors obtained in the untreated wells (time 0). (B) The data were analyzed with the GraphPad Prism software using one phase decay equation to determine calnexin/receptor interaction half-life. (C) Cells were transfected with the Cnx-luc construct along with the indicated YFP-fused receptor construct and treated for the indicated time with SR121463 (10 μ M) prior to BRET measurements. The results are from three independent experiments.

Figure 1

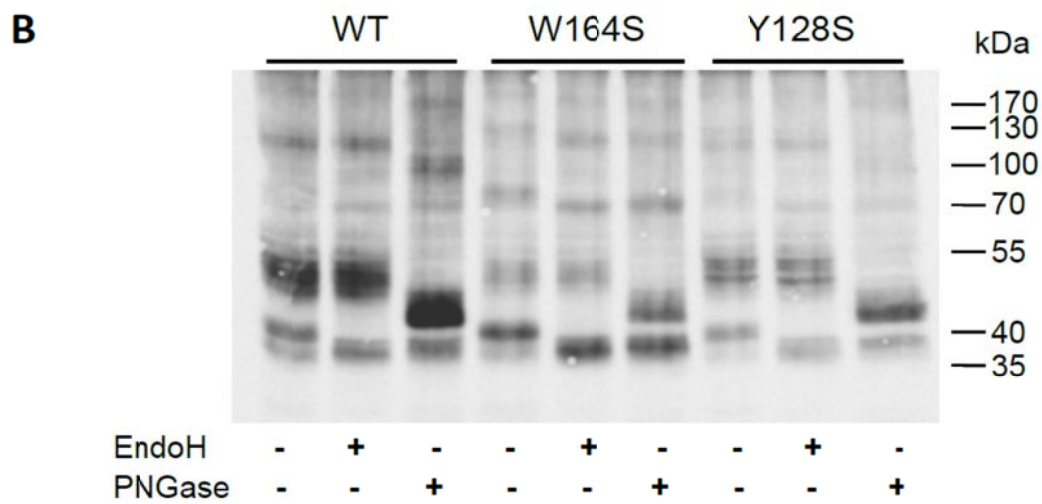
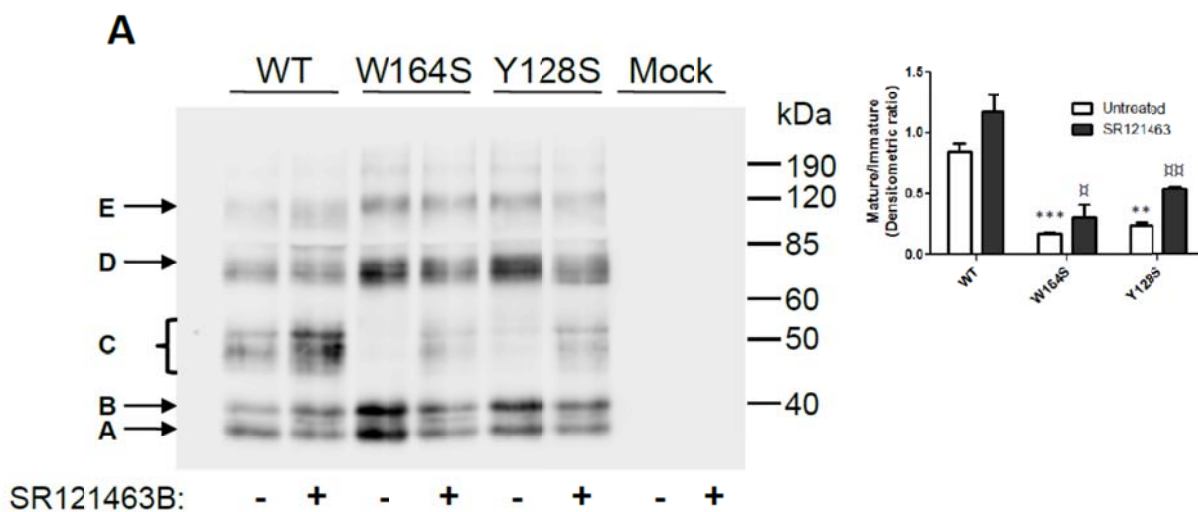


Figure 1

C

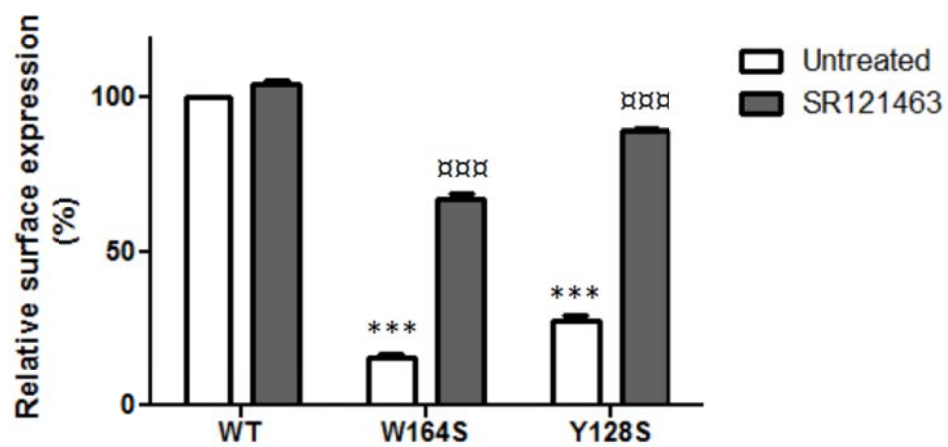
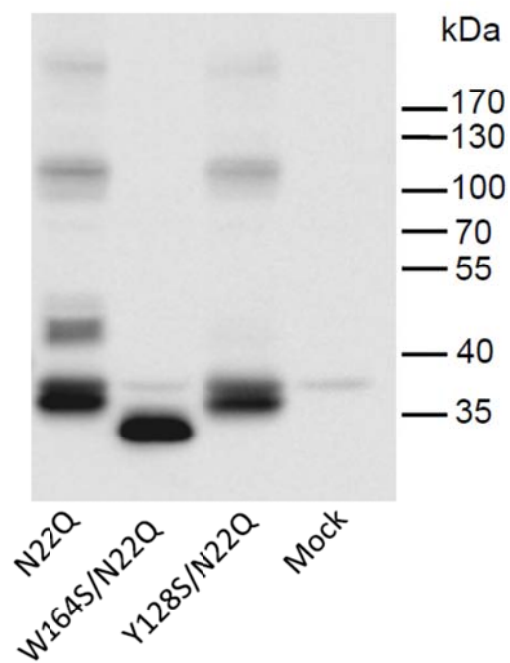


Figure 2

A



B

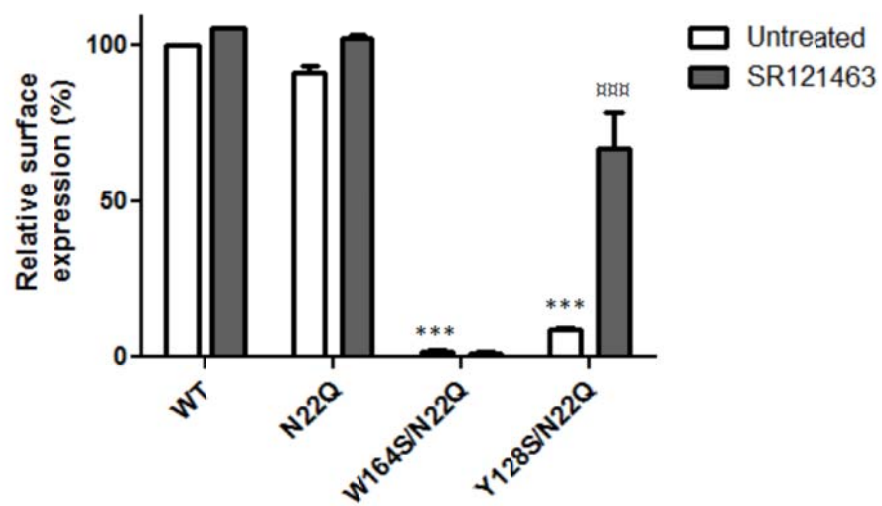


Figure 2

C

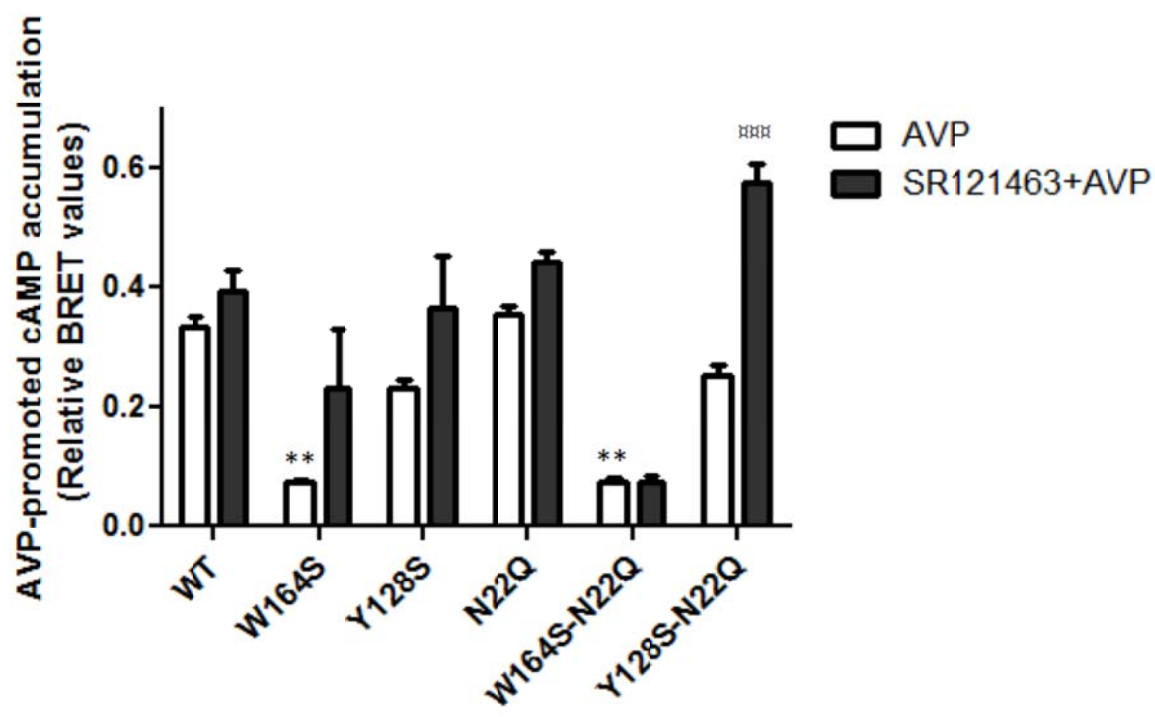


Figure 3

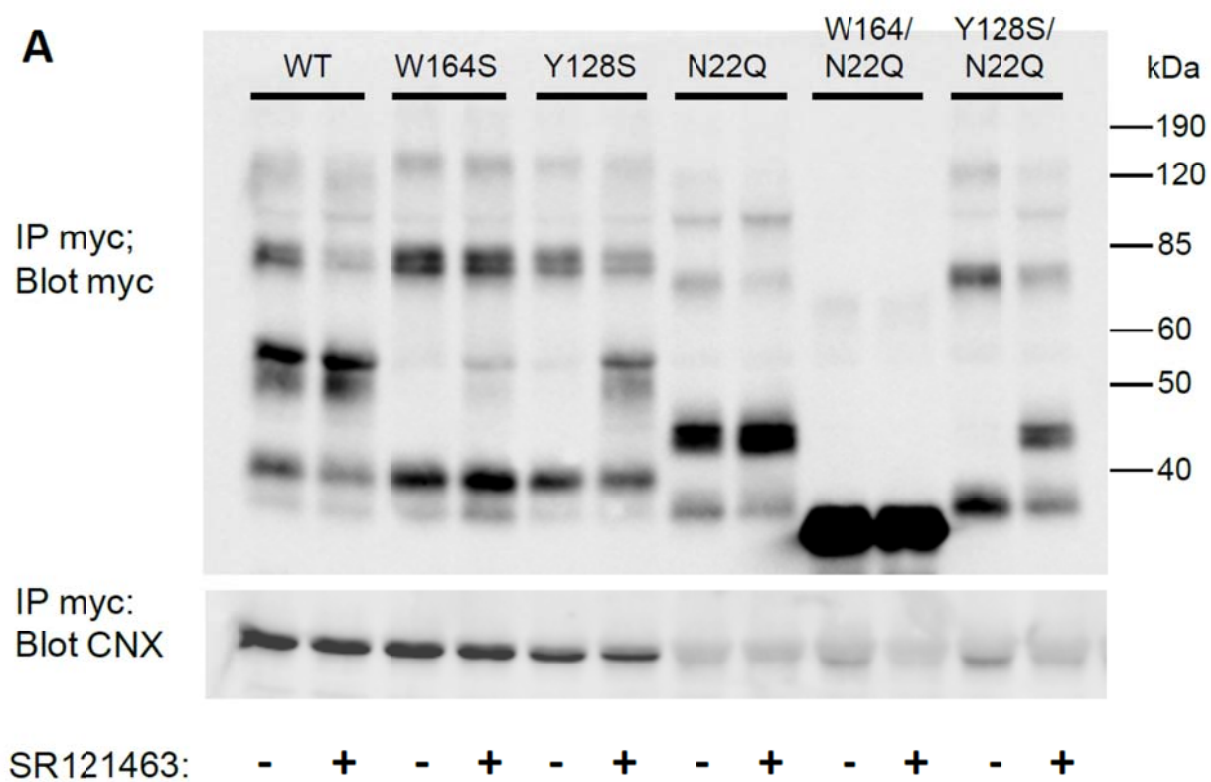
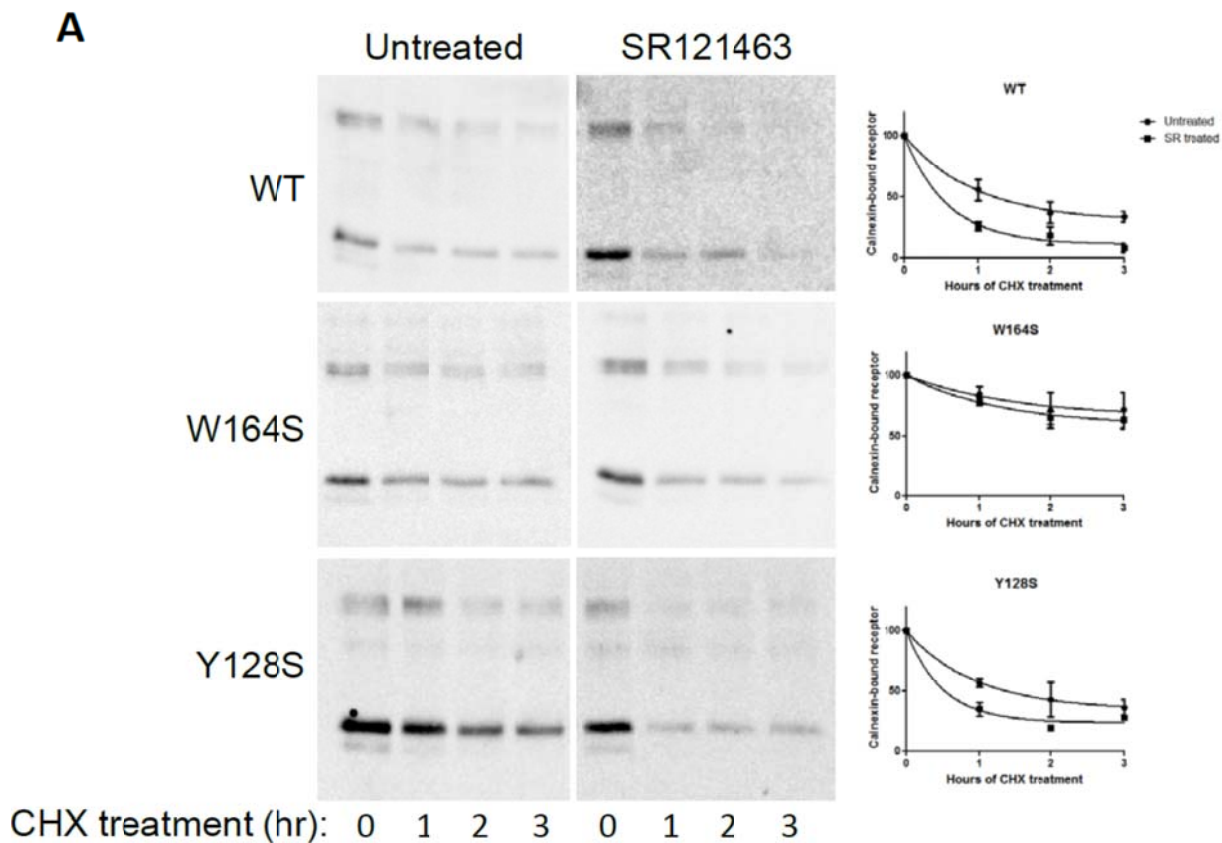


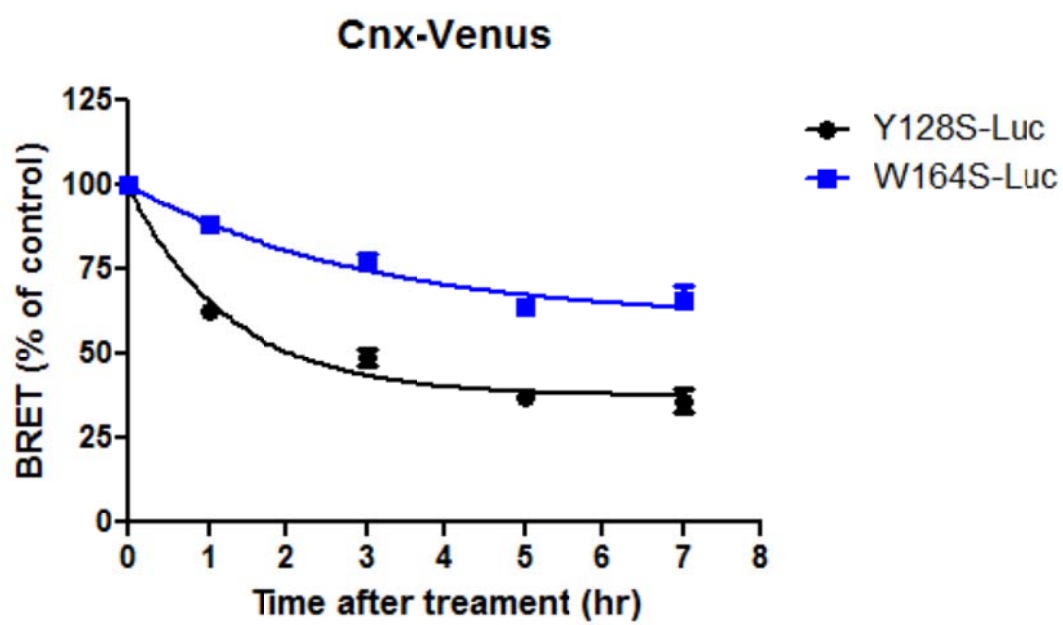
Figure 4

**B**

	Interaction half-life (hour)	
	Untreated	SR121463
WT	0.68 +/- 0.08	0.37 +/- 0.05 [‡]
W164S	1.00 +/- 0.12 [*]	0.89 +/- 0.11
Y128S	0.66 +/- 0.13	0.34 +/- 0.03 [‡]

Figure 4

C



DISCUSSION

De nombreuses pathologies résultent d'anomalies dans la structure et la conformation des protéines. Ces effets se traduisent aussi bien par les profonds changements structuraux constatés dans les maladies neurodégénératives (e.g. encéphalopathie spongiforme bovine, maladie d'Alzheimer), que par des modifications plus subtiles où les produits de gènes mutés ne sont pas adressés au bon endroit dans la cellule. Il y a une vingtaine d'années, et grâce aux avancées dans le domaine de la biologie moléculaire, certaines formes de *Diabetes Insipidus* ont été associées à des mutations dans le gène codant pour le récepteur de la vasopressine de type 2 (Rosenthal *et al.*, 1992). Ces mutations ont, pour la plupart, une incidence sur l'expression du récepteur à la surface cellulaire, mais aussi sur divers aspects de sa biologie, entravant ses fonctions antidiurétiques. Récemment, deux mutations occasionnant un phénotype de type 'gain de fonction' du récepteur ont été décrites, culminant à une inhibition de la diurèse et l'hyponatrémie (Feldman *et al.*, 2005). De par leur découverte récente, il n'y a que peu d'information disponible sur ces derniers mutants, ce qui retarde l'élaboration de thérapies adéquates.

Utilisant des techniques de pointe, nous avons effectué une caractérisation moléculaire détaillée de différentes mutations à occurrence naturelle du récepteur V2 afin de déterminer les conséquences fonctionnelles associées à la mutation et responsables des phénotypes observés en clinique et d'évaluer le potentiel thérapeutique des chaperons pharmacologiques sur ces dernières.

7.1 Variations phénotypiques chez des patients atteints de DINc et porteurs de la substitution V88M

Dans cette étude, nous nous sommes intéressés au cas d'une famille dont plusieurs membres sont atteints de polyurie/polydipsie. L'intérêt de cette étude vient du fait que les membres de cette famille ont des particularités phénotypiques hors du commun.

-Premièrement, le DINc est une maladie héréditaire liée au chromosome X et, dans la majeure partie des cas, les femmes porteuses d'un allèle muté n'ont pas ou peu de symptôme dû à la présence d'un deuxième allèle sain. Dans ce cas-ci, les données cliniques démontrent bien que plusieurs femmes de cette famille souffrent de polyurie aqueuse (volumes urinaires élevés en combinaison avec une osmolarité urinaire inférieure à celle du plasma) (voir tableau 2).

-Deuxièmement, la sévérité des symptômes varie selon les individus porteurs de la mutation, puisque les volumes et l'osmolarité urinaires sont parfois près des valeurs normales (eg. Individu III-7) tandis que certains souffrent de polyurie hypotonique (eg. individus II-4 et II-8).

- Le troisième point particulier chez les porteurs de cette mutation provient de la variabilité dans la réponse à un traitement au DDAVP (ou dans certains cas, de tannate de pitressine, un sel d'AVP). Ainsi, bien que la réponse fut partielle, une augmentation significative de l'osmolarité urinaire (>400 mOsm/L) a été observée chez quatre des six patients testés, tandis que les deux autres n'ont démontré qu'une modeste augmentation. Habituellement, une réponse au DDAVP indique un diabète insipide d'origine central (déficience en AVP) et non néphrogénique, comme initialement diagnostiqué pour l'individu II-8 (tableau 2).

Nos analyses génétiques ont permis de déterminer que ces individus étaient tous porteurs d'une mutation ponctuelle dans le gène *AVPR2* menant à la substitution de la valine en position 88 du récepteur V2 par une méthionine (V88M), démontrant que la cause du DINc chez cette famille est bien d'origine néphrologique.

Tableau II: Données cliniques des porteurs de la substitution V88M d'une même famille

Individu			Données urinaires (24 heures)				Osmolarité maximale	
ID	Sexe	Age (ans)	Volume (mL)	Sodium (mmol)	Osmolarité (mOsm/L)	Créatine (mmol/kg)	DDAVP	Déprivation hydrique
II-1	F	adulte	ND	ND	ND	ND	208*	111
II-4	F	34	3487	ND	231	0.1	450	413
II-8	F	54	3474	275	191	0.15	508	323
III-4	F	21	705	126	490	0.15	ND	ND
III-7	F	14	1770	113	482	0.14	ND	ND
III-13	F	29	1648	77	330	0.14	ND	ND
III-1	M	0.4	275	5	ND	0.07	366*	377
III-10	M	0.9	ND	ND	ND	ND	89	ND
IV-1	M	6	1542	35	189	0.11	570	ND

Données tirées de (Bockenbauer *et al.*, 2009). Seules les données des individus dont le DI a été diagnostiqué (historique de polyurie/polydipsie ou séquençage génétique) sont rapportées. *; Ces patients ont reçu une émulsion de tannate de Pitressine. ND; information non disponible

Dans la plupart des familles, la transmission du DINc est en phénomène récessif lié au chromosome X puisqu'associé au gène codant pour le récepteur V2, localisé sur ce chromosome. Les femmes porteuses sont généralement asymptomatiques ou que très légèrement affectées, dû à la présence d'un deuxième allèle, absent chez les hommes. Bien que plusieurs cas de DINc chez des femmes aient été rapportés dans la littérature, ils sont généralement associés à des mutations dans le gène autosomal, codant pour l'AQP2. Une étude réalisée en 1995 portant sur trois familles atteintes de DINc a démontré que certaines femmes exhibaient les symptômes classiques de la maladie et qu'elles étaient toutes porteuses de mutations dans le gène *AVPR2* (van Lieburg *et al.*, 1995). Les auteurs de cette étude ont émis l'hypothèse que ce phénomène pouvait être attribuable à une inactivation biaisée du chromosome X (*skewed X-inactivation*). L'inactivation d'un des chromosomes X chez la femme est un processus aléatoire et génère

normalement une mosaïque cellulaire exprimant le gène provenant de l'un ou l'autre des deux chromosomes (Migeon, 2008). Ainsi, on s'attend à ce que les femmes porteuses d'une mutation dans le gène *AVPR2* aient la moitié de leurs cellules exprimant l'allèle mutant et l'autre, l'allèle sain. Puisque les femmes porteuses sont généralement asymptomatiques, on peut conclure que la réabsorption d'eau au niveau des tubules collecteurs reste un phénomène efficace malgré une perte de fonction chez 50% des cellules principales du tubule collecteur. Ainsi, une inactivation biaisée favorisant l'expression de l'allèle mutant pourrait faire diminuer la proportion de cellules aptes à participer à la réabsorption du filtrat rénal et atteindre un seuil pathologique. L'hypothèse de l'inactivation biaisée du chromosome X a été subséquentement validée chez deux femmes non-apparentées atteintes de DINc. En effet, des analyses génétiques à partir de cellules de sang périphérique ont démontré une corrélation entre la sévérité des symptômes clinique et le degré d'inactivation biaisée (proportion d'inactivation de l'allèle sain) chez ces individus (Nomura *et al.*, 1997).

Dans le cas qui nous intéresse, des tests génétiques sur des leucocytes n'ont pas permis de mettre en évidence une inactivation biaisée du chromosome X chez une patiente atteinte, ni chez deux patientes porteuses et asymptomatiques. Néanmoins, l'état de mosaïcité d'un tissu donné ne reflète pas nécessairement celui d'un autre tissu puisque l'apparition de l'inactivation du chromosome X est associée aux événements de différenciation cellulaire associés avec la genèse des différents tissus (Monk et Harper, 1979; Tan *et al.*, 1993) et donc, on ne peut exclure la possibilité d'inactivation biaisée du chromosome X au niveau des tissus rénaux chez ces individus. Seule une analyse génétique de cellules issues d'une biopsie rénale permettrait de répondre à cette question.

Un taux d'inactivation biaisée du chromosome X variable pourrait expliquer l'hétérogénéité phénotypique observée chez les individus féminins de cette famille puisque, comme mentionné précédemment, une corrélation existe entre la gravité des symptômes clinique et le degré de biais dans le processus d'inactivation du chromosome X. Les habitudes alimentaires pourraient aussi expliquer certaines variations phénotypiques. L'exemple le plus frappant est celui des individus II-8 et III-13 (mère et fille) dont les volumes urinaires quotidiens mesuré étaient 3,5 et 1,6 litres, respectivement. Bien que leur osmolarité urinaire soit similaire

(275 vs 330 mOsm/kg), la mère sécrète 191 mmoles de sodium, l'équivalent de 10,7g de sel de table tandis que la fille en sécrète environ 2,5 fois moins, soit 77 mmoles quotidiennement. Ainsi, une forte consommation de sel augmente le volume urinaire obligatoire et pourrait expliquer la différence de volume urinaire quotidien entre ces individus. D'autres facteurs environnementaux influençant la diurèse pourraient aussi s'ajouter, les analyses cliniques n'ayant pas été conduites dans un cadre expérimental rigoureusement contrôlé.

La variabilité inter-individus dans les réponses suite à l'administration de DDAVP ou de tanate de pitressine est, a priori, plus difficile à expliquer. Le fait qu'une réponse au traitement a été obtenue suggère que le récepteur mutant, bien que compromis, est toujours apte à induire une diminution de la diurèse, du moins, chez certains individus. De plus, le phénotype partiel caractérisant plusieurs des individus de cette famille va dans le même sens. Enfin, une réponse au DDAVP suggère normalement un diabète insipide d'origine centrale (déficience en AVP) et non néphrogénique, comme initialement diagnostiqué pour l'individu II-8. Afin de mieux comprendre l'ensemble de ces phénomènes, une caractérisation biochimique du récepteur mutant a été réalisée.

La substitution V88M avait déjà été rapportée dans la littérature (Pan *et al.*, 1992; Bichet *et al.*, 1994) et avait été soumise à une caractérisation sommaire dont la conclusion était que le récepteur était non-fonctionnel, basé sur l'absence d'immunomarquage de surface et de liaison de radioligand ($[^3\text{H}]\text{AVP}$) sur des cellules COS-7 exprimant le récepteur mutant (Ala *et al.*, 1998). Ces résultats sont difficilement conciliables avec les particularités phénotypiques décrits dans notre étude, qui suggèrent une activité partielle du récepteur. En fait, nos résultats ont fait ressortir deux défauts fonctionnels associés à la substitution V88M. Le premier est une expression de surface grandement atténuée, soit seulement 20% de celle du récepteur sauvage. Le deuxième défaut se situe au niveau de l'affinité du ligand pour le récepteur; la constante de dissociation (Kd) mesurée indique une perte d'affinité significative pour l'AVP, étant d'environ 500 nM pour le récepteur mutant, comparativement à ~ 7 nM pour le récepteur sauvage. Cette perte d'affinité se traduit par une perte de puissance de l'AVP sur la production d'AMPC par le récepteur. En effet, l' EC_{50} (*half maximal effective concentration*) mesurée pour le récepteur mutant est d'environ 150 fois plus élevée que pour le récepteur sauvage, soit 248 ± 45 nM

comparativement à $1,5 \pm 0,16$ nM, respectivement. Ces deux défauts fonctionnels permettent aujourd'hui de mieux comprendre les résultats de non-fonctionnalité obtenus lors de la précédente caractérisation du récepteur V88M. Ainsi, la faible expression de surface n'aura pas permis d'obtenir un immunomarquage de surface significatif tandis que la concentration maximale d'AVP tritiés normalement utilisée lors d'essais de liaison (40 nM) avec le récepteur sauvage est insuffisante pour obtenir un radio-marquage du récepteur mutant.

Une modélisation moléculaire a permis de prédire le site de liaison de l'AVP dans une cavité formée par les TM 3-7 du récepteur V2 (Czaplewski *et al.*, 1998). La valine en position 88 du récepteur V2 se situe au niveau du 2^{ème} tronçon transmembranaire, ce qui laisse à penser qu'elle ne participe pas directement aux interactions ligand-récepteur. La perte d'affinité du récepteur V88M pour l'AVP pourrait donc être causée par l'influence de la substitution sur la conformation ou la position relative des autres tronçons trans-membranaires du récepteur.

Se basant sur les données générées lors de notre étude, nous avons suggéré que l'origine des différences phénotypiques observées chez cette famille pourrait résulter d'une combinaison des deux défauts fonctionnels répertoriés. Ainsi, bien que non documenté, l'efficacité de maturation du récepteur mutant pourrait être variable d'un individu à l'autre, ayant un impact sur les niveaux d'expression du récepteur à la surface des cellules principales du tubule collecteur. De plus, la faible affinité du ligand pour le récepteur mutant implique que les niveaux d'AVP circulants doivent être élevés afin d'induire une réponse, ce qui conférerait un avantage aux individus dont les concentrations plasmatiques d'AVP atteignent les niveaux les plus élevés.

Nos résultats ont démontré que le récepteur mutant V88M était très peu exprimé à la surface cellulaire comparativement au récepteur sauvage, ce qui nous a mené à tester l'effet d'un chaperon pharmacologique, le SR121463 (ou satavaptan) sur la maturation du récepteur mutant afin d'évaluer son potentiel comme outil thérapeutique pour les patients porteurs de cette mutation. Le traitement a permis d'augmenter de 3,5 fois l'expression de surface du récepteur mutant, atteignant environ 70% du niveau d'expression de surface du récepteur sauvage. Malgré l'augmentation significative de l'expression de surface du récepteur mutant, le traitement n'a pas

amélioré sa capacité signalétique. En fait, il a occasionné une perte de puissance, soit un déplacement vers la droite de la courbe dose-réponse (production d'AMPc en fonction de la concentration d'AVP). Cette perte de puissance est fort probablement attribuable à la présence résiduelle du chaperon au site de liaison de l'AVP du récepteur. Bien qu'une perte de puissance soit aussi observée pour le récepteur sauvage après traitement, la basse affinité du récepteur mutant pour l'AVP sans traitement, additionnée à la perte de puissance post-traitement rend improbable une récupération de fonction par le SR121463 chez ces patients : Une concentration de 10 μ M d'AVP a été nécessaire afin de détecter une production d'AMPc après traitement, et les niveaux physiologiques normaux d'AVP sont de l'ordre du nanomolaire. Puisque le récepteur mutant conserve une fonctionnalité partielle, malgré sa perte d'affinité pour l'AVP et sa faible expression de surface, il serait plus approprié de traiter ces patients à l'aide de DDAVP, du moins chez les individus réceptifs à ce traitement. Une étude a démontré que la concentration plasmatique de DDAVP pouvait atteindre jusqu'à 47 nM suite à une seule administration de 100 μ g par voie orale, soit environ 25 fois plus élevé que les concentrations plasmatiques normales d'AVP (Fukuda *et al.*, 2003). A cette concentration, et considérant le K_d de 500 nM pour le récepteur mutant, on pourrait estimer, à l'aide de l'équation de Cheng-Prusoff, une occupation par le ligand d'environ 8,6% des récepteurs à la surface cellulaire. Puisque certains patients de cette étude ont répondu à un traitement au DDAVP, ce niveau d'occupation du récepteur V88M pourrait être suffisant pour induire une réponse antidiurétique significative.

En résumé, la substitution V88M affecte grandement la maturation du récepteur V2 et les récepteurs qui atteignent la surface cellulaire ont une faible affinité pour l'AVP. Comme mentionné dans l'introduction, les mutations affectant le récepteur V2 sont normalement répertoriées en trois groupes, selon l'impact de la mutation sur la biologie du récepteur (Fujiwara et Bichet, 2005). La substitution V88M peut être classée autant dans la classe A (effet sur la liaison avec le ligand) que B (maturation compromise), ce qui contraste avec les mutations usuellement rapportées dans la littérature où la plupart affecte le récepteur à un seul niveau. Cette particularité se reflète par des manifestations cliniques atypiques soulevées dans notre étude. De plus, nos résultats suggèrent qu'il ne serait pas avantageux d'utiliser un chaperon pharmacologique pour promouvoir la maturation d'un récepteur mutant dont l'affinité pour son

ligand naturel est affectée car le traitement amplifie la perte de puissance du ligand, et ce phénomène est fort probablement attribuable à la présence résiduelle du chaperon au site de liaison de l'AVP du récepteur.

7.2 Conséquences fonctionnelles de substitutions de l'arginine 137 du récepteur V2

La première étude à faire référence à une mutation occasionnant une substitution de l'arginine 137 du récepteur V2 parut en 1993 et découverte chez une famille québécoise atteinte de DINc (Bichet *et al.*, 1993). La mutation décrite était une substitution de la guanine 481 en adénosine, menant à la substitution de l'arginine 137 en une histidine (R137H). Des études fonctionnelles ont par la suite démontré que le récepteur mutant, bien qu'apte à lier l'AVP avec la même affinité que le récepteur sauvage, n'était pas capable d'activer l'adénylate cyclase et d'induire la production d'AMPC, ce qui a été initialement interprété comme un défaut de couplage avec les protéines G ou un problème au niveau de leur engagement fonctionnel (Rosenthal *et al.*, 1993; Rosenthal *et al.*, 1994). Malgré son incapacité à induire la production d'AMPC suite à une stimulation à l'AVP, il a été démontré que le récepteur R137H était tout de même phosphorylé et internalisé suite à l'ajout d'agoniste (Innamorati *et al.*, 1997). En fait, une étude plus récente a révélé que ce récepteur mutant était phosphorylé et internalisé même en absence d'agoniste (Barak *et al.*, 2001). L'internalisation indépendante d'agoniste a été associée à un recrutement constitutif de la β -arrestine au récepteur mutant. Pour faire la preuve que ces mécanismes étaient responsables de la perte de signalisation du récepteur, les auteurs de cette étude ont muté un groupe de trois sérines au niveau de la queue C-terminale du récepteur mutant, sérines qui ont été préalablement identifiées comme cibles de phosphorylation et impliquées dans la liaison de haute affinité entre le récepteur V2 et la β -arrestine (Oakley *et al.*, 1999), et ce faisant, ils ont été en mesure d'augmenter l'expression de surface et d'induire une production d'AMPC induite par l'AVP, suggérant que le défaut fonctionnel du mutant R137H n'est pas un défaut de couplage ou d'activation des protéines G mais plutôt une désensibilisation constitutive

accrue. Ces résultats ont été validés par Bernier et collègues (Bernier *et al.*, 2004) qui ont clairement démontré l'association agoniste-indépendante de la β -arrestine avec le récepteur R137H par la technique de BRET (*bioluminescence resonance energy transfer*). Dans cette même étude, les auteurs ont montré une augmentation, bien que modeste, de la capacité signalétique du récepteur R137H suite à un traitement au chaperon pharmacologique et que cet effet était attribuable à une augmentation de la maturation du récepteur et non à sa stabilisation à la surface cellulaire. Ce résultat suggère que le nombre réduit de récepteurs à la surface cellulaire causé par sa désensibilisation et son internalisation constitutifs élevés est exacerbée par une maturation compromise, expliquant la perte de fonction. L'effet bénéfique du traitement au chaperon pharmacologique sur le mutant R137H a été reproduit *in-vivo* chez des individus porteurs de cette mutation enrôlés dans la seule étude clinique, à ce jour, visant à valider l'utilisation des chaperons pharmacologiques pour le traitement du DINC (Bernier *et al.*, 2006).

Récemment, de nouvelles mutations occasionnant des substitutions de l'arginine 137 pour une cystéine ou une leucine (R137C et R137L), ont été rapportées (Feldman *et al.*, 2005). Ces mutations ont été détectées chez deux jeunes garçons non apparentés souffrant d'hyponatrémie sévère. Ces patients ont un faible volume urinaire anormalement concentré, occasionnant une hyponatrémie, une hypo-osmolarité sanguine et une natriurèse élevée et ce, malgré des niveaux plasmatiques d'AVP indétectables, éliminant le diagnostic du syndrome de la sécrétion inappropriée de l'hormone antidiurétique (SIADH), cause fréquente d'hyponatrémie. Une caractérisation sommaire des récepteurs mutants a permis de mettre en évidence une activité basale élevée, ce qui expliquait le phénotype 'gain de fonction' observé chez les patients porteurs de ces substitutions. Puisque l'étiologie de l'hyponatrémie observée n'avait jamais été décrite à ce jour, les auteurs ont nommé cette nouvelle affliction 'syndrome néphrogénique de l'anti-diurèse inappropriée (NSIAD; *nephrogenic syndrome of inappropriate antidiuresis*). Une étude réalisée en 2009 a montré que, comme observé pour le récepteur mutant R137H, les récepteurs R137C et R137L recrutait la β -arrestine de façon constitutive et étaient internalisés (Kocan *et al.*, 2009). Ce résultat est paradoxal, considérant le fait que le recrutement de la β -arrestine au récepteur est un événement connu pour découpler le récepteur des protéines G et donc d'interrompre la signalisation dépendante des protéines G.

Nos expériences ont permis de confirmer l'activité constitutive élevée des récepteurs R137C et R137L comparativement aux récepteurs R137H et sauvage. En effet, les niveaux de base d'AMPC des cellules exprimant les récepteurs mutants R137C et R137L étaient significativement plus élevés que chez les cellules exprimant les récepteurs WT ou R137H. De plus, l'endocytose constitutive des trois récepteurs mutants est évidente en microscopie, puisque le cytoplasme des cellules exprimant les récepteurs mutants est ponctué suite à la révélation des récepteurs par un anticorps conjugué à un fluorophore, suggérant la présence de ces récepteurs dans des vésicules d'endocytose. En contre partie, le marquage s'est avéré uniforme et bien démarqué à la membrane plasmique chez les cellules exprimant le récepteur sauvage. Nous avons aussi démontré par BRET que la simple expression des trois récepteurs mutants entraînait une forte augmentation de l'interaction entre β -arrestine et la protéine adaptatrice AP-2, signe d'endocytose accrue via les puits de clathrine (Hamdan *et al.*, 2007).

Notre étude a fait ressortir plusieurs autres particularités partagées par les trois récepteurs mutants. Nous avons d'abord observé une diminution équivalente de l'expression de surface des trois mutants, comparativement au récepteur sauvage (~40%). La co-expression d'un dominant négatif de la dynamine, reconnu pour entraver les mécanismes d'endocytose en empêchant la dissociation des vésicules endocytiques de la membrane plasmique, a permis d'augmenter significativement l'expression des trois récepteurs mutants à la surface cellulaire. De plus, une augmentation flagrante de la forme mature, observée par immunobuvardage, de ces récepteurs mutants a été obtenue suite à un traitement avec le chaperon pharmacologique SR121463. Nos résultats suggèrent donc que les niveaux d'expression de surface réduits des récepteurs mutants sont dus à une combinaison de deux facteurs, soit d'une endocytose constitutive élevée et d'une maturation compromise. Ces résultats contrastent tout de même avec ceux rapportés dans une étude précédente. En effet, l'équipe du Dr Pflieger a estimé que l'expression de surface des récepteurs R137C et R137L était plus élevée que celle du R137H, et ont suggéré que la maturation des récepteurs R137C/L n'étaient pas compromise (Kocan *et al.*, 2009). Cette affirmation a été basée sur des résultats de microscopie confocale, en tentant d'évaluer les niveaux d'intensité de fluorescence retrouvés à la membrane plasmique suite à l'expression transitoire des récepteurs fusionnés à une protéine fluorescente, une estimation plutôt qualitative.

Nous considérons que la technique employée dans notre étude (méthode ELISA) permet une meilleure appréciation des niveaux relatifs d'expression de surface. Le fait que l'expression de surface n'ait été augmentée que partiellement comparativement au récepteur sauvage lors de l'inhibition de l'endocytose par la surexpression du dominant négatif de la dynamine est un autre élément en faveur du fait que l'endocytose constitutive élevée n'est pas la seule responsable de la diminution de l'expression de surface des récepteurs mutants R137C/L. Dans le cas du récepteur R137H, la réduction de l'expression de surface est la cause directe de la perte de fonction du récepteur. Par contre, pour les récepteurs R137C et R137L reconnus pour générer un phénotype de type gain de fonction, une expression de surface compromise peut paraître paradoxale puisqu'elle devrait diminuer le nombre de récepteurs actifs à la surface cellulaire. On pourrait donc conclure que la quantité résiduelle de récepteurs corticaux observée pour les mutants constitutivement actifs R137C/L est suffisante pour inhiber significativement la diurèse et mener au NSIAD. Il est donc possible de penser que les deux défauts fonctionnels répertoriés (endocytose constitutive et maturation compromise) contribuent à atténuer la sévérité des manifestations cliniques chez les patients porteurs de ces mutations.

Nous avons testé la réponse à l'agoniste des récepteurs à l'étude. Suite à une stimulation à l'AVP, une nette augmentation du contenu intracellulaire en AMPc a été obtenue avec le récepteur sauvage mais aucune augmentation, au-delà du niveau basal, a été obtenue pour les trois récepteurs mutants. Ce résultat a été validé pour le mutant R137L par un essai fonctionnel visant à induire une dépolarisation membranaire chez des oocytes exprimant le canal potassique GIRK (*G protein-activated inward rectifying K channel*) suite à une stimulation à l'AVP, un phénomène requérant l'activation de la sous-unité $G\alpha_s$ (Lim *et al.*, 1995). Pour le mutant R137H, ce résultat est cohérent avec les données précédentes et le phénotype DINc associé à la mutation. Pour les mutants R137C/L, ces résultats pourraient suggérer que les récepteurs sont déjà dans une conformation active complète et que la liaison d'AVP ne change pas cet état. Une autre hypothèse serait que la liaison de l'AVP n'induit pas de changement conformationnel au sein de ces récepteurs, dû à une 'rigidité' induite par ces substitutions.

Malgré le fait que nous n'avons pu détecter une activation agoniste-dépendante de la voie $G\alpha_s$ pour les récepteurs mutants étudiés, nous avons tout de même observé une diminution de la

quantité de tout les récepteurs à la surface cellulaire suite à l'ajout d'AVP, suggérant une endocytose induite par l'agoniste, un phénomène confirmé par les expériences BRET mesurant l'interaction entre la β -arrestine et AP-2, et par microscopie. De plus, nous avons déterminé que les valeurs d' EC_{50} pour le recrutement de la β -arrestine aux différents récepteurs (sauvage et mutants) suite à une stimulation à l'AVP étaient égales, soit de l'ordre du nanomolaire, une valeur identique à la constante d'affinité de l'AVP pour le récepteur V2 (Tahara *et al.*, 1998). Considérés collectivement, ces résultats démontrent que tous les récepteurs mutants lient l'AVP et que cet événement induit une endocytose accrue, via une hausse du recrutement de la β -arrestine, sans induire une production de second messenger supérieure au niveau de base. En considérant l'hypothèse émise au paragraphe précédent, stipulant que les récepteurs R137C/L pourraient être dans une conformation active complète pour la voie $G\alpha_s$, ces nouveaux éléments suggèrent que la conformation requise pour le recrutement de la β -arrestine n'est pas optimale pour ces récepteurs sans stimulation. Dans un contexte fondamental, cette observation appuie la notion que les déterminants structuraux responsables de l'activation des protéines G sont différents de ceux responsables du recrutement de la machinerie d'endocytose (Azzi *et al.*, 2003; Galandrin *et al.*, 2007; Violin et Lefkowitz, 2007). Cette notion est bien illustrée par le concept émergent d'agonisme biaisé, où des ligands sont aptes à stabiliser différents états conformationnels, ayant des conséquences fonctionnelles spécifiques. La découverte très récente d'agonistes biaisés du récepteur V2 (MCF14, MCF18, MCF57), provoquant l'activation de la protéine $G\alpha_s$ sans entraîner l'internalisation du récepteur, grâce à leur propriété antagoniste vis-à-vis du recrutement des β -arrestines (Jean-Alphonse *et al.*, 2009) illustre bien ce concept.

La stimulation des trois récepteurs mutants à l'AVP n'a pas non plus eu d'effet sur l'activation des ERK1/2, contrairement au récepteur sauvage, et les niveaux de phosphorylation de base n'étaient pas non plus différents de ce dernier. Le mécanisme proposé de l'activation de la voie des MAPK par le V2 serait indépendant des protéines G mais totalement dépendant de la β -arrestine (Charest *et al.*, 2007). Bien que l'ensemble de la cascade signalétique ne soit pas connu, elle impliquerait l'activation de c-Src (*cellular sarcoma tyrosine kinase*) par le V2, suivi de l'activation d'une métalloprotéinase, le clivage d'un pro-ligand à la surface cellulaire qui, à son tour, activerait un RTK (*receptor tyrosine kinase*), probablement l'IGFR (*insuline-like*

growth factor receptor), et le recrutement de la β -arrestine à ce dernier (Charest *et al.*, 2007) (G. Oigny-Longpré, données non-publiées). Bien que la β -arrestine soit une composante essentielle dans l'activation de la voie MAPK par le récepteur V2, c'est son recrutement au RTK qui serait responsable l'activation de la voie, ce qui pourrait expliquer l'absence de cette réponse, malgré un recrutement spontané de la β -arrestine aux récepteurs mutants. De plus, l'activation de PKA par le récepteur aurait un effet inhibiteur sur ce processus (Charest *et al.*, 2007) et ainsi, la balance signalétique entre les voies activatrices (β -arrestine) et inhibitrice (protéine $G\alpha_s$) déterminerait le niveau d'activation de la voie MAPK par le récepteur V2. L'incapacité des récepteurs V2 mutants R137C/L à promouvoir l'activation de la voie MAPK suggère aussi que ce mécanisme est indépendant de l'activation de la protéine $G\alpha_s$ et que l'activation directe ou indirecte de c-Src par le récepteur V2 requiert des déterminants conformationnels différents de ceux impliqués dans l'activation de $G\alpha_s$ et du recrutement de la β -arrestine au récepteur. Une autre hypothèse permettant d'expliquer l'incapacité des récepteurs mutants R137C/L à promouvoir l'activation des MAPK serait une désensibilisation de cette voie, due à une stimulation continue causée par l'activité constitutive des récepteurs. Pour répondre à cette question, il aurait fallu stimuler les cellules exprimant les récepteurs R137C/L avec un activateur de la voie MAPK, tel le PMA (phorbol 12-myristate 13-acetate) ou avec du sérum afin de déterminer si la voie est toujours activable.

Considérés globalement, ces résultats font ressortir la grande similarité des défauts fonctionnels partagés par les trois récepteurs mutants et suggèrent que l'issue clinique engendrée par les différentes substitutions affectant l'arginine 137 du récepteur V2 n'est attribuable qu'à un seul facteur, soit l'activation spontanée (ou non) de la protéine $G\alpha_s$. Le motif le plus important pour l'activation des RCPGs de la famille R est le verrou ionique dont l'arginine 137 du récepteur V2 est l'élément central. Chez la rhodopsine sous forme inactive, il a été démontré que cette arginine est en interaction avec l'aspartate adjacente (faisant aussi partie du motif E/DRY/H) et un glutamate retrouvé à l'extrémité cytoplasmique du TM6. Il a aussi été démontré pour le récepteur β 2-adrénergique que les mutations affectant les interactions électrostatiques entre l'arginine 131, l'aspartate 130 et le glutamate 268 (situé à la base du TM6) favorisaient une augmentation de la distance entre les TMs 3 et 6, ce qui avait pour conséquence une

augmentation de l'activité constitutive du récepteur (voir Audet et Bouvier, 2008). Il est donc peu surprenant que les mutations affectant directement l'arginine 137 du récepteur V2 (équivalente à l'arginine 131 du récepteur β 2-adrénérique) aient des conséquences sur l'activité constitutive du récepteur. Le fait que le mutant R137H ne soit pas un mutant constitutivement actif suggère que la conservation de la charge, l'arginine et l'histidine étant toutes deux chargés positivement à pH physiologique, serait suffisant pour maintenir le verrou ionique 'fermé' en absence de ligand.

Dans un contexte thérapeutique, nous avons évalué la possibilité d'inhiber l'activité constitutive des récepteurs R137C et R137L à l'aide d'un agoniste inverse spécifique, le SR121463 ou satavaptanTM, aussi utilisé comme chaperon pharmacologique. En effet, le SR121463 s'est avéré efficace pour inhiber l'activité constitutive élevée du récepteur V2 mutant D136A créé en laboratoire (Morin *et al.*, 1998). Nos résultats ont montré que l'activité constitutive des mutants R137C/L n'était pas affectée par un traitement aigu (30 minutes) au SR121463, suggérant que les changements structuraux induits par les 2 substitutions et menant à l'activation de la protéine G α s ne peuvent être renversés par l'agoniste inverse SR121463. Ce résultat est en accord avec les données cliniques d'une étude réalisée sur des patients atteints de NSIAD (Decaux *et al.*, 2007) puisqu'aucun changement de l'osmolarité et du volume urinaire n'a pu être obtenu suite à l'administration de SR121463 ou OPC-41061 (tolvaptanTM) chez un patient porteur de la substitution R137C. Ce résultat suggère aussi que la disruption du verrou ionique, lors d'une substitution de l'arginine 137 par un acide aminé non chargé positivement serait la cause de l'activation spontanée des mutants R137C et R137L car même si un agoniste inverse favorise une conformation inactive, il ne peut rétablir les liens électrostatiques perdus lors de la substitution d'un acide aminé chargé contre un autre qui ne l'est pas.

Contre toute attente, un traitement chronique (16 heures) au SR121463 des cellules exprimant les récepteurs mutants R137C/L a eu pour effet d'augmenter significativement leur niveau d'AMPC de base. Puisque nous avons constaté une augmentation du nombre de récepteurs à la surface cellulaire suite à un traitement au SR121463, attribuable à ses propriétés de chaperon pharmacologique, ceci suggérerait que les niveaux de base d'AMPC étaient

directement reliés à la quantité de récepteurs à la surface cellulaire. Pour appuyer cette hypothèse, une augmentation du niveau d'AMPC de base a aussi été obtenue lorsque le mutant dominant négatif de la dynamine a été co-exprimé avec les récepteurs R137C et R137L, qui a pour effet d'augmenter l'expression de surface des récepteurs en inhibant le processus d'internalisation. De plus, un effet additif d'augmentation du niveau de base d'AMPC a été observé lorsque les cellules exprimant les récepteurs mutants constitutivement actifs et le dominant négatif de la dynamine ont été traitées avec le SR121463 sur 16 heures. Ces résultats suggèrent que l'utilisation du SR121463 pour le traitement des patients atteints de NSIAD et porteurs de l'une ou l'autre de ces substitutions pourrait théoriquement empirer les symptômes cliniques. Néanmoins, il est possible d'envisager la découverte éventuelle de ligands spécifiques au récepteur V2 possédant des propriétés agoniste inverse envers les récepteurs R137C et R137L et idéalement dépourvus de propriété chaperon. L'utilisation de ces formes mutantes de récepteurs lors de criblages à haut débit pourrait permettre d'identifier de telles molécules.

Comme mentionné précédemment, le défaut de maturation des récepteurs R137C et R137L observé dans notre étude ainsi que l'endocytose constitutive anormalement élevée pourraient finalement contribuer à atténuer la gravité des symptômes cliniques chez les patients porteurs de ces substitutions puisque nos résultats suggèrent une corrélation positive entre la quantité de récepteurs R137C/L à la surface cellulaire et les niveaux de base d'AMPC. Ainsi, une stratégie visant à diminuer l'expression de surface de ces récepteurs mutants pourrait s'avérer efficace. Dans ce sens, nous avons suggéré l'utilisation d'AVP ou autres agonistes spécifiques au récepteur V2 dans le traitement des patients atteints de NSIAD puisque le seul effet observé de l'AVP sur les deux récepteurs mutants fut une endocytose accrue menant à une diminution du nombre de récepteurs à la surface cellulaire sans affecter la production d'AMPC ni l'activation des ERK1/2. Cette stratégie, a priori paradoxale (augmenter la diurèse par l'hormone antidiurétique), doit d'abord être validée à l'aide d'un modèle cellulaire se rapprochant de la physiologie rénale. En effet, une étude parue en même temps que la nôtre fait état d'une modeste réponse en AMPC des récepteurs R137C/L suite à une stimulation à l'AVP et d'une légère diminution du niveau d'activité de base de ces derniers suite à un traitement au SR121463 (Tenenbaum *et al.*, 2009). Leur étude a été réalisée avec des cellules COS-7 tandis que nous avons utilisé des cellules HEK293T, suggérant que la réponse aux ligands des récepteurs R137C/L peut différer d'un type cellulaire à l'autre. Jusqu'à ce que la preuve de concept soit

faite par une étude pilote, il sera plus avisé d'utiliser des méthodes plus conventionnelles, telle l'administration d'urée *per os*, pour le traitement des patients atteints de NSIAD et porteurs des substitutions R137C et R137L.

7.3 Nouvelle mutation dans le gène *AVPR2* causant le NSIAD

Ce n'est qu'en 1988 que des mutations dans le gène *AVPR2* ont été attribuées à des formes de DIN et depuis ce jour, au-delà de 200 mutations distinctes ont été rapportées chez plus de 250 familles non apparentées (Conn *et al.*, 2007; Bichet, 2008; Spanakis *et al.*, 2008). En comparaison, 5 ans après le rapport initial sur le NSIAD, 25 cas ont été rapportés dans la littérature, tous étant associés à des mutations occasionnant la substitution de l'arginine 137 pour une leucine ou une cystéine (Ranchin *et al.*, ; Feldman *et al.*, 2005; Bes *et al.*, 2007; Decaux *et al.*, 2007; Marcialis *et al.*, 2008; Soule *et al.*, 2008; Cho *et al.*, 2009; Gupta *et al.*, 2009; Ranchin *et al.*, 2010). Dans l'article intitulé 'A novel NSIAD-causing mutation leads to a constitutive activation of the vasopressin type 2 receptor that can be inhibited by inverse agonists', nous rapportons, pour la première fois depuis sa découverte, une nouvelle mutation occasionnant le NSIAD qui n'implique pas l'arginine 137 ou un autre acide aminé composant le motif E/DRY/H du récepteur V2.

Le jeune patient dont il est question dans cette étude a été admis à l'hôpital suite à une épisode d'apnée, probablement reliée à une infection des voies respiratoires (bronchiolite). Des analyses sanguines ont permis de mettre en évidence une hyponatrémie (120 mEq/L; normal 135-145 mEq/L), et, bien que ses niveaux d'AVP circulant ait été sous le seuil de détection (<0,5 pg/mL), il a d'abord été diagnostiqué avec un SIADH épisodique. En effet, des infections pulmonaires sont parfois associées à une hyper sécrétion de l'hormone antidiurétique chez des enfants (Rivers *et al.*, 1981). Suite à sa troisième admission à l'hôpital, encore associée à une détresse respiratoire, l'occurrence d'hyponatrémie en absence d'AVP circulante a forcé une réévaluation de la condition de SIADH. Une analyse génétique a donc été réalisée et une mutation du nucléotide 1046 (T changé pour G) dans le gène *AVPR2*, menant à la substitution de la phénylalanine 229 pour une valine (F229V), a été découverte. Il a donc été suspecté que cette

nouvelle substitution, non décrite dans la littérature, pourrait engendrer un gain de fonction du récepteur V2, comme pour les substitutions R137C/L et que cet enfant était atteint de NSIAD.

Suite à cette découverte, et afin de corroborer le diagnostique de NSIAD, nous avons entrepris de caractériser en laboratoire ce récepteur mutant. Nous avons tout d'abord regardé la maturation et l'expression du récepteur F229V à la surface cellulaire. Nos résultats ont démontré que le récepteur s'exprime relativement bien, soit à 80% des niveaux du récepteur sauvage. Lorsque les cellules exprimant le récepteur mutant ont été traitées au chaperon pharmacologique SR121463, les niveaux de surface du récepteur ont augmenté pour atteindre celui du récepteur sauvage, indiquant clairement que l'expression réduite du récepteur mutant est occasionnée par un défaut de maturation.

Suite à la confirmation que le récepteur était bien exprimé à la surface cellulaire, nous avons entrepris d'évaluer les niveaux d'AMPC de base des cellules exprimant ce récepteur. Comme suspecté, les niveaux d'AMPC des cellules exprimant le récepteur F229V étaient supérieurs à ceux observés chez les cellules exprimant le récepteur sauvage. De plus, les niveaux observés se sont avérés plus élevés que ceux observés chez les cellules exprimant les récepteurs mutants R137C et R137L. Ces résultats confirment la découverte d'une nouvelle mutation menant à un gain de fonction du récepteur V2.

Contrairement aux autres substitutions associées au NSIAD, le récepteur mutant F229V n'est pas sujet à une désensibilisation spontanée élevée. En fait, les résultats de BRET obtenus pour le recrutement de la β -arrestine au récepteur et l'assemblage du complexe β -arrestine/AP-2 pour le mutant F229V sont similaires à ceux obtenus pour le récepteur sauvage. L'absence d'endocytose spontanée anormale a aussi été validée par l'impact de la surexpression du dominant négatif de la dynamine sur la formation du complexe β -arrestine/AP-2, tel que décrit précédemment. Le récepteur F229V est toutefois toujours internalisé suite une stimulation par l'AVP et cette stimulation augmente la production d'AMPC par le récepteur, ce qui contraste avec les mutants R137C/L décrits précédemment. L'absence de désensibilisation spontanée élevée pourrait expliquer pourquoi les niveaux de base d'AMPC induits par le mutant F229V sont plus élevés que ceux promus par les mutants R137C et R137L. De plus, ces données sont intéressantes puisqu'elles confirment encore une fois que l'initiation des mécanismes

d'endocytose est indépendante de la production de second messenger. Suite à la stimulation du récepteur F229V, seuls les changements conformationnels induits par la liaison du ligand permettent le recrutement de la machinerie d'endocytose à ce dernier.

L'étape suivante dans notre étude était de tester la possibilité d'inhiber l'activité constitutive du mutant F229V à l'aide d'agonistes inverses. Tel qu'indiqué précédemment, des études avaient démontré l'inefficacité de certains agonistes inverses à abaisser l'activité constitutive élevée des récepteurs mutants R137C et R137L (Rochdi *et al.*, 2010) ou à soulager les symptômes chez un patient atteint de NSIAD (Decaux *et al.*, 2007), ce qui a amené les auteurs de cette dernière étude à déclarer que l'utilisation d'agonistes inverses n'étaient pas une avenue prometteuse pour le traitement des patients atteints de NSIAD. Nous avons testé le SR121463 (satavaptan) et aussi l'OPC-41061 (tolvaptan) puisque cet antagoniste spécifique au récepteur V2 a récemment été approuvé par la FDA (*Food and Drug Administration*) pour le traitement d'hypervolémie et d'hyponatrémie euvoémique (Ghali *et al.*, 2009). Les résultats ont démontré que, contrairement à ce qui avait été obtenu avec les autres substitutions occasionnant le NSIAD, un traitement chronique (18 heures) au SR121463 a permis de diminuer significativement le niveau d'AMPC intracellulaire des cellules exprimant le récepteur mutant F229V, atteignant même un niveau inférieur celui observé chez les cellules exprimant le récepteur sauvage non traitées à l'agoniste inverse. De plus, l'OPC41061 s'est aussi avéré efficace pour diminuer l'activité constitutive du mutant F229V, mettant à jour pour la première fois sa propriété agoniste inverse. Nous avons aussi déterminé, par des études cinétiques qu'il faut environ 5 minutes aux deux drogues pour que le niveau d'AMPC des cellules exprimant le récepteur F229V atteigne un niveau comparable à celui des cellules exprimant récepteur sauvage. Ces résultats encourageants suggèrent qu'une thérapie utilisant l'un ou l'autre de ces agonistes inverses pourrait être bénéfique aux patients porteurs de cette substitution. Il est aussi intéressant de noter que le satavaptan et le tolvaptan pourraient être potentiellement utilisés pour traiter deux maladies aux manifestations cliniques totalement opposés, en exploitant leur propriété de chaperon pharmacologique pour le NDI et leur propriété agoniste inverse pour le NSIAD.

La différence dans la réponse aux agonistes inverses implique que le mutant F229V jouit d'une plus grande plasticité conformationnelle que les mutants R137C/L et suggère donc que les

mécanismes moléculaires menant à l'activation spontanée du récepteur F229V sont différents de ceux des récepteurs R137C/L. Ainsi, l'efficacité d'un traitement aux agonistes inverses pour les patients atteints de NSIAD pourra dépendre de la nature de la mutation causant l'affliction, faisant ressortir la notion de médecine personnalisée; tandis qu'un traitement au SR121463 chez un patient porteur de la substitution F229V pourrait s'avérer efficace, il pourrait être néfaste, comme suggéré précédemment, chez les patients porteurs de mutations affectant l'arginine 137 du récepteur V2. Il est intéressant de noter que si les agonistes inverses s'avéraient efficaces comme traitement pour les patients porteurs de la substitution F229V, ce serait un des rares cas où la source génétique de variations inter-individus dans l'efficacité d'un traitement pour une maladie donnée serait identifiée. Classiquement, la pharmacogénétique est associée avec un polymorphisme génétique affectant le transport, le métabolisme et la clairance des drogues, jouant ainsi sur leur biodisponibilité, ce qui implique souvent un dosage personnalisé (Zhou *et al.*, 2008). Ce n'est que depuis le milieu des années 1990 que le polymorphisme au niveau des cibles thérapeutiques et de leurs effecteurs est considéré comme source de variations inter-individuelles dans l'efficacité des drogues et depuis, ce champ d'étude est en plein essor.

Se basant sur la structure cristalline du récepteur β 2-adrénergique récemment publiée, il a été possible de modéliser la structure du récepteur V2 (Martin Audet, données non publiées). Dans ce modèle, la phénylalanine en position 229 se retrouve au niveau du TM5 près de la jonction avec la 3^{ème} boucle intracellulaire (Figure 20).

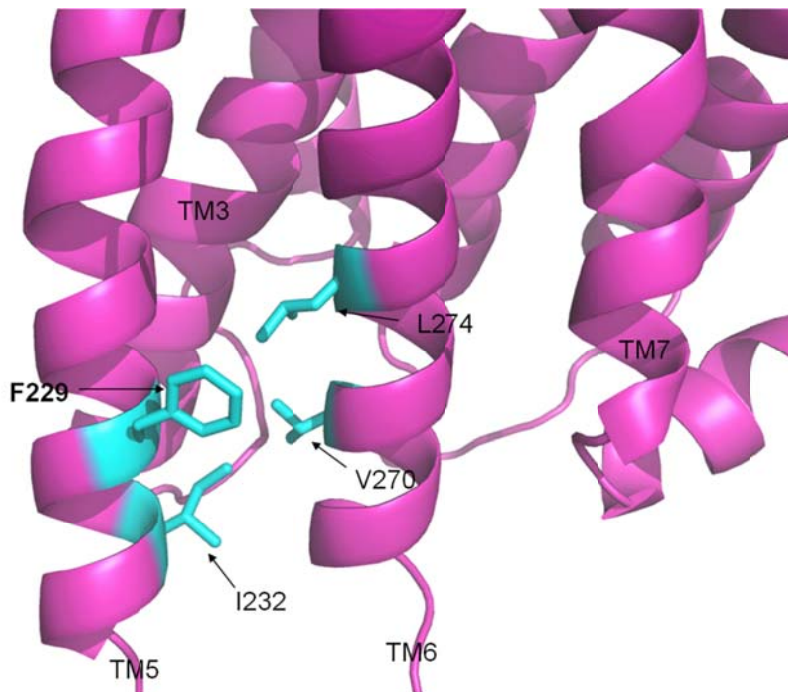


Figure 20: Représentation en ruban d'une portion de la structure du récepteur V2, modélisée à partir de la structure du récepteur β 2-adrénergique.

La position de la phénylalanine 229 sur le TM5 est indiquée ainsi que les acides aminés à proximité (turquoise). Figure réalisée à l'aide du logiciel PyMOL (<http://www.pymol.org>).

Même si le site exact d'interaction entre le récepteur et la protéine G n'est pas entièrement identifié, il est bien établi qu'une augmentation de la distance et donc de l'accessibilité au solvant entre les TM3 et TM6 formeraient une poche de liaison pour la protéine G (Janz et Farrens, 2004; Raimondi *et al.*, 2008) et augmenterait l'activité constitutive des récepteurs de la famille R (Rovati *et al.*, 2007). Ainsi, on pourrait spéculer que la substitution du noyau aromatique de la phénylalanine 229, qui se retrouve à l'interface entre les TM5 et TM6, par le petit groupement aliphatique de la valine affecte la position relative du TM6 par rapport au TM3, ce qui expliquerait l'activité constitutive élevée du mutant F229V.

De part sa découverte récente, seulement quelques d'individus ont été diagnostiqués atteints de NSIAD mais son incidence pourrait être plus élevée que suspecté. En effet, une étude

a démontré qu'entre 10 et 20% des patients atteints de symptômes s'apparentant au SIADH on en fait des niveaux d'AVP circulant normaux ou en deçà des seuils de détection en laboratoire (Zerbe *et al.*, 1980). Ainsi, plusieurs d'entre eux pourraient être porteurs de mutations occasionnant un gain de fonction du récepteur V2. Il est donc à prévoir que d'autres mutations dans le gène codant pour le récepteur et associées au NSIAD seront mise à jour. Notre étude démontre bien l'importance qu'auront les analyses génétiques et la caractérisation biochimiques des formes mutantes du récepteur V2 dans le diagnostic de patients atteints d'hyponatrémie hypervolémique lorsque les niveaux plasmatique d'AVP sont bas, et dans le choix du traitement à appliquer à ces patients.

7.4 Contrôle de qualité et chaperons pharmacologiques

Bien que l'utilisation de molécules favorisant spécifiquement l'adressage à la membrane plasmique de récepteurs mutants normalement retenues intracellulairement soit extrêmement prometteuse pour le traitement des maladies conformationnelles impliquant les RCPGs, les mécanismes de ce 'sauvetage' restent encore élusifs. Les résultats sont clairs, le traitement diminue la quantité de protéines mutantes reconnues défectueuses par un système de surveillance élaboré et rigoureux. Nous avons entrepris d'évaluer la contribution du système de contrôle de qualité du RE basé sur les glycanes liés aux asparagines (N-glycosylation; voir section 5.2), impliquant un réseau de protéines lectines résidentes de la voie de sécrétion, dans le processus de rétention des formes mutantes du récepteur V2. Nous avons aussi évalué l'impact de l'absence de N-glycosylation sur l'efficacité d'un traitement au chaperon pharmacologique. Des données antérieures avaient démontré que la mutation du seul site de N-glycosylation (asparagine en position 22) du récepteur V2 n'affectait pas sa maturation ni sa fonction (Sadeghi et Birnbaumer, 1999). Ceci dit, aucune information n'est disponible quant au rôle de ces glycanes sur la rétention des formes mutantes du récepteur.

Pour réaliser cette étude, nous avons choisi deux mutations à occurrence naturelle menant au DINc, dont les manifestations cliniques chez les patients porteurs de ces mutations sont variables. En effet, la mutation engendrant la substitution du tryptophane en position 164 par une

sérine (W164S) induit des symptômes cliniques sévères et nos résultats ont démontré que les niveaux d'expression de surface de ce récepteur mutant sont bas, soit environ 15% de celui atteint par le récepteur sauvage. L'autre mutation étudiée implique la substitution de la tyrosine 128 par une sérine (Y128S) et induit des symptômes cliniques légers. Bien que sa maturation soit aussi compromise, son expression de surface est plus élevée que pour le mutant W164S, soit environ 32% de celui du récepteur sauvage. Ces deux substitutions sont positionnées au niveau des tronçons membranaires 4 et 3, respectivement (Figure 21).

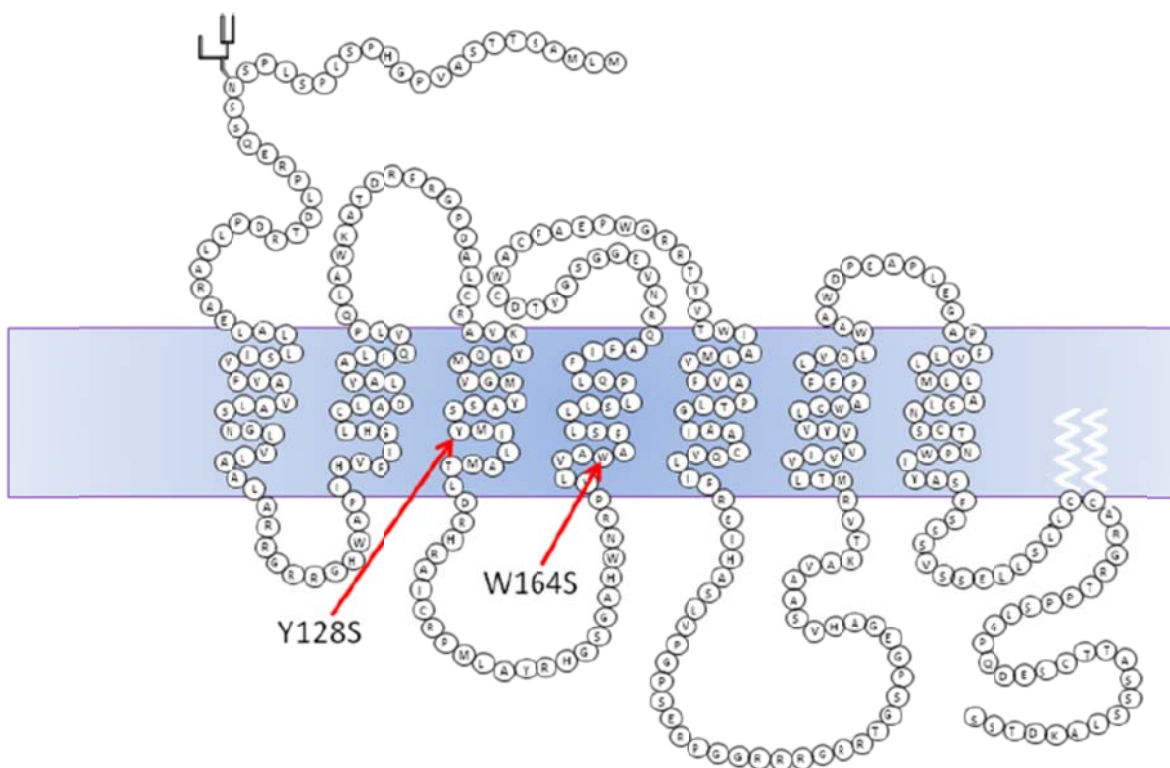


Figure 21: Représentation en serpentin de la topologie du récepteur V2 et positionnement des acides aminés substitués à l'étude.

Suite à un traitement au chaperon pharmacologique SR121463, l'expression de surface du mutant W164S a augmenté pour atteindre 55% de celle du récepteur sauvage tandis que l'expression du récepteur Y128S s'est avérée restaurée complètement, suggérant que le défaut de maturation du récepteur Y128S est moins important que celui affectant le récepteur W164S puisque complètement réchappé par un traitement au chaperon pharmacologique

Afin de déterminer l'importance des sucres liés aux asparagines (N-glycosylation) dans la rétention des formes mutantes du récepteur V2, nous avons construit des versions non-glycosylées de ceux-ci, en mutant l'asparagine en position 22 afin de la substituer par une glutamine (N22Q), et regardé l'impact de cette modification sur leur maturation, leur expression de surface ainsi que leur sauvetage par un traitement au chaperon pharmacologique. Nos résultats confirment que le glycan lié à l'asparagine 22 n'est pas impliqué dans le repliement, la maturation et l'expression à la surface cellulaire du récepteur sauvage puisque la version N-glycosylée s'exprime et signale aussi bien que la version sauvage glycosylée. Ces résultats contrastent avec des données obtenues avec le récepteur δ -opioïde, où l'on a clairement démontré une augmentation de la vitesse d'export hors du RE du récepteur lorsque ses deux sites de N-glycosylation étaient mutés ou lorsque le processus de N-glycosylation était inhibé par la tunicamycine (Markkanen et Petaja-Repo, 2008). Cette différence suggère que la maturation du récepteur V2 est, à la base, plus efficace que celle du récepteur δ -opioïde. L'absence d'effet négatif pour le récepteur V2 dépourvu de N-glycosylation suggère aussi que les interactions sucres/lectines ayant cours dans le RE ne sont pas essentielles aux processus de biogénèse et de transport antérograde du récepteur sauvage.

Dans le cas du récepteur mutant Y128S, le niveau d'expression de surface de la forme non-glycosylée (N22Q/Y128S) s'est avéré semblable à celle de la forme glycosylée, indiquant que la reconnaissance et la rétention du récepteur N22Q/Y128S par le système de contrôle de qualité ne semblent pas affectées. Le taux de 'sauvetage' du double mutant N22Q/Y128S suite à un traitement au chaperon pharmacologique est lui aussi inchangé par rapport au récepteur N-glycosylé, ce qui suggère que la présence ou non de N-glycosylation sur le mutant Y128S, comme pour le récepteur sauvage, ne semble pas avoir d'impact significatif sur sa biogénèse, ce qui signifie que le réseau de protéines lectines n'est pas impliqué, ou du moins, n'est pas essentiel à leur maturation, leur transport antérograde, leur rétention dans le RE (pour Y128S) et aussi, leur dégradation. De plus, ces résultats suggèrent que la présence des sucres n'est pas requise pour le bon fonctionnement des chaperons pharmacologiques.

Pour ce qui est du mutant W164S dépourvu de N-glycosylation, une seule bande a été observée sur SDS-PAGE à environ 33 kDa. Puisque le récepteur V2 sauvage dépourvu de toute glycosylation migre à environ 37 kDa, nous suspectons que le double mutant W164S/N22Q subit

un clivage protéolytique de sa queue C-terminale (la détection immunologique étant dépendante de l'épitope Myc retrouvé en N-terminal) ou est victime d'un arrêt prématuré de l'élongation de la chaîne peptidique lors de sa synthèse. De plus, ce mutant s'accumule fortement à l'intérieur des cellules, soit environ 5 fois plus que les autres récepteurs et est totalement insensible à un traitement au chaperon pharmacologique. Ces résultats suggèrent que la présence des sucres liés aux asparagines est essentielle au repliement et à la maturation de ce mutant particulier mais aussi à sa clairance (dégradation). L'avantage de la présence des sucres sur ce mutant pourrait être attribuable à la nécessité des interactions avec les différentes composantes lectines du RE mais aussi aux propriétés biophysiques qu'elle apporte. En effet, la présence de carbohydrates hautement polaires affecte directement les propriétés de la chaîne polypeptidique en repliement et est reconnu pour promouvoir et stabiliser la structure protéique, du moins localement (Petrescu *et al.*, 2004). L'absence d'effet positif du traitement au chaperon pharmacologique sur la maturation de ce mutant pourrait être dû au fait que le récepteur n'a jamais atteint un niveau de repliement assez avancé pour que le site de liaison du ligand ait été formé, empêchant ainsi la liaison du chaperon au récepteur.

Dans la plupart des cas rapportés, la liaison du chaperon moléculaire Cnx aux protéines en repliement implique la présence de N-glycosylation. Certains ont rapportés une interaction indépendante de la présence des sucres, comme pour le récepteur de l'angiotensine AT-1 (Lanctot *et al.*, 2006) et le récepteur de l'hormone lutéinisante (LH) (Mizrachi et Segaloff, 2004), deux RCPGs. Dans le cas du récepteur V2, nos résultats indiquent que son interaction avec Cnx est fortement compromise en absence de N-glycosylation. Puisque les récepteurs sauvage et Y128S ne sont pas affectés négativement par l'absence de N-glycosylation, nous pouvons conclure que l'interaction avec Cnx n'est pas essentielle à la biogénèse de ces formes de récepteurs. Par contre, et comme suggéré précédemment, le mutant W164S pourrait dépendre d'une telle interaction. La différence de comportement observée entre les mutants W164S et Y128S dépourvus de N-glycosylation suggère que l'importance de la présence des sucres sur les mutants du récepteur V2 serait une caractéristique mutation-spécifique. Puisque à la base, le mutant W164S démontre un défaut de repliement plus sévère que celui affectant le mutant Y128S, nous pourrions spéculer que plus le défaut de repliement est sévère, plus la présence des sucres est importante pour leur maturation et/ou leur dégradation.

Dans une étude précédente, notre laboratoire a démontré que le temps d'interaction entre Cnx et le récepteur V2 mutant R337X (forme tronquée manquant les 30 derniers acides aminés) était plus long qu'avec la forme sauvage du récepteur, suggérant que la Cnx jouait un rôle dans la rétention des formes mutantes (Morello *et al.*, 2001). Toutefois, aucune donnée n'était disponible quant à l'impact d'un traitement au chaperon pharmacologique sur cette interaction. Nos résultats ont démontré qu'un traitement au SR121463 n'a pas d'effet significatif sur le nombre d'interaction récepteur/Cnx mais affecte la durée de cette interaction, et ce, pour tous les récepteurs testés. Comme démontré précédemment pour le récepteur mutant R337X, la durée d'interaction entre Cnx et le récepteur sauvage est significativement plus courte (environ 40 min.) que celle observée pour le récepteur mutant W164S (~60 min.) dont la maturation est fortement compromise, ce qui suggère que le complexe Cnx participe à la rétention de ce mutant. Dans le cas du mutant Y128S, l'interaction récepteur/Cnx s'est avérée la même que pour le récepteur sauvage, et cette différence indique que ce paramètre est particulier à la mutation étudiée. Le fait que le mutant Y128S ait le même temps d'interaction avec la Cnx que le récepteur sauvage, tout en étant partiellement retenu par le système de contrôle de qualité du RE suggère que d'autres composantes de ce système, en aval de la Cnx, seraient responsables de la rétention de ce mutant ou que le récepteur est rapidement envoyé à la dégradation après une plutôt brève tentative de repliement, contrairement au mutant W164S pour lequel plus de temps serait alloué aux tentatives de repliement. Le fait que le traitement au chaperon pharmacologique a eu pour conséquence de diminuer la durée d'interaction entre Cnx et les récepteurs sauvage et Y128S, suggère que l'effet du traitement a lieu avant ou durant cette interaction pour ces récepteurs, ce qui semble invalider la première hypothèse. Une diminution du temps d'interaction avec Cnx suite à un traitement au chaperon pharmacologique avait aussi été observée pour un mutant du récepteur V1b (Robert *et al.*, 2005) et un mutant de canal hERG (*human Ether-à-go-go Related Gene*) (Gong *et al.*, 2006). Le fait que nous ayons démontré que l'absence des sucres sur ces deux récepteurs abolissait presque entièrement leur interaction avec Cnx sans affecter leur maturation semble indiquer que cet interaction n'est pas nécessaire à leur maturation, ce qui peut sembler paradoxal considérant que nous montrons que le temps d'interaction avec Cnx est diminué en présence de chaperon pharmacologique. Il serait alors plus approprié de considérer la diminution du temps d'interaction avec Cnx en présence de chaperon

pharmacologique comme le reflet de ce qui se passe vraiment. En fait, ces données pourraient suggérer que ces récepteurs sont associés à un complexe de chaperons moléculaires dont fait partie la Cnx, et que le temps apparent de cette interaction est dicté par une, ou plusieurs protéines de ce complexe n'ayant pas recours aux sucres pour son interaction avec les récepteurs. Il sera intéressant d'isoler ce complexe afin d'identifier les protéines impliquées dans la rétention de ces récepteurs.

L'observation que le traitement au chaperon pharmacologique diminue le temps d'interaction entre Cnx et les récepteurs sauvage et Y128S peut sembler en opposition avec le résultat démontrant qu'un traitement au chaperon pharmacologique n'a pas affecté la quantité de récepteurs liés à la Cnx, tel que déterminée par immuno-précipitation. Ce phénomène pourrait s'expliquer si le nombre de récepteurs engagés dans le processus de repliement surpassait les capacités de la Cnx. En effet, les expériences réalisées en surexpression de protéines dépassent souvent de beaucoup les niveaux d'expression endogènes. Ainsi une quantité limitante des complexes de repliements dont fait partie la Cnx ne permettrait pas d'apprécier une diminution du nombre d'interactions suite à un traitement au chaperon pharmacologique puisque même si cette interaction est plus courte, le récepteur se dissociant de ce complexe serait rapidement remplacé par un autre 'en attente'.

De façon intéressante, le temps d'interaction entre le récepteur mutant W164S et Cnx n'a pas été significativement affecté par le traitement au chaperon pharmacologique, malgré le fait qu'une amélioration de son efficacité de maturation avait été observée. Ce résultat suggère que l'action du chaperon pharmacologique sur ce mutant pourrait avoir lieu après son interaction avec le complexe Cnx, ce qui implique que le mode de rétention des mutants pourrait dépendre de la nature même de la mutation, selon le défaut de repliement impliqué ou sa sévérité. Ainsi, la Cnx et d'autres protéines chaperons, en aval de cette dernière, seraient responsables de la rétention du mutant W164S, impliquant au moins deux points de contrôle et de rétention. Il est intéressant de noter que même si la rétention des formes mutantes pourrait se faire via des protéines différentes selon la mutation impliquée, il y a toujours possibilité de récupération fonctionnelle par un traitement au chaperon pharmacologique, suggérant que 'l'effet chaperon' pourrait s'effectuer à différents niveaux de maturation selon le mutant.

Nous avons aussi étudié l'interaction des différents récepteurs avec la Cnx par la méthode de BRET. Les résultats ont démontré que les niveaux d'interaction (valeurs de BRET) entre les récepteurs N-glycosylés et Cnx étaient plus élevés pour les formes mutantes que pour le récepteur sauvage (Figure 22), malgré le fait que le nombre d'interactions soit semblable pour tout les récepteurs, comme démontré par des expériences d'immunoprécipitations. Deux hypothèses pourraient expliquer ce phénomène. Premièrement, l'accumulation des formes mutantes du récepteur au niveau du RE et à proximité de la Cnx pourrait favoriser un transfert d'énergie entre partenaires n'étant pas en interaction directe. Ainsi, la quantité d'énergie transférée entre les deux protéines proviendrait d'interactions directes mais aussi indirectes. En appui avec cette hypothèse, un traitement au chaperon pharmacologique qui a pour effet de diminuer la quantité de récepteurs retenus dans le RE en favorisant leur maturation, a eu pour effet de diminuer significativement les valeurs BRET pour les récepteurs mutants sans toutefois affecter significativement les valeurs pour le récepteur sauvage. En plus, puisque les valeurs BRET sont la résultante du signal de la YFP divisé par le signal total de la luciférase, une plus grande proportion de récepteurs fusionnés à la luciférase à l'extérieur du RE et donc hors de portée de la Cnx (fusionnée à la protéine fluorescente YFP), aura pour conséquence de diminuer artificiellement les valeurs BRET observées. Une deuxième hypothèse serait que la position dans l'espace de la luciférase fusionnée aux récepteurs mutants, dont la conformation est altérée, n'est pas la même que celle adoptée lorsque fusionnée au récepteur sauvage. Le BRET est une méthode extrêmement sensible de mesure de proximité, et l'efficacité du transfert d'énergie dépend de la distance séparant le donneur et l'accepteur, et est inversement proportionnelle à la sixième puissance de cette distance (Cardullo, 2007). On pourrait alors spéculer que la liaison du chaperon pharmacologique au récepteurs mutant favoriserait une réorientation de la luciférase, augmentant sa distance avec la YFP, ce qui expliquerait la baisse des valeurs BRET suite au traitement.

Indépendamment des deux hypothèses énoncées, l'effet prononcé du traitement au chaperon pharmacologique sur les valeurs BRET avec les récepteurs mutants et Cnx suggère que cette approche technique pourrait être un outil performant lors de criblages ayant pour but d'identifier des molécules ayant des propriétés de chaperon pharmacologique, que ce soit pour le récepteur V2 ou toute autre protéine mutante retenue dans le RE.

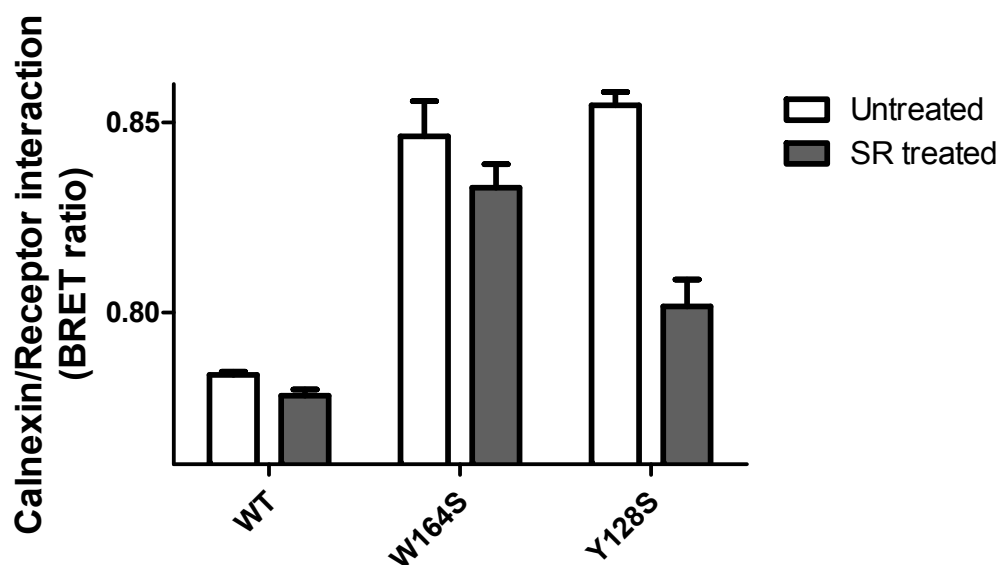


Figure 22 : Mesure de BRET entre Cnx-YFP et les récepteurs V2 fusionnés à la *Rluc*. Les mesures de BRET ont été effectuées 48 heures post-transfection et suite à un traitement au SR121463 d'une durée de 18 heures (lorsqu'applicable).

En résumé, bien que la présence de N-glycosylation soit importante pour l'interaction entre Cnx et les trois récepteurs testés, son absence n'affecte pas le repliement, la maturation et la rétention intracellulaire du récepteur sauvage et du mutant Y128S. En contrepartie, le repliement et la maturation du mutant W164S dépourvu de N-glycosylation se sont avérés compromis, comme illustré par sa forte accumulation intracellulaire, sa taille réduite et l'inefficacité du traitement au chaperon pharmacologique. Cette différence drastique suggère que l'efficacité de repliement et la prise en charge des formes mutantes du récepteur V2 sont des paramètres élaborés qui sont grandement influencés par la nature de la mutation impliquée. Puisque l'efficacité du traitement au chaperon pharmacologique n'a pas été affectée par l'absence de N-glycosylation pour le mutant Y128S, les interactions protéine-protéine basées sur les sucres dans le RE pourraient n'avoir qu'une influence marginale sur la reconnaissance, la rétention et la maturation des formes mutantes du récepteur V2. En fait, la présence de N-glycans pourrait être bénéfique à la maturation et/ou à la dégradation des récepteurs mutants dont le repliement est plus sérieusement compromis, comme dans le cas du mutant W164S, par ses

effets sur les propriétés physico-chimiques de la chaîne polypeptidique en repliement ou en favorisant des interactions clés. Nos résultats ont aussi démontré que le temps d'interaction entre les récepteurs mutants et Cnx pouvait varier en fonction de la mutation et était corrélé avec le degré de sévérité du défaut de repliement. De plus, et encore en fonction du mutant, le temps d'interaction avec Cnx peut être diminué ou inchangé par un traitement au chaperon pharmacologique, suggérant que l'effet chaperon peut survenir avant ou pendant l'interaction du récepteur avec Cnx (temps d'interaction diminué), ou après (temps d'interaction inchangé). Ces résultats convergent vers l'idée que les protéines responsables de la rétention des mutants peuvent être différentes ou en différents complexes, en fonction de la mutation impliquée.

7.4.1 Hypothèse sur le mécanisme d'action des chaperons pharmacologiques

Suite aux observations faites à partir de l'étude de différents mutants du récepteur V2, des évidences nous permettent de proposer une hypothèse quant à la dynamique de repliement des RCPGs mutants et au mécanisme d'action des chaperons pharmacologiques.

Se basant sur le fait que certains récepteurs sauvages ont une maturation inefficace (i.e. DOR et GNRH) et le fait qu'on rapporte jusqu'à 30% d'insuccès de repliement pour l'ensemble des polypeptides en synthèse chez les eucaryotes (Schubert *et al.*, 2000), il est clair que le repliement des protéines n'est pas toujours un événement efficace à 100%, indiquant que l'adoption de la conformation native d'une chaîne polypeptidique donnée est un événement probabiliste.

Les analyses portant sur les formes mutantes du récepteur V2 ont démontré qu'elles étaient souvent associées à une diminution de leur expression de surface, en comparaison au récepteur sauvage, et que le taux de cette diminution était variable entre les différents mutants. Bien que l'expression de surface des formes mutantes soit partielle, elle est rarement totalement absente, indiquant qu'une proportion de récepteurs mutants synthétisés réussit à atteindre une conformation adéquate ou compatible avec le système de contrôle de qualité de la voie de sécrétion. Ainsi, la présence de mutations affecterait la probabilité d'adoption de la conformation

native (ou compatible avec les standards de la voie de sécrétion). Suivant ce raisonnement, il serait approprié de penser qu'un chaperon pharmacologique, par sa liaison directe avec le polypeptide en repliement, augmente la probabilité d'adoption d'une structure native. Le fait que le taux de récupération de l'expression de surface varie en fonction des mutants suite au traitement au chaperon pharmacologique est une autre évidence suggérant que le succès de repliement en présence de chaperon pharmacologique est encore un événement probabiliste. Une façon de rationaliser ce concept serait, en termes thermodynamiques, que la liaison du chaperon pharmacologique au polypeptide en repliement abaisserait, comme dans le cas de catalyseurs lors de réactions chimiques, l'énergie d'activation nécessaire à l'acquisition de sa structure native (Figure 23). Ce mécanisme d'action contraste avec celui suggéré pour les chaperons chimiques qui augmenteraient l'entropie de la protéine en repliement sans affecter l'énergie d'activation nécessaire à l'adoption d'une conformation adéquate (voir section 6.4.1). Ainsi, le chaperon chimique altère les conditions environnantes de la protéine en repliement tandis que le chaperon pharmacologique agit directement sur le polypeptide en repliement.

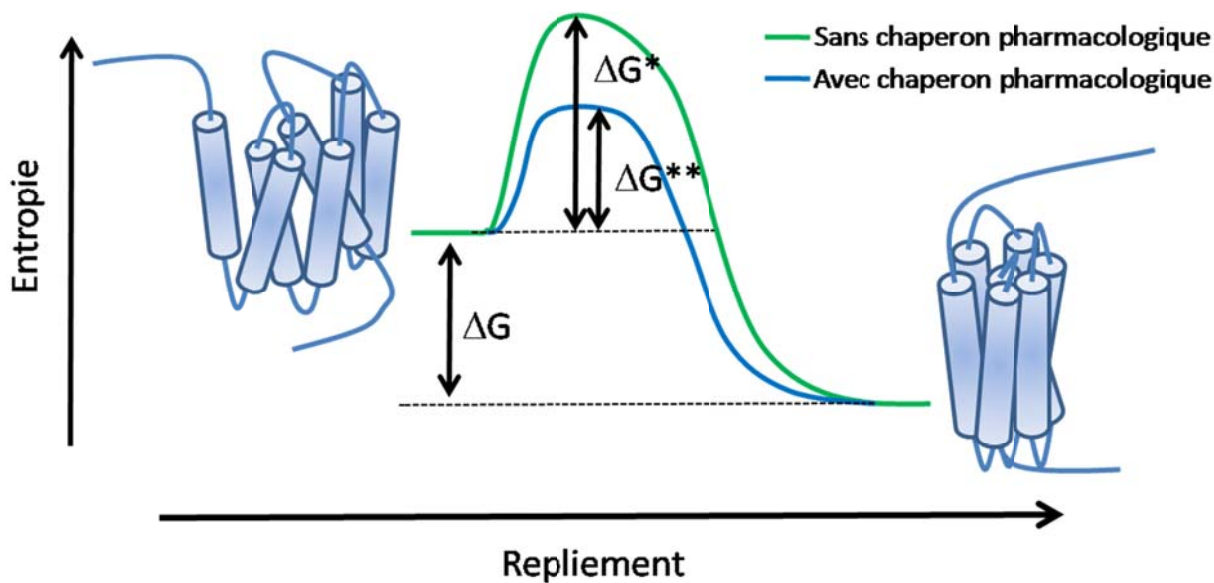


Figure 23: Représentation graphique du mode d'action putatif des chaperons pharmacologiques.

CONCLUSION

Les travaux présentés dans cette thèse sont une série d'investigations des conséquences de mutations sur différents aspects de la fonctionnalité du V2R. Bien que le résultat final soit un gain ou une perte de fonction, les mutations ont des répercussions à différents niveaux de l'ontogénie du récepteur. Une conséquence récurrente est la rétention des formes mutantes par le système de contrôle de qualité inhérent à la voie de sécrétion. Ainsi, plusieurs mutations du gène *AVPR2* induisent une maladie de type 'conformationnelle' comme dans la majorité des cas de DINc. Depuis la découverte que certains composés pouvaient avoir un effet bénéfique sur le repliement et la maturation de protéines mutantes ou repliées inefficacement, les chaperons pharmacologiques sont en voie de devenir un outil incontournable dans le traitement des maladies dites 'conformationnelles'. Par contre, l'utilisation élargie de ces agents thérapeutiques prometteurs requiert encore une compréhension approfondie des mécanismes cellulaires impliqués dans la rétention des mutants par le système de contrôle de qualité. Nos travaux ont démontré que la N-glycosylation n'est pas requise aux processus de reconnaissance, de rétention et de 'sauvetage' par les chaperons pharmacologiques des formes mutantes du récepteur V2, excluant une dépendance aux interactions sucres/lectines dans ces processus. L'importance de ces sucres dans les processus de repliement et de clairance des formes mutantes s'est par contre avérée un paramètre mutation-spécifique. De plus, nous avons démontré que les chaperons pharmacologiques pouvaient soit ne pas affecter, ou réduire le temps d'interaction avec la Cnx selon la mutation, suggérant que l'action des chaperons pharmacologiques peut survenir à différentes étapes de maturation de ces mutants. Ceci implique aussi que le processus de maturation de ces mutants sont différents, faisant émerger le concept d'une prise en charge 'personnalisée' des différentes formes mutantes du V2R par le système de contrôle de qualité du RE, illustrant du même coup le raffinement de ce dernier. Les principaux acteurs responsables de la reconnaissance et de la rétention des V2R mutants restent encore inconnus et leur identification est prioritaire dans l'élucidation des mécanismes d'action des chaperons pharmacologiques.

Il est à prévoir que l'obtention de la structure cristallographique du V2R pourra éventuellement permettre de mieux prédire l'impact des mutations sur la biologie du récepteur,

mais en attendant, et comme nos travaux le démontrent, les études fonctionnelles approfondies des formes mutantes sont péremptoires au processus décisionnel du choix des stratégies thérapeutiques à adopter pour le traitement des patients atteints de DINc ou de NSIAD. Des quatre mutants occasionnant une perte de fonction étudiés ici, trois sont suspectés de bénéficier d'un traitement au chaperon pharmacologique tandis que pour le quatrième, nos études prédisent qu'un tel traitement pourrait empirer les symptômes. Nous avons aussi montré que, bien que les agonistes inverses sont excellents pour atténuer l'activité constitutive du mutant F229V identifié chez un patient atteint de NSIAD, l'utilisation de ces composés, qui possèdent de surcroît la propriété de chaperon pharmacologique, pourrait aggraver les symptômes cliniques chez les patients porteurs des mutants R137C et R137L dont l'activité constitutive élevée est combinée à une 'rigidité conformationnelle'.

Face à la diversité des défauts fonctionnels engendrés par les différentes mutations, de nouveaux outils thérapeutiques ciblés devront s'ajouter à l'arsenal déjà existant. L'utilisation de formes mutantes du V2R dans les expériences de criblage à haut débit pourrait être utile pour identifier des molécules possédant les caractéristiques recherchées. Dans ce sens, nous avons démontré que l'utilisation de la technique de BRET utilisée pour mesurer l'interaction entre les formes mutantes du V2R et Cnx pourrait s'avérer utile dans l'identification de composés possédant des propriétés de chaperons pharmacologiques. Bien que ces études n'aient portées que sur le V2R, la complexité des mécanismes moléculaires entourant les différents aspects de la biologie des RCPGs suggère que les mêmes concepts sont extrapolable à d'autres RCPGs dont les formes mutantes sont sources de pathologies. L'étude des mutants de RCPGs nous aide aussi à approfondir nos connaissances sur la biologie encore méconnue de cette grande famille de récepteurs qui sont une cible prépondérante pour l'industrie pharmaceutique. De meilleures connaissances dans ce domaine permettra de développer de nouveaux essais visant à faire un constat précis de chacune des étapes dans l'ontogénie du RCPG, que ce soit au niveau de sa maturation, son assemblage oligomérique, de sa signalisation et des événements impliqués dans sa désensibilisation, et de mieux cerner les conséquences fonctionnelles induites par des mutations, toujours dans l'optique d'apporter aux patients une thérapie personnalisée, et de développer de nouveaux agents thérapeutiques adaptés aux besoins.

LISTE DES RÉFÉRENCES

- Abbracchio, M. P., G. Burnstock, J. M. Boeynaems, E. A. Barnard, J. L. Boyer, C. Kennedy, G. E. Knight, M. Fumagalli, C. Gachet, K. A. Jacobson et G. A. Weisman (2006). "International Union of Pharmacology LVIII: update on the P2Y G protein-coupled nucleotide receptors: from molecular mechanisms and pathophysiology to therapy." *Pharmacol Rev* **58**(3): 281-341.
- AbdAlla, S., H. Lothar et U. Quitterer (2000). "AT1-receptor heterodimers show enhanced G-protein activation and altered receptor sequestration." *Nature* **407**(6800): 94-8.
- Acher, R., J. Chauvet et M. T. Chauvet (1995). "Man and the chimaera. Selective versus neutral oxytocin evolution." *Adv Exp Med Biol* **395**: 615-27.
- Acher, R., J. Chauvet et Y. Rouille (2002). "Dynamic processing of neuropeptides: sequential conformation shaping of neurohypophysial preprohormones during intraneuronal secretory transport." *J Mol Neurosci* **18**(3): 223-8.
- Agre, P. (2000). "Homer W. Smith award lecture. Aquaporin water channels in kidney." *J Am Soc Nephrol* **11**(4): 764-77.
- Agre, P., A. M. Saboori, A. Asimos et B. L. Smith (1987). "Purification and partial characterization of the Mr 30,000 integral membrane protein associated with the erythrocyte Rh(D) antigen." *J Biol Chem* **262**(36): 17497-503.
- Ala, Y., D. Morin, B. Mouillac, N. Sabatier, R. Vargas, N. Cotte, M. Dechaux, C. Antignac, M. F. Arthus, M. Lonergan, M. S. Turner, M. N. Balestre, G. Alonso, M. Hibert, C. Barberis, G. N. Hendy, D. G. Bichet et S. Jard (1998). "Functional studies of twelve mutant V2 vasopressin receptors related to nephrogenic diabetes insipidus: molecular basis of a mild clinical phenotype." *J Am Soc Nephrol* **9**(10): 1861-72.
- Alonso, G., E. Galibert, V. Boulay, A. Guillou, A. Jean, V. Compan et G. Guillon (2009). "Sustained elevated levels of circulating vasopressin selectively stimulate the proliferation of kidney tubular cells via the activation of V2 receptors." *Endocrinology* **150**(1): 239-50.
- Amara, J. F., G. Lederkremer et H. F. Lodish (1989). "Intracellular degradation of unassembled asialoglycoprotein receptor subunits: a pre-Golgi, nonlysosomal endoproteolytic cleavage." *J Cell Biol* **109**(6 Pt 2): 3315-24.
- Ando, Y., K. Tabei et Y. Asano (1991). "Luminal vasopressin modulates transport in the rabbit cortical collecting duct." *J Clin Invest* **88**(3): 952-9.
- Angers, S., A. Salahpour, E. Joly, S. Hilairret, D. Chelsky, M. Dennis et M. Bouvier (2000). "Detection of beta 2-adrenergic receptor dimerization in living cells using bioluminescence resonance energy transfer (BRET)." *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**(7): 3684-9.
- Appenzeller-Herzog, C. et H. P. Hauri (2006). "The ER-Golgi intermediate compartment (ERGIC): in search of its identity and function." *J Cell Sci* **119**(Pt 11): 2173-83.
- Appenzeller-Herzog, C., A. C. Roche, O. Nufer et H. P. Hauri (2004). "pH-induced conversion of the transport lectin ERGIC-53 triggers glycoprotein release." *J Biol Chem* **279**(13): 12943-50.

- Apweiler, R., H. Hermjakob et N. Sharon (1999). "On the frequency of protein glycosylation, as deduced from analysis of the SWISS-PROT database." Biochim Biophys Acta **1473**(1): 4-8.
- Arakawa, T., D. Ejima, Y. Kita et K. Tsumoto (2006). "Small molecule pharmacological chaperones: From thermodynamic stabilization to pharmaceutical drugs." Biochim Biophys Acta **1764**(11): 1677-87.
- Arakawa, T. et S. N. Timasheff (1983). "Preferential interactions of proteins with solvent components in aqueous amino acid solutions." Arch Biochem Biophys **224**(1): 169-77.
- Arakawa, T. et S. N. Timasheff (1985). "The stabilization of proteins by osmolytes." Biophys J **47**(3): 411-4.
- Arend, L. J., W. K. Sonnenburg, W. L. Smith et W. S. Spielman (1987). "A1 and A2 adenosine receptors in rabbit cortical collecting tubule cells. Modulation of hormone-stimulated cAMP." J Clin Invest **79**(3): 710-4.
- Aridor, M., A. K. Guzik, A. Bielli et K. N. Fish (2004). "Endoplasmic reticulum export site formation and function in dendrites." J Neurosci **24**(15): 3770-6.
- Arnold, S. M., L. I. Fessler, J. H. Fessler et R. J. Kaufman (2000). "Two homologues encoding human UDP-glucose:glycoprotein glucosyltransferase differ in mRNA expression and enzymatic activity." Biochemistry **39**(9): 2149-63.
- Arnold, S. M. et R. J. Kaufman (2003). "The noncatalytic portion of human UDP-glucose: glycoprotein glucosyltransferase I confers UDP-glucose binding and transferase function to the catalytic domain." J Biol Chem **278**(44): 43320-8.
- Arthus, M. F., M. Lonergan, M. J. Crumley, A. K. Naumova, D. Morin, L. A. De Marco, B. S. Kaplan, G. L. Robertson, S. Sasaki, K. Morgan, D. G. Bichet et T. M. Fujiwara (2000). "Report of 33 novel AVPR2 mutations and analysis of 117 families with X-linked nephrogenic diabetes insipidus." J Am Soc Nephrol **11**(6): 1044-54.
- Audet, M. et M. Bouvier (2008). "Insights into signaling from the beta2-adrenergic receptor structure." Nat Chem Biol **4**(7): 397-403.
- Azzi, M., P. G. Charest, S. Angers, G. Rousseau, T. Kohout, M. Bouvier et G. Pineyro (2003). "Beta-arrestin-mediated activation of MAPK by inverse agonists reveals distinct active conformations for G protein-coupled receptors." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(20): 11406-11.
- Bailey, M. A., M. Imbert-Teboul, C. Turner, S. Marsy, K. Srail, G. Burnstock et R. J. Unwin (2000). "Axial distribution and characterization of basolateral P2Y receptors along the rat renal tubule." Kidney Int **58**(5): 1893-901.
- Bailey, M. A., M. Imbert-Teboul, C. Turner, S. K. Srail, G. Burnstock et R. J. Unwin (2001). "Evidence for basolateral P2Y(6) receptors along the rat proximal tubule: functional and molecular characterization." J Am Soc Nephrol **12**(8): 1640-7.
- Baker, J. G. et S. J. Hill (2007). "Multiple GPCR conformations and signalling pathways: implications for antagonist affinity estimates." Trends Pharmacol Sci **28**(8): 374-81.
- Baksh, S. et M. Michalak (1991). "Expression of calreticulin in Escherichia coli and identification of its Ca²⁺ binding domains." J Biol Chem **266**(32): 21458-65.
- Balasubramanian, L., J. S. Sham et K. P. Yip (2008). "Calcium signaling in vasopressin-induced aquaporin-2 trafficking." Pflugers Arch **456**(4): 747-54.
- Ball, S. G. (2007). "Vasopressin and disorders of water balance: the physiology and pathophysiology of vasopressin." Ann Clin Biochem **44**(Pt 5): 417-31.

- Bankir, L. (2001). "Antidiuretic action of vasopressin: quantitative aspects and interaction between V1a and V2 receptor-mediated effects." Cardiovasc Res **51**(3): 372-90.
- Barak, L. S., R. H. Oakley, S. A. Laporte et M. G. Caron (2001). "Constitutive arrestin-mediated desensitization of a human vasopressin receptor mutant associated with nephrogenic diabetes insipidus." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(1): 93-8.
- Barak, L. S., A. Salahpour, X. Zhang, B. Masri, T. D. Sotnikova, A. J. Ramsey, J. D. Violin, R. J. Lefkowitz, M. G. Caron et R. R. Gainetdinov (2008). "Pharmacological characterization of membrane-expressed human trace amine-associated receptor 1 (TAAR1) by a bioluminescence resonance energy transfer cAMP biosensor." Mol Pharmacol **74**(3): 585-94.
- Barki-Harrington, L. et H. A. Rockman (2008). "Beta-arrestins: multifunctional cellular mediators." Physiology (Bethesda) **23**: 17-22.
- Barlowe, C. (2003). "Molecular recognition of cargo by the COPII complex: a most accommodating coat." Cell **114**(4): 395-7.
- Baylis, P. H. (1987). "Osmoregulation and control of vasopressin secretion in healthy humans." Am J Physiol **253**(5 Pt 2): R671-8.
- Beaulieu, J. M., T. D. Sotnikova, S. Marion, R. J. Lefkowitz, R. R. Gainetdinov et M. G. Caron (2005). "An Akt/beta-arrestin 2/PP2A signaling complex mediates dopaminergic neurotransmission and behavior." Cell **122**(2): 261-73.
- Beaumont, K. A., R. A. Newton, D. J. Smit, J. H. Leonard, J. L. Stow et R. A. Sturm (2005). "Altered cell surface expression of human MC1R variant receptor alleles associated with red hair and skin cancer risk." Hum Mol Genet **14**(15): 2145-54.
- Benjamin, I. J. et D. R. McMillan (1998). "Stress (heat shock) proteins: molecular chaperones in cardiovascular biology and disease." Circ Res **83**(2): 117-32.
- Benovic, J. L., L. J. Pike, R. A. Cerione, C. Staniszewski, T. Yoshimasa, J. Codina, M. G. Caron et R. J. Lefkowitz (1985). "Phosphorylation of the mammalian beta-adrenergic receptor by cyclic AMP-dependent protein kinase. Regulation of the rate of receptor phosphorylation and dephosphorylation by agonist occupancy and effects on coupling of the receptor to the stimulatory guanine nucleotide regulatory protein." J Biol Chem **260**(11): 7094-101.
- Benovic, J. L., R. H. Strasser, M. G. Caron et R. J. Lefkowitz (1986). "Beta-adrenergic receptor kinase: identification of a novel protein kinase that phosphorylates the agonist-occupied form of the receptor." Proc Natl Acad Sci U S A **83**(9): 2797-801.
- Bernier, V., D. G. Bichet et M. Bouvier (2004). "Pharmacological chaperone action on G-protein-coupled receptors." Curr Opin Pharmacol **4**(5): 528-33.
- Bernier, V., M. Lagace, D. G. Bichet et M. Bouvier (2004). "Pharmacological chaperones: potential treatment for conformational diseases." Trends Endocrinol Metab **15**(5): 222-8.
- Bernier, V., M. Lagace, M. Lonergan, M. F. Arthus, D. G. Bichet et M. Bouvier (2004). "Functional rescue of the constitutively internalized V2 vasopressin receptor mutant R137H by the pharmacological chaperone action of SR49059." Mol Endocrinol **18**(8): 2074-84.
- Bernier, V., J. P. Morello, A. Zarruk, N. Debrand, A. Salahpour, M. Lonergan, M. F. Arthus, A. Laperriere, R. Brouard, M. Bouvier et D. G. Bichet (2006). "Pharmacologic chaperones as a potential treatment for X-linked nephrogenic diabetes insipidus." J Am Soc Nephrol **17**(1): 232-43.

- Bes, D. F., H. Mendilaharsu, R. G. Fenwick et E. Arrizurieta (2007). "Hyponatremia resulting from arginine vasopressin receptor 2 gene mutation." Pediatr Nephrol **22**(3): 463-6.
- Bichet, D. G. (2008). "Vasopressin receptor mutations in nephrogenic diabetes insipidus." Semin Nephrol **28**(3): 245-51.
- Bichet, D. G., M. F. Arthus, M. Lonergan, G. N. Hendy, A. J. Paradis, T. M. Fujiwara, K. Morgan, M. C. Gregory, W. Rosenthal, A. Didwania et et al. (1993). "X-linked nephrogenic diabetes insipidus mutations in North America and the Hopewell hypothesis." J Clin Invest **92**(3): 1262-8.
- Bichet, D. G., M. Birnbaumer, M. Lonergan, M. F. Arthus, W. Rosenthal, P. Goodyer, H. Nivet, S. Benoit, P. Giampietro, S. Simonetti et et al. (1994). "Nature and recurrence of AVPR2 mutations in X-linked nephrogenic diabetes insipidus." Am J Hum Genet **55**(2): 278-86.
- Bichet, D. G., M. Razi, M. F. Arthus, M. Lonergan, P. Tittley, R. K. Smiley, G. Rock et D. J. Hirsch (1989). "Epinephrine and dDAVP administration in patients with congenital nephrogenic diabetes insipidus. Evidence for a pre-cyclic AMP V2 receptor defective mechanism." Kidney Int **36**(5): 859-66.
- Biebermann, H., T. Schoneberg, H. Krude, G. Schultz, T. Gudermann et A. Gruters (1997). "Mutations of the human thyrotropin receptor gene causing thyroid hypoplasia and persistent congenital hypothyroidism." J Clin Endocrinol Metab **82**(10): 3471-80.
- Bielsky, I. F., S. B. Hu, X. Ren, E. F. Terwilliger et L. J. Young (2005). "The V1a vasopressin receptor is necessary and sufficient for normal social recognition: a gene replacement study." Neuron **47**(4): 503-13.
- Birnbaumer, L. et M. Rodbell (1969). "Adenyl cyclase in fat cells. II. Hormone receptors." J Biol Chem **244**(13): 3477-82.
- Birnbaumer, M., A. Antaramian, A. P. Themmen et S. Gilbert (1992). "Desensitization of the human V2 vasopressin receptor. Homologous effects in the absence of heterologous desensitization." J Biol Chem **267**(17): 11783-8.
- Birnbaumer, M., S. Gilbert et W. Rosenthal (1994). "An extracellular congenital nephrogenic diabetes insipidus mutation of the vasopressin receptor reduces cell surface expression, affinity for ligand, and coupling to the Gs/adenylyl cyclase system." Mol Endocrinol **8**(7): 886-94.
- Birnbaumer, M., V. Hinrichs et A. P. Themmen (1990). "Development and characterization of a mouse cell line expressing the human V2 vasopressin receptor gene." Mol Endocrinol **4**(2): 245-54.
- Birnbaumer, M., A. Seibold, S. Gilbert, M. Ishido, C. Barberis, A. Antaramian, P. Brabet et W. Rosenthal (1992). "Molecular cloning of the receptor for human antidiuretic hormone." Nature **357**(6376): 333-5.
- Biswas, C., O. Ostrovsky, C. A. Makarewich, S. Wanderling, T. Gidalevitz et Y. Argon (2007). "The peptide-binding activity of GRP94 is regulated by calcium." Biochem J **405**(2): 233-41.
- Blobel, G. et B. Dobberstein (1975). "Transfer of proteins across membranes. I. Presence of proteolytically processed and unprocessed nascent immunoglobulin light chains on membrane-bound ribosomes of murine myeloma." J Cell Biol **67**(3): 835-51.
- Blobel, G. et B. Dobberstein (1975). "Transfer of proteins across membranes. II. Reconstitution of functional rough microsomes from heterologous components." J Cell Biol **67**(3): 852-62.

- Blobel, G. et D. D. Sabatini (1970). "Controlled proteolysis of nascent polypeptides in rat liver cell fractions. I. Location of the polypeptides within ribosomes." J Cell Biol **45**(1): 130-45.
- Blond-Elguindi, S., S. E. Cwirla, W. J. Dower, R. J. Lipshutz, S. R. Sprang, J. F. Sambrook et M. J. Gething (1993). "Affinity panning of a library of peptides displayed on bacteriophages reveals the binding specificity of BiP." Cell **75**(4): 717-28.
- Bockaert, J., L. Fagni, A. Dumuis et P. Marin (2004). "GPCR interacting proteins (GIP)." Pharmacol Ther **103**(3): 203-21.
- Bockenhauer, D. (2008). Diabetes Insipidus. Comprehensive Pediatric Nephrology. D. F. Geary and F. Schaefer. Philadelphia, Mosby Elsevier: 489-498.
- Bockenhauer, D. (2008). "Diabetes Insipidus. In: Comprehensive Pediatric Nephrology. 1st ed. edited by GEARY, D. F. & SCHAEFER, F." Philadelphia, Mosby Elsevier: 489-498.
- Bockenhauer, D., E. Carpentier, D. Rochdi, W. Van't Hoff, B. Breton, V. Bernier, M. Bouvier et D. G. Bichet (2009). "Vasopressin Type 2 Receptor V88M Mutation: Molecular Basis of Partial and Complete Nephrogenic Diabetes Insipidus." Nephron Physiol **114**(1): p1-p10.
- Bockenhauer, D., M. Cruwys, R. Kleta, L. F. Halperin, P. Wildgoose, T. Souma, N. Nukiwa, S. Cheema-Dhadli, C. K. Chong, K. S. Kamel, M. R. Davids et M. L. Halperin (2008). "Antenatal Bartter's syndrome: why is this not a lethal condition?" Qjm **101**(12): 927-42.
- Bode, H. H. et J. D. Crawford (1969). "Nephrogenic diabetes insipidus in North America. The Hopewell hypothesis." N Engl J Med **280**(14): 750-4.
- Bonilla-Felix, M. (2004). "Development of water transport in the collecting duct." Am J Physiol Renal Physiol **287**(6): F1093-101.
- Borgese, N., M. Francolini et E. Snapp (2006). "Endoplasmic reticulum architecture: structures in flux." Curr Opin Cell Biol **18**(4): 358-64.
- Bowen-Pidgeon, D., G. Innamorati, H. M. Sadeghi et M. Birnbaumer (2001). "Arrestin effects on internalization of vasopressin receptors." Mol Pharmacol **59**(6): 1395-401.
- Bowlus, R. D. et G. N. Somero (1979). "Solute compatibility with enzyme function and structure: rationales for the selection of osmotic agents and end-products of anaerobic metabolism in marine invertebrates." J Exp Zool **208**(2): 137-51.
- Bradbury, F. A., N. Kawate, C. M. Foster et K. M. Menon (1997). "Post-translational processing in the Golgi plays a critical role in the trafficking of the luteinizing hormone/human chorionic gonadotropin receptor to the cell surface." J Biol Chem **272**(9): 5921-6.
- Breton, B., E. Sauvageau, J. Zhou, H. Bonin, C. Le Gouill et M. Bouvier (2010). "Multiplexing of multicolor bioluminescence resonance energy transfer." Biophys J **99**(12): 4037-46.
- Brockmeier, A., U. Brockmeier et D. B. Williams (2009). "Distinct contributions of the lectin and arm domains of calnexin to its molecular chaperone function." J Biol Chem **284**(6): 3433-44.
- Brown, C. R., L. Q. Hong-Brown, J. Biwersi, A. S. Verkman et W. J. Welch (1996). "Chemical chaperones correct the mutant phenotype of the delta F508 cystic fibrosis transmembrane conductance regulator protein." Cell Stress Chaperones **1**(2): 117-25.
- Bucciantini, M., E. Giannoni, F. Chiti, F. Baroni, L. Formigli, J. Zurdo, N. Taddei, G. Ramponi, C. M. Dobson et M. Stefani (2002). "Inherent toxicity of aggregates implies a common mechanism for protein misfolding diseases." Nature **416**(6880): 507-11.
- Burrows, J. A., L. K. Willis et D. H. Perlmutter (2000). "Chemical chaperones mediate increased secretion of mutant alpha 1-antitrypsin (alpha 1-AT) Z: A potential pharmacological

- strategy for prevention of liver injury and emphysema in alpha 1-AT deficiency." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(4): 1796-801.
- Butz, J. A., R. T. Niebauer et A. S. Robinson (2003). "Co-expression of molecular chaperones does not improve the heterologous expression of mammalian G-protein coupled receptor expression in yeast." Biotechnol Bioeng **84**(3): 292-304.
- Cabral, C. M., P. Choudhury, Y. Liu et R. N. Sifers (2000). "Processing by endoplasmic reticulum mannosidases partitions a secretion-impaired glycoprotein into distinct disposal pathways." J Biol Chem **275**(32): 25015-22.
- Caramelo, J. J., O. A. Castro, L. G. Alonso, G. De Prat-Gay et A. J. Parodi (2003). "UDP-Glc:glycoprotein glucosyltransferase recognizes structured and solvent accessible hydrophobic patches in molten globule-like folding intermediates." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(1): 86-91.
- Caramelo, J. J., O. A. Castro, G. de Prat-Gay et A. J. Parodi (2004). "The endoplasmic reticulum glucosyltransferase recognizes nearly native glycoprotein folding intermediates." J Biol Chem **279**(44): 46280-5.
- Cardullo, R. A. (2007). "Theoretical principles and practical considerations for fluorescence resonance energy transfer microscopy." Methods Cell Biol **81**: 479-94.
- Carmosino, M., H. L. Brooks, Q. Cai, L. S. Davis, S. Opalenik, C. Hao et M. D. Breyer (2007). "Axial heterogeneity of vasopressin-receptor subtypes along the human and mouse collecting duct." Am J Physiol Renal Physiol **292**(1): F351-60.
- Caron, M. G., Y. Srinivasan, J. Pitha, K. Kocielek et R. J. Lefkowitz (1979). "Affinity chromatography of the beta-adrenergic receptor." J Biol Chem **254**(8): 2923-7.
- Carrell, R. W. et D. A. Lomas (1997). "Conformational disease." Lancet **350**(9071): 134-8.
- Cerione, R. A., B. Strulovici, J. L. Benovic, C. D. Strader, M. G. Caron et R. J. Lefkowitz (1983). "Reconstitution of beta-adrenergic receptors in lipid vesicles: affinity chromatography-purified receptors confer catecholamine responsiveness on a heterologous adenylate cyclase system." Proc Natl Acad Sci U S A **80**(16): 4899-903.
- Chabardes, D., D. Firsov, L. Aarab, A. Clabecq, A. C. Bellanger, S. Siaume-Perez et J. M. Elalouf (1996). "Localization of mRNAs encoding Ca²⁺-inhibitable adenylyl cyclases along the renal tubule. Functional consequences for regulation of the cAMP content." J Biol Chem **271**(32): 19264-71.
- Champigneulle, A., E. Siga, G. Vassent et M. Imbert-Teboul (1993). "V₂-like vasopressin receptor mobilizes intracellular Ca²⁺ in rat medullary collecting tubules." Am J Physiol **265**(1 Pt 2): F35-45.
- Charest, P. G. et M. Bouvier (2003). "Palmitoylation of the V₂ vasopressin receptor carboxyl tail enhances beta-arrestin recruitment leading to efficient receptor endocytosis and ERK1/2 activation." J Biol Chem **278**(42): 41541-51.
- Charest, P. G., G. Oligny-Longpre, H. Bonin, M. Azzi et M. Bouvier (2007). "The V₂ vasopressin receptor stimulates ERK1/2 activity independently of heterotrimeric G protein signalling." Cell Signal **19**(1): 32-41.
- Chen, J. K., J. Taipale, M. K. Cooper et P. A. Beachy (2002). "Inhibition of Hedgehog signaling by direct binding of cyclopamine to Smoothened." Genes Dev **16**(21): 2743-8.
- Chen, L. et N. G. Davis (2002). "Ubiquitin-independent entry into the yeast recycling pathway." Traffic **3**(2): 110-23.
- Chen, W., J. Helenius, I. Braakman et A. Helenius (1995). "Cotranslational folding and calnexin binding during glycoprotein synthesis." Proc Natl Acad Sci U S A **92**(14): 6229-33.

- Cheng, Z. J. et L. J. Miller (2001). "Agonist-dependent dissociation of oligomeric complexes of G protein-coupled cholecystinin receptors demonstrated in living cells using bioluminescence resonance energy transfer." *J Biol Chem* **276**(51): 48040-7.
- Cherezov, V., D. M. Rosenbaum, M. A. Hanson, S. G. Rasmussen, F. S. Thian, T. S. Kobilka, H. J. Choi, P. Kuhn, W. I. Weis, B. K. Kobilka et R. C. Stevens (2007). "High-resolution crystal structure of an engineered human beta2-adrenergic G protein-coupled receptor." *Science* **318**(5854): 1258-65.
- Chidiac, P., T. E. Hebert, M. Valiquette, M. Dennis et M. Bouvier (1994). "Inverse agonist activity of beta-adrenergic antagonists." *Mol Pharmacol* **45**(3): 490-9.
- Chini, B. et M. Manning (2007). "Agonist selectivity in the oxytocin/vasopressin receptor family: new insights and challenges." *Biochem Soc Trans* **35**(Pt 4): 737-41.
- Chiti, F. et C. M. Dobson (2006). "Protein misfolding, functional amyloid, and human disease." *Annu Rev Biochem* **75**: 333-66.
- Cho, Y. H., S. Gitelman, S. Rosenthal et G. Ambler (2009). "Long-term outcomes in a family with nephrogenic syndrome of inappropriate antidiuresis." *Int J Pediatr Endocrinol* **2009**: 431527.
- Chou, C. L., B. M. Christensen, S. Frische, H. Vorum, R. A. Desai, J. D. Hoffert, P. de Lanerolle, S. Nielsen et M. A. Knepper (2004). "Non-muscle myosin II and myosin light chain kinase are downstream targets for vasopressin signaling in the renal collecting duct." *J Biol Chem* **279**(47): 49026-35.
- Chou, C. L., K. P. Yip, L. Michea, K. Kador, J. D. Ferraris, J. B. Wade et M. A. Knepper (2000). "Regulation of aquaporin-2 trafficking by vasopressin in the renal collecting duct. Roles of ryanodine-sensitive Ca²⁺ stores and calmodulin." *J Biol Chem* **275**(47): 36839-46.
- Christianson, J. C., T. A. Shaler, R. E. Tyler et R. R. Kopito (2008). "OS-9 and GRP94 deliver mutant alpha1-antitrypsin to the Hrd1-SEL1L ubiquitin ligase complex for ERAD." *Nat Cell Biol* **10**(3): 272-82.
- Ciruela, F., M. Escriche, J. Burgueno, E. Angulo, V. Casado, M. M. Soloviev, E. I. Canela, J. Mallol, W. Y. Chan, C. Lluis, R. A. McIlhinney et R. Franco (2001). "Metabotropic glutamate 1alpha and adenosine A1 receptors assemble into functionally interacting complexes." *J Biol Chem* **276**(21): 18345-51.
- Cismowski, M. J., C. Ma, C. Ribas, X. Xie, M. Spruyt, J. S. Lizano, S. M. Lanier et E. Duzic (2000). "Activation of heterotrimeric G-protein signaling by a ras-related protein. Implications for signal integration." *J Biol Chem* **275**(31): 23421-4.
- Colledge, M. et J. D. Scott (1999). "AKAPs: from structure to function." *Trends Cell Biol* **9**(6): 216-21.
- Conn, P. M., A. Ulloa-Aguirre, J. Ito et J. A. Janovick (2007). "G protein-coupled receptor trafficking in health and disease: lessons learned to prepare for therapeutic mutant rescue in vivo." *Pharmacol Rev* **59**(3): 225-50.
- Corbett, E. F., K. M. Michalak, K. Oikawa, S. Johnson, I. D. Campbell, P. Eggleton, C. Kay et M. Michalak (2000). "The conformation of calreticulin is influenced by the endoplasmic reticulum luminal environment." *J Biol Chem* **275**(35): 27177-85.
- Cornea, A., J. A. Janovick, G. Maya-Nunez et P. M. Conn (2001). "Gonadotropin-releasing hormone receptor microaggregation. Rate monitored by fluorescence resonance energy transfer." *J Biol Chem* **276**(3): 2153-8.

- Costagliola, S., T. Sunthorntepvarakul, I. Migeotte, J. Van Sande, A. M. Kajava, S. Refetoff et G. Vassart (1999). "Structure-function relationships of two loss-of-function mutations of the thyrotropin receptor gene." Thyroid **9**(10): 995-1000.
- Crawford, J. D. et H. H. Bode (1975). Disorders of the posterior pituitary in children. Endocrine and Genetic Diseases of Childhood and Adolescence. L. Gardner. Philadelphia, Saunders. 2nd ed.: 126-158.
- Curran, M. E., I. Splawski, K. W. Timothy, G. M. Vincent, E. D. Green et M. T. Keating (1995). "A molecular basis for cardiac arrhythmia: HERG mutations cause long QT syndrome." Cell **80**(5): 795-803.
- Czaczkas, J. W., C. R. Kleeman et M. Koenig (1964). "Physiologic Studies of Antidiuretic Hormone by Its Direct Measurement in Human Plasma." J Clin Invest **43**: 1625-40.
- Czaplewski, C., R. Kazmierkiewicz et J. Ciarkowski (1998). "Molecular modeling of the human vasopressin V2 receptor/agonist complex." J Comput Aided Mol Des **12**(3): 275-87.
- D'Souza-Li, L., B. Yang, L. Canaff, M. Bai, D. A. Hanley, M. Bastepe, S. R. Salisbury, E. M. Brown, D. E. Cole et G. N. Hendy (2002). "Identification and functional characterization of novel calcium-sensing receptor mutations in familial hypocalciuric hypercalcemia and autosomal dominant hypocalcemia." J Clin Endocrinol Metab **87**(3): 1309-18.
- Damke, H., T. Baba, D. E. Warnock et S. L. Schmid (1994). "Induction of mutant dynamin specifically blocks endocytic coated vesicle formation." J Cell Biol **127**(4): 915-34.
- de Bree, F. M. et J. P. Burbach (1998). "Structure-function relationships of the vasopressin prohormone domains." Cell Mol Neurobiol **18**(2): 173-91.
- de Virgilio, M., C. Kitzmuller, E. Schwaiger, M. Klein, G. Kreibich et N. E. Ivessa (1999). "Degradation of a short-lived glycoprotein from the lumen of the endoplasmic reticulum: the role of N-linked glycans and the unfolded protein response." Mol Biol Cell **10**(12): 4059-73.
- deCarvalho, A. C., C. P. Ndi, A. Tsopmo, P. Tane, J. Ayafor, J. D. Connolly et J. L. Teem (2002). "A novel natural product compound enhances cAMP-regulated chloride conductance of cells expressing CFTR[delta]F508." Mol Med **8**(2): 75-87.
- Decaux, G., F. Vandergheynst, Y. Bouko, J. Parma, G. Vassart et C. Vilain (2007). "Nephrogenic syndrome of inappropriate antidiuresis in adults: high phenotypic variability in men and women from a large pedigree." J Am Soc Nephrol **18**(2): 606-12.
- Denning, G. M., M. P. Anderson, J. F. Amara, J. Marshall, A. E. Smith et M. J. Welsh (1992). "Processing of mutant cystic fibrosis transmembrane conductance regulator is temperature-sensitive." Nature **358**(6389): 761-4.
- Diamant, S., N. Eliahu, D. Rosenthal et P. Goloubinoff (2001). "Chemical chaperones regulate molecular chaperones in vitro and in cells under combined salt and heat stresses." J Biol Chem **276**(43): 39586-91.
- DiGiovanni, S. R., S. Nielsen, E. I. Christensen et M. A. Knepper (1994). "Regulation of collecting duct water channel expression by vasopressin in Brattleboro rat." Proc Natl Acad Sci U S A **91**(19): 8984-8.
- Dixon, R. A., B. K. Kobilka, D. J. Strader, J. L. Benovic, H. G. Dohlman, T. Frielle, M. A. Bolanowski, C. D. Bennett, E. Rands, R. E. Diehl, R. A. Mumford, E. E. Slater, I. S. Sigal, M. G. Caron, R. J. Lefkowitz et C. D. Strader (1986). "Cloning of the gene and cDNA for mammalian beta-adrenergic receptor and homology with rhodopsin." Nature **321**(6065): 75-9.

- Dobson, C. M. (1999). "Protein misfolding, evolution and disease." Trends Biochem Sci **24**(9): 329-32.
- Dollins, D. E., J. J. Warren, R. M. Immormino et D. T. Gewirth (2007). "Structures of GRP94-nucleotide complexes reveal mechanistic differences between the hsp90 chaperones." Mol Cell **28**(1): 41-56.
- Dong, C., C. M. Filipeanu, M. T. Duvernay et G. Wu (2007). "Regulation of G protein-coupled receptor export trafficking." Biochim Biophys Acta **1768**(4): 853-70.
- Dong, C., F. Zhou, E. K. Fugetta, C. M. Filipeanu et G. Wu (2008). "Endoplasmic reticulum export of adrenergic and angiotensin II receptors is differentially regulated by Sar1 GTPase." Cell Signal **20**(6): 1035-43.
- Dormer, R. L., R. Derand, C. M. McNeilly, Y. Mettey, L. Bulteau-Pignoux, T. Metaye, J. M. Vierfond, M. A. Gray, L. J. Galiotta, M. R. Morris, M. M. Pereira, I. J. Doull, F. Becq et M. A. McPherson (2001). "Correction of delF508-CFTR activity with benzo(c)quinolizinium compounds through facilitation of its processing in cystic fibrosis airway cells." J Cell Sci **114**(Pt 22): 4073-81.
- Duthey, B., S. Caudron, J. Perroy, B. Bettler, L. Fagni, J. P. Pin et L. Prezeau (2002). "A single subunit (GB2) is required for G-protein activation by the heterodimeric GABA(B) receptor." J Biol Chem **277**(5): 3236-41.
- Earley, L. E. et J. Orloff (1962). "The Mechanism of Antidiuresis Associated with the Administration of Hydrochlorothiazide to Patients with Vasopressin-Resistant Diabetes Insipidus." J Clin Invest **41**(11): 1988-97.
- Ecelbarger, C. A., C. L. Chou, S. J. Lolait, M. A. Knepper et S. R. DiGiovanni (1996). "Evidence for dual signaling pathways for V2 vasopressin receptor in rat inner medullary collecting duct." Am J Physiol **270**(4 Pt 2): F623-33.
- Ecelbarger, C. A., S. Nielsen, B. R. Olson, T. Murase, E. A. Baker, M. A. Knepper et J. G. Verbalis (1997). "Role of renal aquaporins in escape from vasopressin-induced antidiuresis in rat." J Clin Invest **99**(8): 1852-63.
- Egea, P. F., R. M. Stroud et P. Walter (2005). "Targeting proteins to membranes: structure of the signal recognition particle." Curr Opin Struct Biol **15**(2): 213-20.
- Eletto, D., D. Dersh et Y. Argon (2010). "GRP94 in ER quality control and stress responses." Semin Cell Dev Biol **21**(5): 479-85.
- Ellgaard, L. et A. Helenius (2003). "Quality control in the endoplasmic reticulum." Nat Rev Mol Cell Biol **4**(3): 181-91.
- Ellgaard, L., M. Molinari et A. Helenius (1999). "Setting the standards: quality control in the secretory pathway." Science **286**(5446): 1882-8.
- Ellgaard, L., R. Riek, T. Herrmann, P. Guntert, D. Braun, A. Helenius et K. Wuthrich (2001). "NMR structure of the calreticulin P-domain." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(6): 3133-8.
- Erdmann, R. et W. Schliebs (2005). "Peroxisomal matrix protein import: the transient pore model." Nat Rev Mol Cell Biol **6**(9): 738-42.
- Ermonval, M., S. Duvet, D. Zonneveld, R. Cacan, G. Buttin et I. Braakman (2000). "Truncated N-glycans affect protein folding in the ER of CHO-derived mutant cell lines without preventing calnexin binding." Glycobiology **10**(1): 77-87.
- Fagioli, C. et R. Sitia (2001). "Glycoprotein quality control in the endoplasmic reticulum. Mannose trimming by endoplasmic reticulum mannosidase I times the proteasomal degradation of unassembled immunoglobulin subunits." J Biol Chem **276**(16): 12885-92.

- Fan, J. Q. (2008). "A counterintuitive approach to treat enzyme deficiencies: use of enzyme inhibitors for restoring mutant enzyme activity." *Biol Chem* **389**(1): 1-11.
- Fan, J. Q., S. Ishii, N. Asano et Y. Suzuki (1999). "Accelerated transport and maturation of lysosomal alpha-galactosidase A in Fabry lymphoblasts by an enzyme inhibitor." *Nat Med* **5**(1): 112-5.
- Feldman, B. J., S. M. Rosenthal, G. A. Vargas, R. G. Fenwick, E. A. Huang, M. Matsuda-Abedini, R. H. Lustig, R. S. Mathias, A. A. Portale, W. L. Miller et S. E. Gitelman (2005). "Nephrogenic syndrome of inappropriate antidiuresis." *N Engl J Med* **352**(18): 1884-90.
- Filipek, S., D. C. Teller, K. Palczewski et R. Stenkamp (2003). "The crystallographic model of rhodopsin and its use in studies of other G protein-coupled receptors." *Annu Rev Biophys Biomol Struct* **32**: 375-97.
- Finch, A. R., K. R. Sedgley, C. J. Caunt et C. A. McArdle (2008). "Plasma membrane expression of GnRH receptors: regulation by antagonists in breast, prostate, and gonadotrope cell lines." *J Endocrinol* **196**(2): 353-67.
- Fischer, H., N. Fukuda, P. Barbry, B. Illek, C. Sartori et M. A. Matthay (2001). "Partial restoration of defective chloride conductance in DeltaF508 CF mice by trimethylamine oxide." *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **281**(1): L52-7.
- Fluck, C. E., J. W. Martens, F. A. Conte et W. L. Miller (2002). "Clinical, genetic, and functional characterization of adrenocorticotropin receptor mutations using a novel receptor assay." *J Clin Endocrinol Metab* **87**(9): 4318-23.
- Flynn, G. C., J. Pohl, M. T. Flocco et J. E. Rothman (1991). "Peptide-binding specificity of the molecular chaperone BiP." *Nature* **353**(6346): 726-30.
- Forloni, G., L. Terreni, I. Bertani, S. Fogliarino, R. Invernizzi, A. Assini, G. Ribizzi, A. Negro, E. Calabrese, M. A. Volonte, C. Mariani, M. Franceschi, M. Tabaton et A. Bertoli (2002). "Protein misfolding in Alzheimer's and Parkinson's disease: genetics and molecular mechanisms." *Neurobiol Aging* **23**(5): 957-76.
- Forman, M. S., V. M. Lee et J. Q. Trojanowski (2003). "'Unfolding' pathways in neurodegenerative disease." *Trends Neurosci* **26**(8): 407-10.
- Forssmann, H. (1945). "On Hereditary Diabetes Insipidus With Special Regard to a Sex-Linked Form." *Acta Medica Scandinavica* **159**(3): 196.
- Foster, B. A., H. A. Coffey, M. J. Morin et F. Rastinejad (1999). "Pharmacological rescue of mutant p53 conformation and function." *Science* **286**(5449): 2507-10.
- Franco, R., S. Ferre, L. Agnati, M. Torvinen, S. Gines, J. Hillion, V. Casado, P. Lledo, M. Zoli, C. Lluís et K. Fuxe (2000). "Evidence for adenosine/dopamine receptor interactions: indications for heteromerization." *Neuropsychopharmacology* **23**(4 Suppl): S50-9.
- Fredriksson, R., M. C. Lagerstrom, L. G. Lundin et H. B. Schioth (2003). "The G-protein-coupled receptors in the human genome form five main families. Phylogenetic analysis, paralogon groups, and fingerprints." *Mol Pharmacol* **63**(6): 1256-72.
- Frickel, E. M., P. Frei, M. Bouvier, W. F. Stafford, A. Helenius, R. Glockshuber et L. Ellgaard (2004). "ERp57 is a multifunctional thiol-disulfide oxidoreductase." *J Biol Chem* **279**(18): 18277-87.
- Friedlander, M. et G. Blobel (1985). "Bovine opsin has more than one signal sequence." *Nature* **318**(6044): 338-43.

- Frustaci, A., C. Chimenti, R. Ricci, L. Natale, M. A. Russo, M. Pieroni, C. M. Eng et R. J. Desnick (2001). "Improvement in cardiac function in the cardiac variant of Fabry's disease with galactose-infusion therapy." N Engl J Med **345**(1): 25-32.
- Fuchs, S., J. Amiel, S. Claudel, S. Lyonnet, P. Corvol et F. Pinet (2001). "Functional characterization of three mutations of the endothelin B receptor gene in patients with Hirschsprung's disease: evidence for selective loss of Gi coupling." Mol Med **7**(2): 115-24.
- Fujiwara, T. M. et D. G. Bichet (2005). "Molecular biology of hereditary diabetes insipidus." J Am Soc Nephrol **16**(10): 2836-46.
- Fujiwara, T. M., K. Morgan et D. G. Bichet (1995). "Molecular biology of diabetes insipidus." Annu Rev Med **46**: 331-43.
- Fujiyoshi, Y., K. Mitsuoka, B. L. de Groot, A. Philippsen, H. Grubmuller, P. Agre et A. Engel (2002). "Structure and function of water channels." Curr Opin Struct Biol **12**(4): 509-15.
- Fukuda, I., N. Hizuka et K. Takano (2003). "Oral DDAVP is a good alternative therapy for patients with central diabetes insipidus: experience of five-year treatment." Endocr J **50**(4): 437-43.
- Fushimi, K., S. Sasaki et F. Marumo (1997). "Phosphorylation of serine 256 is required for cAMP-dependent regulatory exocytosis of the aquaporin-2 water channel." J Biol Chem **272**(23): 14800-4.
- Gage, R. M., K. A. Kim, T. T. Cao et M. von Zastrow (2001). "A transplantable sorting signal that is sufficient to mediate rapid recycling of G protein-coupled receptors." J Biol Chem **276**(48): 44712-20.
- Galandrin, S., G. Oligny-Longpre et M. Bouvier (2007). "The evasive nature of drug efficacy: implications for drug discovery." Trends Pharmacol Sci **28**(8): 423-30.
- Gales, C., J. J. Van Durm, S. Schaak, S. Pontier, Y. Percherancier, M. Audet, H. Paris et M. Bouvier (2006). "Probing the activation-promoted structural rearrangements in preassembled receptor-G protein complexes." Nat Struct Mol Biol **13**(9): 778-86.
- Galiotta, L. J., M. F. Springsteel, M. Eda, E. J. Niedzinski, K. By, M. J. Haddadin, M. J. Kurth, M. H. Nantz et A. S. Verkman (2001). "Novel CFTR chloride channel activators identified by screening of combinatorial libraries based on flavone and benzoquinolizinium lead compounds." J Biol Chem **276**(23): 19723-8.
- Galvez, T., B. Duthey, J. Kniazeff, J. Blahos, G. Rovelli, B. Bettler, L. Prezeau et J. P. Pin (2001). "Allosteric interactions between GB1 and GB2 subunits are required for optimal GABA(B) receptor function." EMBO J **20**(9): 2152-9.
- Ganong, W. (2005). "Review of Medical Physiology, 22nd edn." LANGE-Science: New-York.
- Gao, H., Y. Sun, Y. Wu, B. Luan, Y. Wang, B. Qu et G. Pei (2004). "Identification of beta-arrestin2 as a G protein-coupled receptor-stimulated regulator of NF-kappaB pathways." Mol Cell **14**(3): 303-17.
- Gavel, Y. et G. von Heijne (1990). "Sequence differences between glycosylated and non-glycosylated Asn-X-Thr/Ser acceptor sites: implications for protein engineering." Protein Eng **3**(5): 433-42.
- Ge, X., H. H. Loh et P. Y. Law (2009). "mu-Opioid receptor cell surface expression is regulated by its direct interaction with Ribophorin I." Mol Pharmacol **75**(6): 1307-16.
- George, C. P., F. H. Messerli, J. Genest, W. Nowaczynski, R. Boucher et M. Kuchel Orofo-Oftaga (1975). "Diurnal variation of plasma vasopressin in man." J Clin Endocrinol Metab **41**(2): 332-8.

- Germain, D. P. (2005). "[Fabry disease : from the discovery of lysosomes to enzyme replacement therapy]." Med Sci (Paris) **21**(11): 5-7.
- Gestwicki, J. E., G. R. Crabtree et I. A. Graef (2004). "Harnessing chaperones to generate small-molecule inhibitors of amyloid beta aggregation." Science **306**(5697): 865-9.
- Ghali, J. K., B. Hamad, U. Yasothan et P. Kirkpatrick (2009). "Tolvaptan." Nat Rev Drug Discov **8**(8): 611-2.
- Gines, S., J. Hillion, M. Torvinen, S. Le Crom, V. Casado, E. I. Canela, S. Rondin, J. Y. Lew, S. Watson, M. Zoli, L. F. Agnati, P. Verniera, C. Lluís, S. Ferre, K. Fuxe et R. Franco (2000). "Dopamine D1 and adenosine A1 receptors form functionally interacting heteromeric complexes." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(15): 8606-11.
- Goldberg, A. L. (1972). "Correlation between rates of degradation of bacterial proteins in vivo and their sensitivity to proteases." Proc Natl Acad Sci U S A **69**(9): 2640-4.
- Gomes, I., B. A. Jordan, A. Gupta, N. Trapaidze, V. Nagy et L. A. Devi (2000). "Heterodimerization of mu and delta opioid receptors: A role in opiate synergy." J Neurosci **20**(22): RC110.
- Gonen, T. et T. Walz (2006). "The structure of aquaporins." Q Rev Biophys **39**(4): 361-96.
- Gong, Q., M. A. Jones et Z. Zhou (2006). "Mechanisms of pharmacological rescue of trafficking-defective hERG mutant channels in human long QT syndrome." J Biol Chem **281**(7): 4069-74.
- Goodman, O. B., Jr., J. G. Krupnick, F. Santini, V. V. Gurevich, R. B. Penn, A. W. Gagnon, J. H. Keen et J. L. Benovic (1996). "Beta-arrestin acts as a clathrin adaptor in endocytosis of the beta2-adrenergic receptor." Nature **383**(6599): 447-50.
- Granell, S., S. Mohammad, R. Ramanagoudr-Bhojappa et G. Baldini (2010). "Obesity-Linked Variants of Melanocortin-4 Receptor Are Misfolded in the Endoplasmic Reticulum and Can Be Rescued to the Cell Surface by a Chemical Chaperone." Mol Endocrinol.
- Grinna, L. S. et P. W. Robbins (1979). "Glycoprotein biosynthesis. Rat liver microsomal glucosidases which process oligosaccharides." J Biol Chem **254**(18): 8814-8.
- Grinna, L. S. et P. W. Robbins (1980). "Substrate specificities of rat liver microsomal glucosidases which process glycoproteins." J Biol Chem **255**(6): 2255-8.
- Gromoll, J., A. Schulz, H. Borta, T. Gudermann, K. J. Teerds, A. Greschniok, E. Nieschlag et F. J. Seif (2002). "Homozygous mutation within the conserved Ala-Phe-Asn-Glu-Thr motif of exon 7 of the LH receptor causes male pseudohermaphroditism." Eur J Endocrinol **147**(5): 597-608.
- Guerin, M. et A. J. Parodi (2003). "The UDP-glucose:glycoprotein glucosyltransferase is organized in at least two tightly bound domains from yeast to mammals." J Biol Chem **278**(23): 20540-6.
- Gupta, S., T. D. Cheetham, H. J. Lambert, C. Roberts, D. Bourn, M. G. Coulthard et S. G. Ball (2009). "Thirst perception and arginine vasopressin production in a kindred with an activating mutation of the type 2 vasopressin receptor: the pathophysiology of nephrogenic syndrome of inappropriate antidiuresis." Eur J Endocrinol **161**(3): 503-8.
- Hackenthal, E., M. Paul, D. Ganten et R. Taugner (1990). "Morphology, physiology, and molecular biology of renin secretion." Physiol Rev **70**(4): 1067-116.
- Halaban, R., E. Cheng, S. Svedine, R. Aron et D. N. Hebert (2001). "Proper folding and endoplasmic reticulum to golgi transport of tyrosinase are induced by its substrates, DOPA and tyrosine." J Biol Chem **276**(15): 11933-8.

- Hall, R. A., R. T. Premont, C. W. Chow, J. T. Blitzer, J. A. Pitcher, A. Claing, R. H. Stoffel, L. S. Barak, S. Shenolikar, E. J. Weinman, S. Grinstein et R. J. Lefkowitz (1998). "The beta2-adrenergic receptor interacts with the Na⁺/H⁺-exchanger regulatory factor to control Na⁺/H⁺ exchange." *Nature* **392**(6676): 626-30.
- Halperin, M. L., D. G. Bichet et M. S. Oh (2001). "Integrative physiology of basal water permeability in the distal nephron: implications for the syndrome of inappropriate secretion of antidiuretic hormone." *Clin Nephrol* **56**(5): 339-45.
- Hamaguchi, K. (1964). "Structure of Muramidase (Lysozyme). 8. Effect of Dimethyl Sulfoxide on the Stability of Muramidase." *J Biochem* **56**: 441-9.
- Hamdan, F. F., M. D. Rochdi, B. Breton, D. Fessart, D. E. Michaud, P. G. Charest, S. A. Laporte et M. Bouvier (2007). "Unraveling G protein-coupled receptor endocytosis pathways using real-time monitoring of agonist-promoted interaction between beta-arrestins and AP-2." *J Biol Chem* **282**(40): 29089-100.
- Hamel, E., C. M. Lin, S. Kenney et P. Skehan (1991). "Highly variable effects of beryllium and beryllium fluoride on tubulin polymerization under different reaction conditions: comparison of assembly reactions dependent on microtubule-associated proteins, glycerol, dimethyl sulfoxide, and glutamate." *Arch Biochem Biophys* **286**(1): 57-69.
- Hammad, M. M. et D. J. Dupre (2010). "Chaperones contribute to G protein coupled receptor oligomerization, but do not participate in assembly of the G protein with the receptor signaling complex." *J Mol Signal* **5**(16): 1-13.
- Hammarstrom, P., R. L. Wiseman, E. T. Powers et J. W. Kelly (2003). "Prevention of transthyretin amyloid disease by changing protein misfolding energetics." *Science* **299**(5607): 713-6.
- Hammond, C., I. Braakman et A. Helenius (1994). "Role of N-linked oligosaccharide recognition, glucose trimming, and calnexin in glycoprotein folding and quality control." *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**(3): 913-7.
- Hammond, C. et A. Helenius (1993). "A chaperone with a sweet tooth." *Curr Biol* **3**(12): 884-6.
- Hannon, M. J. et C. J. Thompson (2010). "The syndrome of inappropriate antidiuretic hormone: prevalence, causes and consequences." *Eur J Endocrinol* **162** Suppl 1: S5-12.
- Hanyaloglu, A. C. et M. von Zastrow (2008). "Regulation of GPCRs by endocytic membrane trafficking and its potential implications." *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **48**: 537-68.
- Hauri, H., C. Appenzeller, F. Kuhn et O. Nufer (2000). "Lectins and traffic in the secretory pathway." *FEBS Lett* **476**(1-2): 32-7.
- Hausdorff, W. P., M. G. Caron et R. J. Lefkowitz (1990). "Turning off the signal: desensitization of beta-adrenergic receptor function." *Faseb J* **4**(11): 2881-9.
- Hazama, A., D. Kozono, W. B. Guggino, P. Agre et M. Yasui (2002). "Ion permeation of AQP6 water channel protein. Single channel recordings after Hg²⁺ activation." *J Biol Chem* **277**(32): 29224-30.
- Hebert, D. N., B. Foellmer et A. Helenius (1995). "Glucose trimming and reglucosylation determine glycoprotein association with calnexin in the endoplasmic reticulum." *Cell* **81**(3): 425-33.
- Hebert, D. N., B. Foellmer et A. Helenius (1996). "Calnexin and calreticulin promote folding, delay oligomerization and suppress degradation of influenza hemagglutinin in microsomes." *Embo J* **15**(12): 2961-8.

- Hebert, D. N., J. X. Zhang, W. Chen, B. Foellmer et A. Helenius (1997). "The number and location of glycans on influenza hemagglutinin determine folding and association with calnexin and calreticulin." *J Cell Biol* **139**(3): 613-23.
- Hebert, R. L., H. R. Jacobson et M. D. Breyer (1990). "PGE2 inhibits AVP-induced water flow in cortical collecting ducts by protein kinase C activation." *Am J Physiol* **259**(2 Pt 2): F318-25.
- Hein, P., M. Frank, C. Hoffmann, M. J. Lohse et M. Bunemann (2005). "Dynamics of receptor/G protein coupling in living cells." *Embo J* **24**(23): 4106-14.
- Helenius, A., Trombetta, E. S., Hebert, D. N. and Simons, J. F (1997). "Calnexin, calreticulin and the folding of glycoproteins." *Trends Cell Biol* **7**(5): 193-200.
- Hellman, R., M. Vanhove, A. Lejeune, F. J. Stevens et L. M. Hendershot (1999). "The in vivo association of BiP with newly synthesized proteins is dependent on the rate and stability of folding and not simply on the presence of sequences that can bind to BiP." *J Cell Biol* **144**(1): 21-30.
- Hendershot, L. M. (2004). "The ER function BiP is a master regulator of ER function." *Mt Sinai J Med* **71**(5): 289-97.
- Hermosilla, R., M. Oueslati, U. Donalies, E. Schonenberger, E. Krause, A. Oksche, W. Rosenthal et R. Schulein (2004). "Disease-causing V(2) vasopressin receptors are retained in different compartments of the early secretory pathway." *Traffic* **5**(12): 993-1005.
- Herscovics, A. (2001). "Structure and function of Class I alpha 1,2-mannosidases involved in glycoprotein synthesis and endoplasmic reticulum quality control." *Biochimie* **83**(8): 757-62.
- Hicke, L. (1999). "Gettin' down with ubiquitin: turning off cell-surface receptors, transporters and channels." *Trends Cell Biol* **9**(3): 107-12.
- High, S., D. Gorlich, M. Wiedmann, T. A. Rapoport et B. Dobberstein (1991). "The identification of proteins in the proximity of signal-anchor sequences during their targeting to and insertion into the membrane of the ER." *J Cell Biol* **113**(1): 35-44.
- Himes, R. H., P. R. Burton et J. M. Gaito (1977). "Dimethyl sulfoxide-induced self-assembly of tubulin lacking associated proteins." *J Biol Chem* **252**(17): 6222-8.
- Hirao, K., Y. Natsuka, T. Tamura, I. Wada, D. Morito, S. Natsuka, P. Romero, B. Sleno, L. O. Tremblay, A. Herscovics, K. Nagata et N. Hosokawa (2006). "EDEM3, a soluble EDEM homolog, enhances glycoprotein endoplasmic reticulum-associated degradation and mannose trimming." *J Biol Chem* **281**(14): 9650-8.
- Hirasawa, A., Y. Nakayama, N. Ishiharada, K. Honda, R. Saito, G. Tsujimoto, Y. Takano et H. Kamiya (1994). "Evidence for the existence of vasopressin V2 receptor mRNA in rat hippocampus." *Biochem Biophys Res Commun* **205**(3): 1702-6.
- Hirsch, A. T., V. J. Dzau, J. A. Majzoub et M. A. Creager (1989). "Vasopressin-mediated forearm vasodilation in normal humans. Evidence for a vascular vasopressin V2 receptor." *J Clin Invest* **84**(2): 418-26.
- Hirsch, C., D. Blom et H. L. Ploegh (2003). "A role for N-glycanase in the cytosolic turnover of glycoproteins." *Embo J* **22**(5): 1036-46.
- Ho, G. et R. G. MacKenzie (1999). "Functional characterization of mutations in melanocortin-4 receptor associated with human obesity." *J Biol Chem* **274**(50): 35816-22.

- Hoffert, J. D., C. L. Chou, R. A. Fenton et M. A. Knepper (2005). "Calmodulin is required for vasopressin-stimulated increase in cyclic AMP production in inner medullary collecting duct." *J Biol Chem* **280**(14): 13624-30.
- Hoffman, B. B. et R. J. Lefkowitz (1982). "Adrenergic receptors in the heart." *Annu Rev Physiol* **44**: 475-84.
- Hollenberg, N. K. et G. H. Williams (1979). "Angiotensin as a renal, adrenal, and cardiovascular hormone: responses to saralasin in normal man and in essential and secondary hypertension." *Kidney Int Suppl*(9): S29-35.
- Holliday, M. A., C. Burstin et J. Harrah (1963). "Evidence That the Antidiuretic Substance in the Plasma of Children with Nephrogenic Diabetes Insipidus Is Antidiuretic Hormone." *Pediatrics* **32**: 384-8.
- Holmes, C. L., D. W. Landry et J. T. Granton (2004). "Science Review: Vasopressin and the cardiovascular system part 2 - clinical physiology." *Crit Care* **8**(1): 15-23.
- Horn, F., J. Weare, M. W. Beukers, S. Horsch, A. Bairoch, W. Chen, O. Edvardsen, F. Campagne et G. Vriend (1998). "GPCRDB: an information system for G protein-coupled receptors." *Nucleic Acids Res* **26**(1): 275-9.
- Horvat, R. D., D. A. Roess, S. E. Nelson, B. G. Barisas et C. M. Clay (2001). "Binding of agonist but not antagonist leads to fluorescence resonance energy transfer between intrinsically fluorescent gonadotropin-releasing hormone receptors." *Mol Endocrinol* **15**(5): 695-703.
- Hosokawa, N., I. Wada, Y. Natsuka et K. Nagata (2006). "EDEEM accelerates ERAD by preventing aberrant dimer formation of misfolded alpha1-antitrypsin." *Genes Cells* **11**(5): 465-76.
- Howard, M. et W. J. Welch (2002). "Manipulating the folding pathway of delta F508 CFTR using chemical chaperones." *Methods Mol Med* **70**: 267-75.
- Huang, E. A., B. J. Feldman, I. D. Schwartz, D. H. Geller, S. M. Rosenthal et S. E. Gitelman (2006). "Oral urea for the treatment of chronic syndrome of inappropriate antidiuresis in children." *J Pediatr* **148**(1): 128-31.
- Hub, J. S. et B. L. de Groot (2008). "Mechanism of selectivity in aquaporins and aquaglyceroporins." *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**(4): 1198-203.
- Hunzicker-Dunn, M., G. Barisas, J. Song et D. A. Roess (2003). "Membrane organization of luteinizing hormone receptors differs between actively signaling and desensitized receptors." *J Biol Chem* **278**(44): 42744-9.
- Husain, M. K., A. G. Frantz, F. Ciarochi et A. G. Robinson (1975). "Nicotine-stimulated release of neurophysin and vasopressin in humans." *J Clin Endocrinol Metab* **41**(06): 1113-7.
- Ihara, Y., M. F. Cohen-Doyle, Y. Saito et D. B. Williams (1999). "Calnexin discriminates between protein conformational states and functions as a molecular chaperone in vitro." *Mol Cell* **4**(3): 331-41.
- Immormino, R. M., D. E. Dollins, P. L. Shaffer, K. L. Soldano, M. A. Walker et D. T. Gewirth (2004). "Ligand-induced conformational shift in the N-terminal domain of GRP94, an Hsp90 chaperone." *J Biol Chem* **279**(44): 46162-71.
- Innamorati, G., H. Sadeghi, A. N. Eberle et M. Birnbaumer (1997). "Phosphorylation of the V2 vasopressin receptor." *J Biol Chem* **272**(4): 2486-92.
- Innamorati, G., H. M. Sadeghi, N. T. Tran et M. Birnbaumer (1998). "A serine cluster prevents recycling of the V2 vasopressin receptor." *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**(5): 2222-6.

- Ishibashi, K. (2009). "New members of mammalian aquaporins: AQP10-AQP12." Handb Exp Pharmacol(190): 251-62.
- Izumi, Y., Y. Nakayama, H. Memetimin, T. Inoue, Y. Kohda, H. Nonoguchi et K. Tomita (2008). "Regulation of V2R transcription by hypertonicity and V1aR-V2R signal interaction." Am J Physiol Renal Physiol **295**(4): F1170-6.
- Izumi, Y., Y. Nakayama, T. Mori, H. Miyazaki, H. Inoue, Y. Kohda, T. Inoue, H. Nonoguchi et K. Tomita (2007). "Downregulation of vasopressin V2 receptor promoter activity via V1a receptor pathway." Am J Physiol Renal Physiol **292**(5): F1418-26.
- Jakob, C. A., P. Burda, J. Roth et M. Aebi (1998). "Degradation of misfolded endoplasmic reticulum glycoproteins in *Saccharomyces cerevisiae* is determined by a specific oligosaccharide structure." J Cell Biol **142**(5): 1223-33.
- Jakobsson, B. et U. Berg (1994). "Effect of hydrochlorothiazide and indomethacin treatment on renal function in nephrogenic diabetes insipidus." Acta Paediatr **83**(5): 522-5.
- Janjua, N. R., T. E. Jonassen, S. Langhoff, K. Thomsen et S. Christensen (2001). "Role of sodium depletion in acute antidiuretic effect of bendroflumethiazide in rats with nephrogenic diabetes insipidus." J Pharmacol Exp Ther **299**(1): 307-13.
- Janovick, J. A., M. Goulet, E. Bush, J. Greer, D. G. Wettlaufer et P. M. Conn (2003). "Structure-activity relations of successful pharmacologic chaperones for rescue of naturally occurring and manufactured mutants of the gonadotropin-releasing hormone receptor." J Pharmacol Exp Ther **305**(2): 608-14.
- Janovick, J. A., G. Maya-Nunez et P. M. Conn (2002). "Rescue of hypogonadotropic hypogonadism-causing and manufactured GnRH receptor mutants by a specific protein-folding template: misrouted proteins as a novel disease etiology and therapeutic target." J Clin Endocrinol Metab **87**(7): 3255-62.
- Janovick, J. A., G. Maya-Nunez, A. Ulloa-Aguirre, I. T. Huhtaniemi, J. A. Dias, P. Verbost et P. M. Conn (2009). "Increased plasma membrane expression of human follicle-stimulating hormone receptor by a small molecule thienopyr(im)idine." Mol Cell Endocrinol **298**(1-2): 84-8.
- Janz, J. M. et D. L. Farrens (2004). "Rhodopsin activation exposes a key hydrophobic binding site for the transducin alpha-subunit C terminus." J Biol Chem **279**(28): 29767-73.
- Jean-Alphonse, F., S. Perkovska, M. C. Frantz, T. Durroux, C. Mejean, D. Morin, S. Loison, D. Bonnet, M. Hibert, B. Mouillac et C. Mendre (2009). "Biased agonist pharmacochaperones of the AVP V2 receptor may treat congenital nephrogenic diabetes insipidus." J Am Soc Nephrol **20**(10): 2190-203.
- Jequier, E. et F. Constant (2009). "Water as an essential nutrient: the physiological basis of hydration." Eur J Clin Nutr **64**(2): 115-23.
- Jin, Y., W. Awad, K. Petrova et L. M. Hendershot (2008). "Regulated release of ERdj3 from unfolded proteins by BiP." EMBO J **27**(21): 2873-82.
- Johnson, A. E. et N. G. Haigh (2000). "The ER translocon and retrotranslocation: is the shift into reverse manual or automatic?" Cell **102**(6): 709-12.
- Johnson, A. E. et M. A. van Waes (1999). "The translocon: a dynamic gateway at the ER membrane." Annu Rev Cell Dev Biol **15**: 799-842.
- Jones, K. A., B. Borowsky, J. A. Tamm, D. A. Craig, M. M. Durkin, M. Dai, W. J. Yao, M. Johnson, C. Gunwaldsen, L. Y. Huang, C. Tang, Q. Shen, J. A. Salon, K. Morse, T. Laz, K. E. Smith, D. Nagarathnam, S. A. Noble, T. A. Branchek et C. Gerald (1998).

- "GABA(B) receptors function as a heteromeric assembly of the subunits GABA(B)R1 and GABA(B)R2." *Nature* **396**(6712): 674-9.
- Jordan, B. A. et L. A. Devi (1999). "G-protein-coupled receptor heterodimerization modulates receptor function." *Nature* **399**(6737): 697-700.
- Jordan, B. A., N. Trapaidze, I. Gomes, R. Nivarthi et L. A. Devi (2001). "Oligomerization of opioid receptors with beta 2-adrenergic receptors: a role in trafficking and mitogen-activated protein kinase activation." *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**(1): 343-8.
- Jung, J. S., G. M. Preston, B. L. Smith, W. B. Guggino et P. Agre (1994). "Molecular structure of the water channel through aquaporin CHIP. The hourglass model." *J Biol Chem* **269**(20): 14648-54.
- Kambouris, M., S. R. Dlouhy, J. A. Trofatter, P. M. Conneally et M. E. Hodes (1988). "Localization of the gene for X-linked nephrogenic diabetes insipidus to Xq28." *Am J Med Genet* **29**(1): 239-46.
- Kamsteeg, E. J., I. Heijnen, C. H. van Os et P. M. Deen (2000). "The subcellular localization of an aquaporin-2 tetramer depends on the stoichiometry of phosphorylated and nonphosphorylated monomers." *J Cell Biol* **151**(4): 919-30.
- Katiyar, S., S. Joshi et W. J. Lennarz (2005). "The retrotranslocation protein Derlin-1 binds peptide:N-glycanase to the endoplasmic reticulum." *Mol Biol Cell* **16**(10): 4584-94.
- Kato, Y., N. Igarashi, A. Hirasawa, G. Tsujimoto et M. Kobayashi (1995). "Distribution and developmental changes in vasopressin V2 receptor mRNA in rat brain." *Differentiation* **59**(3): 163-9.
- Katsura, T., C. E. Gustafson, D. A. Ausiello et D. Brown (1997). "Protein kinase A phosphorylation is involved in regulated exocytosis of aquaporin-2 in transfected LLC-PK1 cells." *Am J Physiol* **272**(6 Pt 2): F817-22.
- Katzmann, D. J., G. Odorizzi et S. D. Emr (2002). "Receptor downregulation and multivesicular-body sorting." *Nat Rev Mol Cell Biol* **3**(12): 893-905.
- Kaupmann, K., B. Malitschek, V. Schuler, J. Heid, W. Froestl, P. Beck, J. Mosbacher, S. Bischoff, A. Kulik, R. Shigemoto, A. Karschin et B. Bettler (1998). "GABA(B)-receptor subtypes assemble into functional heteromeric complexes." *Nature* **396**(6712): 683-7.
- Kenakin, T. (2001). "Inverse, protean, and ligand-selective agonism: matters of receptor conformation." *Faseb J* **15**(3): 598-611.
- Khelashvili, G., K. Dorff, J. Shan, M. Camacho-Artacho, L. Skrabanek, B. Vroiling, M. Bouvier, L. A. Devi, S. R. George, J. A. Javitch, M. J. Lohse, G. Milligan, R. R. Neubig, K. Palczewski, M. Parmentier, J. P. Pin, G. Vriend, F. Campagne et M. Filizola (2010). "GPCR-OKB: The G Protein Coupled Receptor Oligomer Knowledge Base." *Bioinformatics*.
- Kim, B. E., K. Smith, C. K. Meagher et M. J. Petris (2002). "A conditional mutation affecting localization of the Menkes disease copper ATPase. Suppression by copper supplementation." *J Biol Chem* **277**(46): 44079-84.
- Kishore, B. K., S. M. Ginns, C. M. Krane, S. Nielsen et M. A. Knepper (2000). "Cellular localization of P2Y(2) purinoceptor in rat renal inner medulla and lung." *Am J Physiol Renal Physiol* **278**(1): F43-51.
- Kishore, B. K., R. D. Nelson, R. L. Miller, N. G. Carlson et D. E. Kohan (2009). "P2Y(2) receptors and water transport in the kidney." *Purinergic Signal* **5**(4): 491-9.

- Klein, U., C. Muller, P. Chu, M. Birnbaumer et M. von Zastrow (2001). "Heterologous inhibition of G protein-coupled receptor endocytosis mediated by receptor-specific trafficking of beta-arrestins." *J Biol Chem* **276**(20): 17442-7.
- Klussmann, E., K. Maric, B. Wiesner, M. Beyermann et W. Rosenthal (1999). "Protein kinase A anchoring proteins are required for vasopressin-mediated translocation of aquaporin-2 into cell membranes of renal principal cells." *J Biol Chem* **274**(8): 4934-8.
- Klussmann, E. et W. Rosenthal (2001). "Role and identification of protein kinase A anchoring proteins in vasopressin-mediated aquaporin-2 translocation." *Kidney Int* **60**(2): 446-9.
- Knoers, N., H. van der Heyden, B. A. van Oost, H. H. Ropers, L. Monnens et J. Willems (1988). "Nephrogenic diabetes insipidus: close linkage with markers from the distal long arm of the human X chromosome." *Hum Genet* **80**(1): 31-8.
- Knop, M., A. Finger, T. Braun, K. Hellmuth et D. H. Wolf (1996). "Der1, a novel protein specifically required for endoplasmic reticulum degradation in yeast." *Embo J* **15**(4): 753-63.
- Kocan, M., H. B. See, N. G. Sampaio, K. A. Eidne, B. J. Feldman et K. D. Pflieger (2009). "Agonist-independent interactions between beta-arrestins and mutant vasopressin type II receptors associated with nephrogenic syndrome of inappropriate antidiuresis." *Mol Endocrinol* **23**(4): 559-71.
- Kocan, M., H. B. See, N. G. Sampaio, K. A. Eidne, B. J. Feldman et K. D. Pflieger (2009). "Mutant vasopressin type II receptors associated with nephrogenic syndrome of inappropriate antidiuresis interact with {beta}-arrestin in an agonist-independent manner." *Mol Endocrinol*.
- Kocan, M., H. B. See, R. M. Seeber, K. A. Eidne et K. D. Pflieger (2008). "Demonstration of improvements to the bioluminescence resonance energy transfer (BRET) technology for the monitoring of G protein-coupled receptors in live cells." *J Biomol Screen* **13**(9): 888-98.
- Kohan, D. E. et E. Padilla (1993). "Osmolar regulation of endothelin-1 production by rat inner medullary collecting duct." *J Clin Invest* **91**(3): 1235-40.
- Kohan, D. E., E. Padilla et A. K. Hughes (1993). "Endothelin B receptor mediates ET-1 effects on cAMP and PGE2 accumulation in rat IMCD." *Am J Physiol* **265**(5 Pt 2): F670-6.
- Kopito, R. R. (1999). "Biosynthesis and degradation of CFTR." *Physiol Rev* **79**(1 Suppl): S167-73.
- Kornfeld, R. et S. Kornfeld (1985). "Assembly of asparagine-linked oligosaccharides." *Annu Rev Biochem* **54**: 631-64.
- Korth, C., B. C. May, F. E. Cohen et S. B. Prusiner (2001). "Acridine and phenothiazine derivatives as pharmacotherapeutics for prion disease." *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**(17): 9836-41.
- Kovoor, A., V. Nappay, B. L. Kieffer et C. Chavkin (1997). "Mu and delta opioid receptors are differentially desensitized by the coexpression of beta-adrenergic receptor kinase 2 and beta-arrestin 2 in xenopus oocytes." *J Biol Chem* **272**(44): 27605-11.
- Krieg, U. C., A. E. Johnson et P. Walter (1989). "Protein translocation across the endoplasmic reticulum membrane: identification by photocross-linking of a 39-kD integral membrane glycoprotein as part of a putative translocation tunnel." *J Cell Biol* **109**(5): 2033-43.
- Krijnse-Locker, J., R. G. Parton, S. D. Fuller, G. Griffiths et C. G. Dotti (1995). "The organization of the endoplasmic reticulum and the intermediate compartment in cultured rat hippocampal neurons." *Mol Biol Cell* **6**(10): 1315-32.

- Kroeger, K. M., A. C. Hanyaloglu, R. M. Seeber, L. E. Miles et K. A. Eidne (2001). "Constitutive and agonist-dependent homo-oligomerization of the thyrotropin-releasing hormone receptor. Detection in living cells using bioluminescence resonance energy transfer." *J Biol Chem* **276**(16): 12736-43.
- Krupnick, J. G. et J. L. Benovic (1998). "The role of receptor kinases and arrestins in G protein-coupled receptor regulation." *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **38**: 289-319.
- Kurland, C. G. (1992). "Translational accuracy and the fitness of bacteria." *Annu Rev Genet* **26**: 29-50.
- Lai, H. L., T. H. Yang, R. O. Messing, Y. H. Ching, S. C. Lin et Y. Chern (1997). "Protein kinase C inhibits adenylyl cyclase type VI activity during desensitization of the A2a-adenosine receptor-mediated cAMP response." *J Biol Chem* **272**(8): 4970-7.
- Lanctot, P. M., P. C. Leclerc, E. Escher, G. Guillemette et R. Leduc (2006). "Role of N-glycan-dependent quality control in the cell-surface expression of the AT1 receptor." *Biochem Biophys Res Commun* **340**(2): 395-402.
- Lande, M. B., I. Jo, M. L. Zeidel, M. Somers et H. W. Harris, Jr. (1996). "Phosphorylation of aquaporin-2 does not alter the membrane water permeability of rat papillary water channel-containing vesicles." *J Biol Chem* **271**(10): 5552-7.
- Lang, F. et S. Waldegger (1997). "Regulating cell volume." *Am Scientist* **85**: 456-63.
- Laporte, S. A., R. H. Oakley, J. Zhang, J. A. Holt, S. S. Ferguson, M. G. Caron et L. S. Barak (1999). "The beta2-adrenergic receptor/betaarrestin complex recruits the clathrin adaptor AP-2 during endocytosis." *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**(7): 3712-7.
- Latif, R., P. Graves et T. F. Davies (2002). "Ligand-dependent inhibition of oligomerization at the human thyrotropin receptor." *J Biol Chem* **277**(47): 45059-67.
- Le, A., K. S. Graham et R. N. Sifers (1990). "Intracellular degradation of the transport-impaired human PiZ alpha 1-antitrypsin variant. Biochemical mapping of the degradative event among compartments of the secretory pathway." *J Biol Chem* **265**(23): 14001-7.
- Le Hir, M. et B. Kaissling (1993). "Distribution and regulation of renal ecto-5'-nucleotidase: implications for physiological functions of adenosine." *Am J Physiol* **264**(3 Pt 2): F377-87.
- Leandro, P., M. C. Lechner, I. Tavares de Almeida et D. Konecki (2001). "Glycerol increases the yield and activity of human phenylalanine hydroxylase mutant enzymes produced in a prokaryotic expression system." *Mol Genet Metab* **73**(2): 173-8.
- Lee, F. J., S. Xue, L. Pei, B. Vukusic, N. Chery, Y. Wang, Y. T. Wang, H. B. Niznik, X. M. Yu et F. Liu (2002). "Dual regulation of NMDA receptor functions by direct protein-protein interactions with the dopamine D1 receptor." *Cell* **111**(2): 219-30.
- Lefkowitz, R. J. (2007). "Seven transmembrane receptors: a brief personal retrospective." *Biochim Biophys Acta* **1768**(4): 748-55.
- Lefkowitz, R. J., S. Cotecchia, P. Samama et T. Costa (1993). "Constitutive activity of receptors coupled to guanine nucleotide regulatory proteins." *Trends Pharmacol Sci* **14**(8): 303-7.
- Leinekugel, P., S. Michel, E. Conzelmann et K. Sandhoff (1992). "Quantitative correlation between the residual activity of beta-hexosaminidase A and arylsulfatase A and the severity of the resulting lysosomal storage disease." *Hum Genet* **88**(5): 513-23.
- Leskela, T. T., P. M. Markkanen, E. M. Pietila, J. T. Tuusa et U. E. Petaja-Repo (2007). "Opioid receptor pharmacological chaperones act by binding and stabilizing newly synthesized receptors in the endoplasmic reticulum." *J Biol Chem* **282**(32): 23171-83.

- Li, Z., W. F. Stafford et M. Bouvier (2001). "The metal ion binding properties of calreticulin modulate its conformational flexibility and thermal stability." Biochemistry **40**(37): 11193-201.
- Lilley, B. N. et H. L. Ploegh (2004). "A membrane protein required for dislocation of misfolded proteins from the ER." Nature **429**(6994): 834-40.
- Lilley, B. N. et H. L. Ploegh (2005). "Multiprotein complexes that link dislocation, ubiquitination, and extraction of misfolded proteins from the endoplasmic reticulum membrane." Proc Natl Acad Sci U S A **102**(40): 14296-301.
- Lim, N. F., N. Dascal, C. Labarca, N. Davidson et H. A. Lester (1995). "A G protein-gated K channel is activated via beta 2-adrenergic receptors and G beta gamma subunits in *Xenopus* oocytes." J Gen Physiol **105**(3): 421-39.
- Lippincott-Schwartz, J., J. S. Bonifacio, L. C. Yuan et R. D. Klausner (1988). "Degradation from the endoplasmic reticulum: disposing of newly synthesized proteins." Cell **54**(2): 209-20.
- Liu, F., Q. Wan, Z. B. Pristupa, X. M. Yu, Y. T. Wang et H. B. Niznik (2000). "Direct protein-protein coupling enables cross-talk between dopamine D5 and gamma-aminobutyric acid A receptors." Nature **403**(6767): 274-80.
- Liu, Y., P. Choudhury, C. M. Cabral et R. N. Sifers (1999). "Oligosaccharide modification in the early secretory pathway directs the selection of a misfolded glycoprotein for degradation by the proteasome." J Biol Chem **274**(9): 5861-7.
- Lohse, M. J., J. L. Benovic, J. Codina, M. G. Caron et R. J. Lefkowitz (1990). "beta-Arrestin: a protein that regulates beta-adrenergic receptor function." Science **248**(4962): 1547-50.
- Lolait, S. J., A. M. O'Carroll, O. W. McBride, M. Konig, A. Morel et M. J. Brownstein (1992). "Cloning and characterization of a vasopressin V2 receptor and possible link to nephrogenic diabetes insipidus." Nature **357**(6376): 336-9.
- Loo, T. W. et D. M. Clarke (1997). "Correction of defective protein kinesis of human P-glycoprotein mutants by substrates and modulators." J Biol Chem **272**(2): 709-12.
- Loo, T. W. et D. M. Clarke (1999). "Determining the structure and mechanism of the human multidrug resistance P-glycoprotein using cysteine-scanning mutagenesis and thiol-modification techniques." Biochim Biophys Acta **1461**(2): 315-25.
- Lu, M., F. Echeverri et B. D. Moyer (2003). "Endoplasmic reticulum retention, degradation, and aggregation of olfactory G-protein coupled receptors." Traffic **4**(6): 416-33.
- Luder, J. et D. Burnett (1954). "A congenital renal tubular defect." Arch Dis Child **29**(143): 44-7.
- Luttrell, L. M., S. S. Ferguson, Y. Daaka, W. E. Miller, S. Maudsley, G. J. Della Rocca, F. Lin, H. Kawakatsu, K. Owada, D. K. Luttrell, M. G. Caron et R. J. Lefkowitz (1999). "Beta-arrestin-dependent formation of beta2 adrenergic receptor-Src protein kinase complexes." Science **283**(5402): 655-61.
- Macer, D. R. et G. L. Koch (1988). "Identification of a set of calcium-binding proteins in reticuloplasm, the luminal content of the endoplasmic reticulum." J Cell Sci **91** (Pt 1): 61-70.
- Maeda, Y., J. S. Han, C. C. Gibson et M. A. Knepper (1993). "Vasopressin and oxytocin receptors coupled to Ca²⁺ mobilization in rat inner medullary collecting duct." Am J Physiol **265**(1 Pt 2): F15-25.

- Maeda, Y., B. L. Smith, P. Agre et M. A. Knepper (1995). "Quantification of Aquaporin-CHIP water channel protein in microdissected renal tubules by fluorescence-based ELISA." J Clin Invest **95**(1): 422-8.
- Maggio, R., P. Barbier, A. Colelli, F. Salvadori, G. Demontis et G. U. Corsini (1999). "G protein-linked receptors: pharmacological evidence for the formation of heterodimers." J Pharmacol Exp Ther **291**(1): 251-7.
- Mancini, R., M. Aebi et A. Helenius (2003). "Multiple endoplasmic reticulum-associated pathways degrade mutant yeast carboxypeptidase Y in mammalian cells." J Biol Chem **278**(47): 46895-905.
- Marcialis, M. A., V. Faa, V. Fanos, M. Puddu, M. C. Pintus, A. Cao et M. C. Rosatelli (2008). "Neonatal onset of nephrogenic syndrome of inappropriate antidiuresis." Pediatr Nephrol **23**(12): 2267-71.
- Margeta-Mitrovic, M., Y. N. Jan et L. Y. Jan (2000). "A trafficking checkpoint controls GABA(B) receptor heterodimerization." Neuron **27**(1): 97-106.
- Markkanen, P. M. et U. E. Petaja-Repo (2008). "N-glycan-mediated quality control in the endoplasmic reticulum is required for the expression of correctly folded delta opioid receptors at the cell surface." J Biol Chem.
- Marples, D., M. A. Knepper, E. I. Christensen et S. Nielsen (1995). "Redistribution of aquaporin-2 water channels induced by vasopressin in rat kidney inner medullary collecting duct." Am J Physiol **269**(3 Pt 1): C655-64.
- Marquardt, T., D. N. Hebert et A. Helenius (1993). "Post-translational folding of influenza hemagglutinin in isolated endoplasmic reticulum-derived microsomes." J Biol Chem **268**(26): 19618-25.
- Martens, J. W., S. Lumbroso, M. Verhoef-Post, V. Georget, A. Richter-Unruh, M. Szarras-Czapnik, T. E. Romer, H. G. Brunner, A. P. Themmen et C. Sultan (2002). "Mutant luteinizing hormone receptors in a compound heterozygous patient with complete Leydig cell hypoplasia: abnormal processing causes signaling deficiency." J Clin Endocrinol Metab **87**(6): 2506-13.
- Martinez, M. C., J. M. Vila, M. Aldasoro, P. Medina, B. Flor et S. Lluch (1994). "Relaxation of human isolated mesenteric arteries by vasopressin and desmopressin." Br J Pharmacol **113**(2): 419-24.
- Maurel, P. (1978). "Relevance of dielectric constant and solvent hydrophobicity to the organic solvent effect in enzymology." J Biol Chem **253**(5): 1677-83.
- Mayer, M., J. Reinstein et J. Buchner (2003). "Modulation of the ATPase cycle of BiP by peptides and proteins." J Mol Biol **330**(1): 137-44.
- Mayer, M. P. et B. Bukau (2005). "Hsp70 chaperones: cellular functions and molecular mechanism." Cell Mol Life Sci **62**(6): 670-84.
- McIlraith, C. H. (1892). "Notes on Some Cases of Diabetes Insipidus with Marked Family and Hereditary Tendencies." The Lancet(ii): 767-68.
- McPherson, M. A., M. M. Pereira, D. Russell, C. M. McNeilly, R. M. Morris, F. L. Stratford et R. L. Dormer (2001). "The CFTR-mediated protein secretion defect: pharmacological correction." Pflugers Arch **443 Suppl 1**: S121-6.
- Meduri, G., P. Touraine, I. Beau, O. Lahuna, A. Desroches, M. C. Vacher-Lavenu, F. Kuttann et M. Misrahi (2003). "Delayed puberty and primary amenorrhea associated with a novel mutation of the human follicle-stimulating hormone receptor: clinical, histological, and molecular studies." J Clin Endocrinol Metab **88**(8): 3491-8.

- Meikle, P. J., J. J. Hopwood, A. E. Clague et W. F. Carey (1999). "Prevalence of lysosomal storage disorders." JAMA **281**(3): 249-54.
- Mellado, M., J. M. Rodriguez-Frade, A. J. Vila-Coro, S. Fernandez, A. Martin de Ana, D. R. Jones, J. L. Toran et A. C. Martinez (2001). "Chemokine receptor homo- or heterodimerization activates distinct signaling pathways." Embo J **20**(10): 2497-507.
- Memetimin, H., Y. Izumi, Y. Nakayama, Y. Kohda, H. Inoue, H. Nonoguchi et K. Tomita (2009). "Low pH stimulates vasopressin V2 receptor promoter activity and enhances downregulation induced by V1a receptor stimulation." Am J Physiol Renal Physiol **297**(3): F620-8.
- Menard, J., J. Bouhnik, E. Clouser, J. P. Richoux et P. Corvol (1983). "Biochemistry and regulation of angiotensinogen." Clin Exp Hypertens A **5**(7-8): 1005-19.
- Mendre, C. et B. Mouillac (2010). "[Pharmacological chaperones: a potential therapeutic treatment for conformational diseases]." Med Sci (Paris) **26**(6-7): 627-35.
- Mervine, S. M., E. A. Yost, J. L. Sabo, T. R. Hynes et C. H. Berlot (2006). "Analysis of G protein betagamma dimer formation in live cells using multicolor bimolecular fluorescence complementation demonstrates preferences of beta1 for particular gamma subunits." Mol Pharmacol **70**(1): 194-205.
- Michlig, S., A. Mercier, A. Doucet, L. Schild, J. D. Horisberger, B. C. Rossier et D. Firsov (2004). "ERK1/2 controls Na,K-ATPase activity and transepithelial sodium transport in the principal cell of the cortical collecting duct of the mouse kidney." J Biol Chem **279**(49): 51002-12.
- Miegel, A., K. I. Sano, K. Yamamoto, K. Maeda, Y. Maeda, H. Taniguchi, M. Yao et S. Wakatsuki (1996). "Production and crystallization of lobster muscle tropomyosin expressed in Sf9 cells." FEBS Lett **394**(2): 201-5.
- Migeon, B. R. (2008). "X inactivation, female mosaicism, and sex differences in renal diseases." J Am Soc Nephrol **19**(11): 2052-9.
- Milligan, G. et E. Kostenis (2006). "Heterotrimeric G-proteins: a short history." Br J Pharmacol **147 Suppl 1**: S46-55.
- Misselwitz, B., O. Staack et T. A. Rapoport (1998). "J proteins catalytically activate Hsp70 molecules to trap a wide range of peptide sequences." Mol Cell **2**(5): 593-603.
- Mizrachi, D. et D. L. Segaloff (2004). "Intracellularly located misfolded glycoprotein hormone receptors associate with different chaperone proteins than their cognate wild-type receptors." Mol Endocrinol **18**(7): 1768-77.
- Molinari, M. (2007). "N-glycan structure dictates extension of protein folding or onset of disposal." Nat Chem Biol **3**(6): 313-20.
- Molinari, M., V. Calanca, C. Galli, P. Lucca et P. Paganetti (2003). "Role of EDEM in the release of misfolded glycoproteins from the calnexin cycle." Science **299**(5611): 1397-400.
- Molinari, M., C. Galli, V. Piccaluga, M. Pieren et P. Paganetti (2002). "Sequential assistance of molecular chaperones and transient formation of covalent complexes during protein degradation from the ER." J Cell Biol **158**(2): 247-57.
- Molinari, M. et A. Helenius (2000). "Chaperone selection during glycoprotein translocation into the endoplasmic reticulum." Science **288**(5464): 331-3.
- Monk, M. et M. I. Harper (1979). "Sequential X chromosome inactivation coupled with cellular differentiation in early mouse embryos." Nature **281**(5729): 311-3.

- Morello, J. P. et D. G. Bichet (2001). "Nephrogenic diabetes insipidus." *Annu Rev Physiol* **63**: 607-30.
- Morello, J. P., U. E. Petaja-Repo, D. G. Bichet et M. Bouvier (2000). "Pharmacological chaperones: a new twist on receptor folding." *Trends Pharmacol Sci* **21**(12): 466-9.
- Morello, J. P., A. Salahpour, A. Laperriere, V. Bernier, M. F. Arthus, M. Lonergan, U. Petaja-Repo, S. Angers, D. Morin, D. G. Bichet et M. Bouvier (2000). "Pharmacological chaperones rescue cell-surface expression and function of misfolded V2 vasopressin receptor mutants." *J Clin Invest* **105**(7): 887-95.
- Morello, J. P., A. Salahpour, U. E. Petaja-Repo, A. Laperriere, M. Lonergan, M. F. Arthus, I. R. Nabi, D. G. Bichet et M. Bouvier (2001). "Association of calnexin with wild type and mutant AVPR2 that causes nephrogenic diabetes insipidus." *Biochemistry* **40**(23): 6766-75.
- Morin, D., N. Cotte, M. N. Balestre, B. Mouillac, M. Manning, C. Breton et C. Barberis (1998). "The D136A mutation of the V2 vasopressin receptor induces a constitutive activity which permits discrimination between antagonists with partial agonist and inverse agonist activities." *FEBS Lett* **441**(3): 470-5.
- Moyer, B. D., B. B. Allan et W. E. Balch (2001). "Rab1 interaction with a GM130 effector complex regulates COPII vesicle cis--Golgi tethering." *Traffic* **2**(4): 268-76.
- Nadal, M. (1996). "Secretory rhythm of vasopressin in healthy subjects with inversed sleep--wake cycle: evidence for the existence of an intrinsic regulation." *Eur J Endocrinol* **134**(2): 174-6.
- Naitoh, M., H. Suzuki, M. Murakami, A. Matsumoto, A. Ichihara, H. Nakamoto, Y. Yamamura et T. Saruta (1993). "Arginine vasopressin produces renal vasodilation via V2 receptors in conscious dogs." *Am J Physiol* **265**(4 Pt 2): R934-42.
- Nakamura, K., A. Zuppini, S. Arnaudeau, J. Lynch, I. Ahsan, R. Krause, S. Papp, H. De Smedt, J. B. Parys, W. Muller-Esterl, D. P. Lew, K. H. Krause, N. Demaurex, M. Opas et M. Michalak (2001). "Functional specialization of calreticulin domains." *J Cell Biol* **154**(5): 961-72.
- Nakatsukasa, K. et J. L. Brodsky (2008). "The recognition and retrotranslocation of misfolded proteins from the endoplasmic reticulum." *Traffic* **9**(6): 861-70.
- Nakatsukasa, K., G. Huyer, S. Michaelis et J. L. Brodsky (2008). "Dissecting the ER-associated degradation of a misfolded polytopic membrane protein." *Cell* **132**(1): 101-12.
- Naruse, M., K. Yoshitomi, K. Hanaoka, M. Imai et K. Kurokawa (1995). "Electrophysiological study of luminal and basolateral vasopressin in rabbit cortical collecting duct." *Am J Physiol* **268**(1 Pt 2): F20-9.
- Nemoto, T., T. Matsusaka, M. Ota, T. Takagi, D. B. Collinge et H. Walther-Larsen (1996). "Dimerization characteristics of the 94-kDa glucose-regulated protein." *J Biochem* **120**(2): 249-56.
- Neves, S. R., P. T. Ram et R. Iyengar (2002). "G protein pathways." *Science* **296**(5573): 1636-9.
- Ng, K. K. et J. R. Vane (1967). "Conversion of angiotensin I to angiotensin II." *Nature* **216**(5117): 762-6.
- Ninio, J. (1991). "Transient mutators: a semiquantitative analysis of the influence of translation and transcription errors on mutation rates." *Genetics* **129**(3): 957-62.
- Nomura, Y., K. Onigata, T. Nagashima, S. Yutani, H. Mochizuki, K. Nagashima et A. Morikawa (1997). "Detection of skewed X-inactivation in two female carriers of vasopressin type 2 receptor gene mutation." *J Clin Endocrinol Metab* **82**(10): 3434-7.

- Noorwez, S. M., V. Kuksa, Y. Imanishi, L. Zhu, S. Filipek, K. Palczewski et S. Kaushal (2003). "Pharmacological chaperone-mediated in vivo folding and stabilization of the P23H-opsin mutant associated with autosomal dominant retinitis pigmentosa." J Biol Chem **278**(16): 14442-50.
- Northup, J. K., M. D. Smigel, P. C. Sternweis et A. G. Gilman (1983). "The subunits of the stimulatory regulatory component of adenylate cyclase. Resolution of the activated 45,000-dalton (alpha) subunit." J Biol Chem **258**(18): 11369-76.
- Oakley, R. H., S. A. Laporte, J. A. Holt, L. S. Barak et M. G. Caron (1999). "Association of beta-arrestin with G protein-coupled receptors during clathrin-mediated endocytosis dictates the profile of receptor resensitization." J Biol Chem **274**(45): 32248-57.
- Okamura, T., M. Toda, K. Ayajiki et N. Toda (1997). "Receptor subtypes involved in relaxation and contraction by arginine vasopressin in canine isolated short posterior ciliary arteries." J Vasc Res **34**(6): 464-72.
- Okumiya, T., M. A. Kroos, L. V. Vliet, H. Takeuchi, A. T. Van der Ploeg et A. J. Reuser (2007). "Chemical chaperones improve transport and enhance stability of mutant alpha-glucosidases in glycogen storage disease type II." Mol Genet Metab **90**(1): 49-57.
- Olivari, S., T. Cali, K. E. Salo, P. Paganetti, L. W. Ruddock et M. Molinari (2006). "EDEMI1 regulates ER-associated degradation by accelerating de-mannosylation of folding-defective polypeptides and by inhibiting their covalent aggregation." Biochem Biophys Res Commun **349**(4): 1278-84.
- Oliver, G. et E. A. Schafer (1895). "On the physiological action of extracts of pituitary body and certain other glandular organs: preliminary communication." The Journal of Physiology **18**(3): 277-279.
- Oshikawa, S., A. Tanoue, T. A. Koshimizu, Y. Kitagawa et G. Tsujimoto (2004). "Vasopressin stimulates insulin release from islet cells through V1b receptors: a combined pharmacological/knockout approach." Mol Pharmacol **65**(3): 623-9.
- Otero, J. H., B. Lizak et L. M. Hendershot (2010). "Life and death of a BiP substrate." Semin Cell Dev Biol **21**(5): 472-8.
- Ou, W. J., J. J. Bergeron, Y. Li, C. Y. Kang et D. Y. Thomas (1995). "Conformational changes induced in the endoplasmic reticulum luminal domain of calnexin by Mg-ATP and Ca²⁺." J Biol Chem **270**(30): 18051-9.
- Overton, M. C. et K. J. Blumer (2000). "G-protein-coupled receptors function as oligomers in vivo." Curr Biol **10**(6): 341-4.
- Paganelli, C. V. et A. K. Solomon (1957). "The rate of exchange of tritiated water across the human red cell membrane." J Gen Physiol **41**(2): 259-77.
- Palade, G. (1975). "Intracellular Aspects of the Process of Protein Synthesis." Science **189**(4206): 867.
- Palczewski, K., T. Kumasaka, T. Hori, C. A. Behnke, H. Motoshima, B. A. Fox, I. Le Trong, D. C. Teller, T. Okada, R. E. Stenkamp, M. Yamamoto et M. Miyano (2000). "Crystal structure of rhodopsin: A G protein-coupled receptor." Science **289**(5480): 739-45.
- Palmer, T. M. et G. L. Stiles (1997). "Structure-function analysis of inhibitory adenosine receptor regulation." Neuropharmacology **36**(9): 1141-7.
- Pan, Y., A. Metzenberg, S. Das, B. Jing et J. Gitschier (1992). "Mutations in the V2 vasopressin receptor gene are associated with X-linked nephrogenic diabetes insipidus." Nat Genet **2**(2): 103-6.

- Partridge, C. J., D. J. Beech et A. Sivaprasadarao (2001). "Identification and pharmacological correction of a membrane trafficking defect associated with a mutation in the sulfonylurea receptor causing familial hyperinsulinism." *J Biol Chem* **276**(38): 35947-52.
- Patel, R. C., U. Kumar, D. C. Lamb, J. S. Eid, M. Rocheville, M. Grant, A. Rani, T. Hazlett, S. C. Patel, E. Gratton et Y. C. Patel (2002). "Ligand binding to somatostatin receptors induces receptor-specific oligomer formation in live cells." *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**(5): 3294-9.
- Peng, Y., C. Li, L. Chen, S. Sebti et J. Chen (2003). "Rescue of mutant p53 transcription function by ellipticine." *Oncogene* **22**(29): 4478-87.
- Pequeux, C., B. P. Keegan, M. T. Hagelstein, V. Geenen, J. J. Legros et W. G. North (2004). "Oxytocin- and vasopressin-induced growth of human small-cell lung cancer is mediated by the mitogen-activated protein kinase pathway." *Endocr Relat Cancer* **11**(4): 871-85.
- Petaja-Repo, U. E., M. Hogue, S. Bhalla, A. Laperriere, J. P. Morello et M. Bouvier (2002). "Ligands act as pharmacological chaperones and increase the efficiency of delta opioid receptor maturation." *Embo J* **21**(7): 1628-37.
- Petaja-Repo, U. E., M. Hogue, A. Laperriere, P. Walker et M. Bouvier (2000). "Export from the endoplasmic reticulum represents the limiting step in the maturation and cell surface expression of the human delta opioid receptor." *J Biol Chem* **275**(18): 13727-36.
- Petrescu, A. J., A. L. Milac, S. M. Petrescu, R. A. Dwek et M. R. Wormald (2004). "Statistical analysis of the protein environment of N-glycosylation sites: implications for occupancy, structure, and folding." *Glycobiology* **14**(2): 103-14.
- Petrova, K., S. Oyadomari, L. M. Hendershot et D. Ron (2008). "Regulated association of misfolded endoplasmic reticulum luminal proteins with P58/DNAJc3." *EMBO J* **27**(21): 2862-72.
- Pfeffer, S. R. (2007). "Unsolved mysteries in membrane traffic." *Annu Rev Biochem* **76**: 629-45.
- Pfeiffer, M., T. Koch, H. Schroder, M. Klutzny, S. Kirscht, H. J. Kreienkamp, V. Holtt et S. Schulz (2001). "Homo- and heterodimerization of somatostatin receptor subtypes. Inactivation of sst(3) receptor function by heterodimerization with sst(2A)." *J Biol Chem* **276**(17): 14027-36.
- Pierce, K. L., R. T. Premont et R. J. Lefkowitz (2002). "Seven-transmembrane receptors." *Nat Rev Mol Cell Biol* **3**(9): 639-50.
- Pisitkun, T., V. Jacob, S. M. Schleicher, C. L. Chou, M. J. Yu et M. A. Knepper (2008). "Akt and ERK1/2 pathways are components of the vasopressin signaling network in rat native IMCD." *Am J Physiol Renal Physiol* **295**(4): F1030-43.
- Pitcher, J., M. J. Lohse, J. Codina, M. G. Caron et R. J. Lefkowitz (1992). "Desensitization of the isolated beta 2-adrenergic receptor by beta-adrenergic receptor kinase, cAMP-dependent protein kinase, and protein kinase C occurs via distinct molecular mechanisms." *Biochemistry* **31**(12): 3193-7.
- Pitcher, J. A., N. J. Freedman et R. J. Lefkowitz (1998). "G protein-coupled receptor kinases." *Annu Rev Biochem* **67**: 653-92.
- Porubcan, R. S., K. L. Watters et J. T. McFarland (1978). "A laser Raman study of lysozyme denaturation." *Arch Biochem Biophys* **186**(2): 255-64.
- Premont, R. T. et R. R. Gainetdinov (2007). "Physiological roles of G protein-coupled receptor kinases and arrestins." *Annu Rev Physiol* **69**: 511-34.
- Preston, G. M., T. P. Carroll, W. B. Guggino et P. Agre (1992). "Appearance of water channels in *Xenopus* oocytes expressing red cell CHIP28 protein." *Science* **256**(5055): 385-7.

- Prinster, S. C., C. Hague et R. A. Hall (2005). "Heterodimerization of G protein-coupled receptors: specificity and functional significance." *Pharmacol Rev* **57**(3): 289-98.
- Procino, G., M. Carmosino, O. Marin, A. M. Brunati, A. Contri, L. A. Pinna, R. Mannucci, S. Nielsen, T. H. Kwon, M. Svelto et G. Valenti (2003). "Ser-256 phosphorylation dynamics of Aquaporin 2 during maturation from the ER to the vesicular compartment in renal cells." *Faseb J* **17**(13): 1886-8.
- Prusiner, S. B. (1987). "Prion diseases and central nervous system degeneration." *Clin Res* **35**(3): 177-91.
- Pyhtila, B., T. Zheng, P. J. Lager, J. D. Keene, M. C. Reedy et C. V. Nicchitta (2008). "Signal sequence- and translation-independent mRNA localization to the endoplasmic reticulum." *RNA* **14**(3): 445-53.
- Radford, S. E. et C. M. Dobson (1999). "From computer simulations to human disease: emerging themes in protein folding." *Cell* **97**(3): 291-8.
- Raimondi, F., M. Seeber, P. G. Benedetti et F. Fanelli (2008). "Mechanisms of inter- and intramolecular communication in GPCRs and G proteins." *J Am Chem Soc* **130**(13): 4310-25.
- Rajan, R. S., K. Tsumoto, M. Tokunaga, H. Tokunaga, Y. Kita et T. Arakawa (2011). "Chemical and pharmacological chaperones: application for recombinant protein production and protein folding diseases." *Curr Med Chem* **18**(1): 1-15.
- Rana, S., G. Besson, D. G. Cook, J. Rucker, R. J. Smyth, Y. Yi, J. D. Turner, H. H. Guo, J. G. Du, S. C. Peiper, E. Lavi, M. Samson, F. Libert, C. Liesnard, G. Vassart, R. W. Doms, M. Parmentier et R. G. Collman (1997). "Role of CCR5 in infection of primary macrophages and lymphocytes by macrophage-tropic strains of human immunodeficiency virus: resistance to patient-derived and prototype isolates resulting from the delta ccr5 mutation." *J Virol* **71**(4): 3219-27.
- Ranadive, S. A., B. Ersoy, H. Favre, C. C. Cheung, S. M. Rosenthal, W. L. Miller et C. Vaisse (2008). "Identification, characterization and rescue of a novel vasopressin-2 receptor mutation causing nephrogenic diabetes insipidus." *Clin Endocrinol (Oxf)*.
- Ranchin, B., M. Boury-Jamot, G. Blanchard, L. Dubourg, A. Hadj-Aissa, D. Morin, T. Durroux, P. Cochat, G. Bricca, J. M. Verbavatz et G. Geelen "Familial nephrogenic syndrome of inappropriate antidiuresis: dissociation between aquaporin-2 and vasopressin excretion." *J Clin Endocrinol Metab* **95**(9): E37-43.
- Ranchin, B., M. Boury-Jamot, G. Blanchard, L. Dubourg, A. Hadj-Aissa, D. Morin, T. Durroux, P. Cochat, G. Bricca, J. M. Verbavatz et G. Geelen (2010). "Familial nephrogenic syndrome of inappropriate antidiuresis: dissociation between aquaporin-2 and vasopressin excretion." *J Clin Endocrinol Metab* **95**(9): E37-43.
- Rannikko, A., P. Pakarinen, P. R. Manna, I. Beau, M. Misrahi, K. Aittomaki et I. Huhtaniemi (2002). "Functional characterization of the human FSH receptor with an inactivating Ala189Val mutation." *Mol Hum Reprod* **8**(4): 311-7.
- Rapoport, T. A. (2007). "Protein translocation across the eukaryotic endoplasmic reticulum and bacterial plasma membranes." *Nature* **450**(7170): 663-9.
- Rasmussen, S. G., H. J. Choi, D. M. Rosenbaum, T. S. Kobilka, F. S. Thian, P. C. Edwards, M. Burghammer, V. R. Ratnala, R. Sanishvili, R. F. Fischetti, G. F. Schertler, W. I. Weis et B. K. Kobilka (2007). "Crystal structure of the human beta2 adrenergic G-protein-coupled receptor." *Nature* **450**(7168): 383-7.

- Rebois, R. V., M. Robitaille, C. Gales, D. J. Dupre, A. Baragli, P. Trieu, N. Ethier, M. Bouvier et T. E. Hebert (2006). "Heterotrimeric G proteins form stable complexes with adenylyl cyclase and Kir3.1 channels in living cells." *J Cell Sci* **119**(Pt 13): 2807-18.
- Reddy, P. S. et R. B. Corley (1998). "Assembly, sorting, and exit of oligomeric proteins from the endoplasmic reticulum." *Bioessays* **20**(7): 546-54.
- Rene, P., C. Le Guill, I. D. Pogozheva, G. Lee, H. I. Mosberg, I. S. Farooqi, K. J. Valenzano et M. Bouvier (2010). "Pharmacological chaperones restore function to MC4R mutants responsible for severe early-onset obesity." *J Pharmacol Exp Ther* **335**(3): 520-32.
- Riddell, D. C., R. Mallonee, J. A. Phillips, J. S. Parks, L. A. Sexton et J. L. Hamerton (1985). "Chromosomal assignment of human sequences encoding arginine vasopressin-neurophysin II and growth hormone releasing factor." *Somat Cell Mol Genet* **11**(2): 189-95.
- Rider, J. A. et D. L. Rider (1999). "Thirty years of Batten disease research: present status and future goals." *Mol Genet Metab* **66**(4): 231-3.
- Rieg, T. et V. Vallon (2009). "ATP and adenosine in the local regulation of water transport and homeostasis by the kidney." *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **296**(2): R419-27.
- Ritter, C. et A. Helenius (2000). "Recognition of local glycoprotein misfolding by the ER folding sensor UDP-glucose:glycoprotein glucosyltransferase." *Nat Struct Biol* **7**(4): 278-80.
- Rivers, R. P., M. L. Forsling et R. P. Olver (1981). "Inappropriate secretion of antidiuretic hormone in infants with respiratory infections." *Arch Dis Child* **56**(5): 358-63.
- Robben, J. H., N. V. Knoers et P. M. Deen (2004). "Regulation of the vasopressin V2 receptor by vasopressin in polarized renal collecting duct cells." *Mol Biol Cell* **15**(12): 5693-9.
- Robben, J. H., N. V. Knoers et P. M. Deen (2005). "Characterization of vasopressin V2 receptor mutants in nephrogenic diabetes insipidus in a polarized cell model." *Am J Physiol Renal Physiol* **289**(2): F265-72.
- Robben, J. H., N. V. Knoers et P. M. Deen (2006). "Cell biological aspects of the vasopressin type-2 receptor and aquaporin 2 water channel in nephrogenic diabetes insipidus." *Am J Physiol Renal Physiol* **291**(2): F257-70.
- Robben, J. H., M. Sze, N. V. Knoers et P. M. Deen (2007). "Functional rescue of vasopressin V2 receptor mutants in MDCK cells by pharmacochaperones: relevance to therapy of nephrogenic diabetes insipidus." *Am J Physiol Renal Physiol* **292**(1): F253-60.
- Robert, J., C. Auzan, M. A. Ventura et E. Clauser (2005). "Mechanisms of cell-surface rerouting of an endoplasmic reticulum-retained mutant of the vasopressin V1b/V3 receptor by a pharmacological chaperone." *J Biol Chem* **280**(51): 42198-206.
- Robertson, G. et J. A. Scheidler (1981). "A newly recognized variant of familial nephrogenic diabetes insipidus distinguished by partial resistance to vasopressin." *Clinical Research* **29**: 555A.
- Robertson, G. L. (1987). "Physiology of ADH secretion." *Kidney Int Suppl* **21**: S20-6.
- Rochdi, M. D. et J. L. Parent (2003). "Galphaq-coupled receptor internalization specifically induced by Galphaq signaling. Regulation by EBP50." *J Biol Chem* **278**(20): 17827-37.
- Rochdi, M. D., G. A. Vargas, E. Carpentier, G. Oligny-Longpre, S. Chen, A. Koor, S. E. Gitelman, S. M. Rosenthal, M. von Zastrow et M. Bouvier (2010). "Functional Characterization of V2-Vasopressin Receptor Substitutions (R137H/C/L) Leading to Nephrogenic Diabetes Insipidus and Nephrogenic Syndrome of Inappropriate Antidiuresis; Implications for treatments." *Mol Pharmacol*.

- Rochdi, M. D., G. A. Vargas, E. Carpentier, G. Oligny-Longpre, S. Chen, A. Kovoor, S. E. Gitelman, S. M. Rosenthal, M. von Zastrow et M. Bouvier (2010). "Functional characterization of vasopressin type 2 receptor substitutions (R137H/C/L) leading to nephrogenic diabetes insipidus and nephrogenic syndrome of inappropriate antidiuresis: implications for treatments." Mol Pharmacol **77**(5): 836-45.
- Rocheville, M., D. C. Lange, U. Kumar, S. C. Patel, R. C. Patel et Y. C. Patel (2000). "Receptors for dopamine and somatostatin: formation of hetero-oligomers with enhanced functional activity." Science **288**(5463): 154-7.
- Rocheville, M., D. C. Lange, U. Kumar, R. Sasi, R. C. Patel et Y. C. Patel (2000). "Subtypes of the somatostatin receptor assemble as functional homo- and heterodimers." J Biol Chem **275**(11): 7862-9.
- Rodbell, M., L. Birnbaumer, S. L. Pohl et H. M. Krans (1971). "The glucagon-sensitive adenylyl cyclase system in plasma membranes of rat liver. V. An obligatory role of guanylnucleotides in glucagon action." J Biol Chem **246**(6): 1877-82.
- Rodriguez-Frade, J. M., A. J. Vila-Coro, A. M. de Ana, J. P. Albar, A. C. Martinez et M. Mellado (1999). "The chemokine monocyte chemoattractant protein-1 induces functional responses through dimerization of its receptor CCR2." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(7): 3628-33.
- Rodriguez-Puertas, R. et G. Barreda-Gomez (2006). "Development of new drugs that act through membrane receptors and involve an action of inverse agonism." Recent Patents CNS Drug Discov **1**(2): 207-17.
- Roess, D. A. et S. M. Smith (2003). "Self-association and raft localization of functional luteinizing hormone receptors." Biol Reprod **69**(6): 1765-70.
- Rong, R., Y. X. Tao, B. M. Cheung, A. Xu, G. C. Cheung et K. S. Lam (2006). "Identification and functional characterization of three novel human melanocortin-4 receptor gene variants in an obese Chinese population." Clin Endocrinol (Oxf) **65**(2): 198-205.
- Rosenbaum, D. M., V. Cherezov, M. A. Hanson, S. G. Rasmussen, F. S. Thian, T. S. Kobilka, H. J. Choi, X. J. Yao, W. I. Weis, R. C. Stevens et B. K. Kobilka (2007). "GPCR engineering yields high-resolution structural insights into beta2-adrenergic receptor function." Science **318**(5854): 1266-73.
- Rosenthal, W., A. Antaramian, S. Gilbert et M. Birnbaumer (1993). "Nephrogenic diabetes insipidus. A V2 vasopressin receptor unable to stimulate adenylyl cyclase." J Biol Chem **268**(18): 13030-3.
- Rosenthal, W., A. Seibold, A. Antaramian, S. Gilbert, M. Birnbaumer, D. G. Bichet, M. F. Arthus et M. Lonergan (1994). "Mutations in the vasopressin V2 receptor gene in families with nephrogenic diabetes insipidus and functional expression of the Q-2 mutant." Cell Mol Biol (Noisy-le-grand) **40**(3): 429-36.
- Rosenthal, W., A. Seibold, A. Antaramian, M. Lonergan, M. F. Arthus, G. N. Hendy, M. Birnbaumer et D. G. Bichet (1992). "Molecular identification of the gene responsible for congenital nephrogenic diabetes insipidus." Nature **359**(6392): 233-5.
- Rovati, G. E., V. Capra et R. R. Neubig (2007). "The highly conserved DRY motif of class A G protein-coupled receptors: beyond the ground state." Mol Pharmacol **71**(4): 959-64.
- Roxrud, I., H. Stenmark et L. Malerod (2010). "ESCRT & Co." Biol Cell **102**(5): 293-318.
- Rozell, T. G., D. P. Davis, Y. Chai et D. L. Segaloff (1998). "Association of gonadotropin receptor precursors with the protein folding chaperone calnexin." Endocrinology **139**(4): 1588-93.

- Rubenstein, R. C. et P. L. Zeitlin (1998). "A pilot clinical trial of oral sodium 4-phenylbutyrate (Buphenyl) in deltaF508-homozygous cystic fibrosis patients: partial restoration of nasal epithelial CFTR function." Am J Respir Crit Care Med **157**(2): 484-90.
- Rus, R., C. Haag, C. Bumke-Vogt, V. Bahr, B. Mayr, M. Mohlig, E. Schulze, K. Frank-Raue, F. Raue et C. Schofl (2008). "Novel inactivating mutations of the calcium-sensing receptor: the calcimimetic NPS R-568 improves signal transduction of mutant receptors." J Clin Endocrinol Metab **93**(12): 4797-803.
- Ryou, C., G. Legname, D. Peretz, J. C. Craig, M. A. Baldwin et S. B. Prusiner (2003). "Differential inhibition of prion propagation by enantiomers of quinacrine." Lab Invest **83**(6): 837-43.
- Sabatini, D. D. et G. Blobel (1970). "Controlled proteolysis of nascent polypeptides in rat liver cell fractions. II. Location of the polypeptides in rough microsomes." J Cell Biol **45**(1): 146-57.
- Sadeghi, H. et M. Birnbaumer (1999). "O-Glycosylation of the V2 vasopressin receptor." Glycobiology **9**(7): 731-7.
- Sadeghi, H. M., G. Innamorati et M. Birnbaumer (1997). "An X-linked NDI mutation reveals a requirement for cell surface V2R expression." Mol Endocrinol **11**(6): 706-13.
- Sadeghi, H. M., G. Innamorati, M. Dagarag et M. Birnbaumer (1997). "Palmitoylation of the V2 vasopressin receptor." Mol Pharmacol **52**(1): 21-9.
- Saito, Y., Y. Ihara, M. R. Leach, M. F. Cohen-Doyle et D. B. Williams (1999). "Calreticulin functions in vitro as a molecular chaperone for both glycosylated and non-glycosylated proteins." Embo J **18**(23): 6718-29.
- Saliba, R. S., P. M. Munro, P. J. Luthert et M. E. Cheetham (2002). "The cellular fate of mutant rhodopsin: quality control, degradation and aggresome formation." J Cell Sci **115**(Pt 14): 2907-18.
- Samama, P., G. Pei, T. Costa, S. Cotecchia et R. J. Lefkowitz (1994). "Negative antagonists promote an inactive conformation of the beta 2-adrenergic receptor." Mol Pharmacol **45**(3): 390-4.
- Sanders, C. R. et J. K. Nagy (2000). "Misfolding of membrane proteins in health and disease: the lady or the tiger?" Curr Opin Struct Biol **10**(4): 438-42.
- Sands, J. M., H. Nonoguchi et M. A. Knepper (1987). "Vasopressin effects on urea and H₂O transport in inner medullary collecting duct subsegments." Am J Physiol **253**(5 Pt 2): F823-32.
- Santavuori, P. (1988). "Neuronal ceroid-lipofuscinoses in childhood." Brain Dev **10**(2): 80-3.
- Sato, S., C. L. Ward, M. E. Krouse, J. J. Wine et R. R. Kopito (1996). "Glycerol reverses the misfolding phenotype of the most common cystic fibrosis mutation." J Biol Chem **271**(2): 635-8.
- Sawkar, A. R., W. C. Cheng, E. Beutler, C. H. Wong, W. E. Balch et J. W. Kelly (2002). "Chemical chaperones increase the cellular activity of N370S beta -glucosidase: a therapeutic strategy for Gaucher disease." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(24): 15428-33.
- Schioth, H. B. et R. Fredriksson (2005). "The GRAFS classification system of G-protein coupled receptors in comparative perspective." Gen Comp Endocrinol **142**(1-2): 94-101.
- Schrag, J. D., J. J. Bergeron, Y. Li, S. Borisova, M. Hahn, D. Y. Thomas et M. Cygler (2001). "The Structure of calnexin, an ER chaperone involved in quality control of protein folding." Mol Cell **8**(3): 633-44.

- Schubert, U., L. C. Anton, J. Gibbs, C. C. Norbury, J. W. Yewdell et J. R. Bennink (2000). "Rapid degradation of a large fraction of newly synthesized proteins by proteasomes." Nature **404**(6779): 770-4.
- Schueler, U. H., T. Kolter, C. R. Kaneshi, G. C. Zirzow, K. Sandhoff et R. O. Brady (2004). "Correlation between enzyme activity and substrate storage in a cell culture model system for Gaucher disease." J Inherit Metab Dis **27**(5): 649-58.
- Schulze, A., S. Standera, E. Buerger, M. Kikkert, S. van Voorden, E. Wiertz, F. Koning, P. M. Kloetzel et M. Seeger (2005). "The ubiquitin-domain protein HERP forms a complex with components of the endoplasmic reticulum associated degradation pathway." J Mol Biol **354**(5): 1021-7.
- Schwieger, I., K. Lautz, E. Krause, W. Rosenthal, B. Wiesner et R. Hermosilla (2008). "Derlin-1 and p97/valosin-containing protein mediate the endoplasmic reticulum-associated degradation of human V2 vasopressin receptors." Mol Pharmacol **73**(3): 697-708.
- Seifert, R. et K. Wenzel-Seifert (2002). "Constitutive activity of G-protein-coupled receptors: cause of disease and common property of wild-type receptors." Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol **366**(5): 381-416.
- Selkoe, D. J. (2003). "Folding proteins in fatal ways." Nature **426**(6968): 900-4.
- Shenoy, S. K., M. T. Drake, C. D. Nelson, D. A. Houtz, K. Xiao, S. Madabushi, E. Reiter, R. T. Premont, O. Lichtarge et R. J. Lefkowitz (2006). "beta-arrestin-dependent, G protein-independent ERK1/2 activation by the beta2 adrenergic receptor." J Biol Chem **281**(2): 1261-73.
- Shimizu, Y. et L. M. Hendershot (2007). "Organization of the functions and components of the endoplasmic reticulum." Adv Exp Med Biol **594**: 37-46.
- Simon, H., Y. Gao, N. Franki et R. M. Hays (1993). "Vasopressin depolymerizes apical F-actin in rat inner medullary collecting duct." Am J Physiol **265**(3 Pt 1): C757-62.
- Singh, L. R., X. Chen, V. Kozich et W. D. Kruger (2007). "Chemical chaperone rescue of mutant human cystathionine beta-synthase." Mol Genet Metab **91**(4): 335-42.
- Sitia, R. et I. Braakman (2003). "Quality control in the endoplasmic reticulum protein factory." Nature **426**(6968): 891-4.
- Skach, W. R. (2000). "Defects in processing and trafficking of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator." Kidney Int **57**(3): 825-31.
- Sklar, A. H. et R. W. Schrier (1983). "Central nervous system mediators of vasopressin release." Physiol Rev **63**(4): 1243-80.
- Smith, B. L. et P. Agre (1991). "Erythrocyte Mr 28,000 transmembrane protein exists as a multisubunit oligomer similar to channel proteins." J Biol Chem **266**(10): 6407-15.
- Sondek, J., A. Bohm, D. G. Lambright, H. E. Hamm et P. B. Sigler (1996). "Crystal structure of a G-protein beta gamma dimer at 2.1A resolution." Nature **379**(6563): 369-74.
- Song, J. L. et D. T. Chuang (2001). "Natural osmolyte trimethylamine N-oxide corrects assembly defects of mutant branched-chain alpha-ketoacid decarboxylase in maple syrup urine disease." J Biol Chem **276**(43): 40241-6.
- Soto, C. (2001). "Protein misfolding and disease; protein refolding and therapy." FEBS Lett **498**(2-3): 204-7.
- Soule, S., C. Florkowski, H. Potter, D. Pattison, M. Swan, P. Hunt et P. George (2008). "Intermittent severe, symptomatic hyponatraemia due to the nephrogenic syndrome of inappropriate antidiuresis." Ann Clin Biochem **45**(Pt 5): 520-3.

- Sousa, M. C., M. A. Ferrero-Garcia et A. J. Parodi (1992). "Recognition of the oligosaccharide and protein moieties of glycoproteins by the UDP-Glc:glycoprotein glucosyltransferase." Biochemistry **31**(1): 97-105.
- Spanakis, E., E. Milord et C. Gragnoli (2008). "AVPR2 variants and mutations in nephrogenic diabetes insipidus: review and missense mutation significance." J Cell Physiol **217**(3): 605-17.
- Spiro, R. G., Q. Zhu, V. Bhojroo et H. D. Soling (1996). "Definition of the lectin-like properties of the molecular chaperone, calreticulin, and demonstration of its copurification with endomannosidase from rat liver Golgi." J Biol Chem **271**(19): 11588-94.
- Stables, J., S. Scott, S. Brown, C. Roelant, D. Burns, M. G. Lee et S. Rees (1999). "Development of a dual glow-signal firefly and Renilla luciferase assay reagent for the analysis of G-protein coupled receptor signalling." J Recept Signal Transduct Res **19**(1-4): 395-410.
- Stanasila, L., J. B. Perez, H. Vogel et S. Cotecchia (2003). "Oligomerization of the alpha 1a- and alpha 1b-adrenergic receptor subtypes. Potential implications in receptor internalization." J Biol Chem **278**(41): 40239-51.
- Star, R. A., H. Nonoguchi, R. Balaban et M. A. Knepper (1988). "Calcium and cyclic adenosine monophosphate as second messengers for vasopressin in the rat inner medullary collecting duct." J Clin Invest **81**(6): 1879-88.
- Stevens, F. J. et Y. Argon (1999). "Protein folding in the ER." Semin Cell Dev Biol **10**(5): 443-54.
- Strasser, R. H., D. R. Sibley et R. J. Lefkowitz (1986). "A novel catecholamine-activated adenosine cyclic 3',5'-phosphate independent pathway for beta-adrenergic receptor phosphorylation in wild-type and mutant S49 lymphoma cells: mechanism of homologous desensitization of adenylate cyclase." Biochemistry **25**(6): 1371-7.
- Suen, Y. F., L. Robins, B. Yang, A. S. Verkman, M. H. Nantz et M. J. Kurth (2006). "Sulfamoyl-4-oxoquinoline-3-carboxamides: novel potentiators of defective DeltaF508-cystic fibrosis transmembrane conductance regulator chloride channel gating." Bioorg Med Chem Lett **16**(3): 537-40.
- Sung, C. H., C. M. Davenport, J. C. Hennessey, I. H. Maumenee, S. G. Jacobson, J. R. Heckenlively, R. Nowakowski, G. Fishman, P. Gouras et J. Nathans (1991). "Rhodopsin mutations in autosomal dominant retinitis pigmentosa." Proc Natl Acad Sci U S A **88**(15): 6481-5.
- Surguchov, A. (2008). "Molecular and cellular biology of synucleins." Int Rev Cell Mol Biol **270**: 225-317.
- Sutherland, E. W. et T. W. Rall (1958). "Fractionation and characterization of a cyclic adenine ribonucleotide formed by tissue particles." J Biol Chem **232**(2): 1077-91.
- Suzuki, T., H. Park, N. M. Hollingsworth, R. Sternglanz et W. J. Lennarz (2000). "PNG1, a yeast gene encoding a highly conserved peptide:N-glycanase." J Cell Biol **149**(5): 1039-52.
- Svenningsen, N. W. et A. S. Aronson (1974). "Postnatal development of renal concentration capacity as estimated by DDAVP-test in normal and asphyxiated neonates." Biol Neonate **25**(3-4): 230-41.
- Tahara, A., M. Saito, T. Sugimoto, Y. Tomura, K. Wada, T. Kusayama, J. Tsukada, N. Ishii, T. Yatsu, W. Uchida et A. Tanaka (1998). "Pharmacological characterization of the human vasopressin receptor subtypes stably expressed in Chinese hamster ovary cells." Br J Pharmacol **125**(7): 1463-70.

- Tamarappoo, B. K., B. Yang et A. S. Verkman (1999). "Misfolding of mutant aquaporin-2 water channels in nephrogenic diabetes insipidus." *J Biol Chem* **274**(49): 34825-31.
- Tamma, G., E. Klussmann, G. Procino, M. Svelto, W. Rosenthal et G. Valenti (2003). "cAMP-induced AQP2 translocation is associated with RhoA inhibition through RhoA phosphorylation and interaction with RhoGDI." *J Cell Sci* **116**(Pt 8): 1519-25.
- Tamma, G., B. Wiesner, J. Furkert, D. Hahm, A. Oksche, M. Schaefer, G. Valenti, W. Rosenthal et E. Klussmann (2003). "The prostaglandin E2 analogue sulprostone antagonizes vasopressin-induced antidiuresis through activation of Rho." *J Cell Sci* **116**(Pt 16): 3285-94.
- Tan, C. M., A. E. Brady, H. H. Nickols, Q. Wang et L. E. Limbird (2004). "Membrane trafficking of G protein-coupled receptors." *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **44**: 559-609.
- Tan, S. S., E. A. Williams et P. P. Tam (1993). "X-chromosome inactivation occurs at different times in different tissues of the post-implantation mouse embryo." *Nat Genet* **3**(2): 170-4.
- Tanaka, H., K. Moroi, J. Iwai, H. Takahashi, N. Ohnuma, S. Hori, M. Takimoto, M. Nishiyama, T. Masaki, M. Yanagisawa, S. Sekiya et S. Kimura (1998). "Novel mutations of the endothelin B receptor gene in patients with Hirschsprung's disease and their characterization." *J Biol Chem* **273**(18): 11378-83.
- Tanaka, M., Y. Machida et N. Nukina (2005). "A novel therapeutic strategy for polyglutamine diseases by stabilizing aggregation-prone proteins with small molecules." *J Mol Med* **83**(5): 343-52.
- Tanoue, A., S. Ito, K. Honda, S. Oshikawa, Y. Kitagawa, T. A. Koshimizu, T. Mori et G. Tsujimoto (2004). "The vasopressin V1b receptor critically regulates hypothalamic-pituitary-adrenal axis activity under both stress and resting conditions." *J Clin Invest* **113**(2): 302-9.
- Tao, Y. X. (2007). "Functional characterization of novel melanocortin-3 receptor mutations identified from obese subjects." *Biochim Biophys Acta* **1772**(10): 1167-74.
- Tao, Y. X. et D. L. Segaloff (2003). "Functional characterization of melanocortin-4 receptor mutations associated with childhood obesity." *Endocrinology* **144**(10): 4544-51.
- Tashima, Y., Y. Kohda, H. Nonoguchi, M. Ikebe, K. Machida, R. A. Star et K. Tomita (2001). "Intranephron localization and regulation of the V1a vasopressin receptor during chronic metabolic acidosis and dehydration in rats." *Pflugers Arch* **442**(5): 652-61.
- Taylor, S. C., A. D. Ferguson, J. J. Bergeron et D. Y. Thomas (2004). "The ER protein folding sensor UDP-glucose glycoprotein-glucosyltransferase modifies substrates distant to local changes in glycoprotein conformation." *Nat Struct Mol Biol* **11**(2): 128-34.
- Tenenbaum, J., M. A. Ayoub, S. Perkowska, A. L. Adra-Delenne, C. Mendre, B. Ranchin, G. Bricca, G. Geelen, B. Mouillac, T. Durroux et D. Morin (2009). "The constitutively active V2 receptor mutants conferring NSIAD are weakly sensitive to agonist and antagonist regulation." *PLoS ONE* **4**(12): e8383.
- Terrillon, S. et M. Bouvier (2004). "Roles of G-protein-coupled receptor dimerization." *EMBO Rep* **5**(1): 30-4.
- Terrillon, S., T. Durroux, B. Mouillac, A. Breit, M. A. Ayoub, M. Taulan, R. Jockers, C. Barberis et M. Bouvier (2003). "Oxytocin and vasopressin V1a and V2 receptors form constitutive homo- and heterodimers during biosynthesis." *Mol Endocrinol* **17**(4): 677-91.

- Thibonnier, M., L. N. Berti-Mattera, N. Dulin, D. M. Conarty et R. Mattera (1998). "Signal transduction pathways of the human V1-vascular, V2-renal, V3-pituitary vasopressin and oxytocin receptors." Prog Brain Res **119**: 147-61.
- Thibonnier, M., J. A. Preston, N. Dulin, P. L. Wilkins, L. N. Berti-Mattera et R. Mattera (1997). "The human V3 pituitary vasopressin receptor: ligand binding profile and density-dependent signaling pathways." Endocrinology **138**(10): 4109-22.
- Thrift, R. N., D. W. Andrews, P. Walter et A. E. Johnson (1991). "A nascent membrane protein is located adjacent to ER membrane proteins throughout its integration and translation." J Cell Biol **112**(5): 809-21.
- Tisdale, E. J. (2003). "Rab2 interacts directly with atypical protein kinase C (aPKC) iota/lambda and inhibits aPKC_{iota/lambda}-dependent glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase phosphorylation." J Biol Chem **278**(52): 52524-30.
- Tohgo, A., E. W. Choy, D. Gesty-Palmer, K. L. Pierce, S. Laporte, R. H. Oakley, M. G. Caron, R. J. Lefkowitz et L. M. Luttrell (2003). "The stability of the G protein-coupled receptor-beta-arrestin interaction determines the mechanism and functional consequence of ERK activation." J Biol Chem **278**(8): 6258-67.
- Tonacchera, M., P. Agretti, A. Pinchera, V. Rosellini, A. Perri, P. Collecchi, P. Vitti et L. Chiovato (2000). "Congenital hypothyroidism with impaired thyroid response to thyrotropin (TSH) and absent circulating thyroglobulin: evidence for a new inactivating mutation of the TSH receptor gene." J Clin Endocrinol Metab **85**(3): 1001-8.
- Totani, K., Y. Ihara, I. Matsuo, T. Tsujimoto et Y. Ito (2009). "The Recognition Motif of the Glycoprotein-Folding Sensor Enzyme, UDP-Glc: Glycoprotein Glucosyltransferase." Biochemistry.
- Treschan, T. A. et J. Peters (2006). "The vasopressin system: physiology and clinical strategies." Anesthesiology **105**(3): 599-612; quiz 639-40.
- Trombetta, E. S. et A. J. Parodi (2005). "Glycoprotein reglucosylation." Methods **35**(4): 328-37.
- Tropak, M. B., J. E. Blanchard, S. G. Withers, E. D. Brown et D. Mahuran (2007). "High-throughput screening for human lysosomal beta-N-Acetyl hexosaminidase inhibitors acting as pharmacological chaperones." Chem Biol **14**(2): 153-64.
- Tsukaguchi, H., H. Matsubara et M. Inada (1995). "Expression studies of two vasopressin V2 receptor gene mutations, R202C and 804insG, in nephrogenic diabetes insipidus." Kidney Int **48**(2): 554-62.
- Tu, J. C., B. Xiao, J. P. Yuan, A. A. Lanahan, K. Leoffert, M. Li, D. J. Linden et P. F. Worley (1998). "Homer binds a novel proline-rich motif and links group 1 metabotropic glutamate receptors with IP3 receptors." Neuron **21**(4): 717-26.
- Turner, C. M., O. Vonend, C. Chan, G. Burnstock et R. J. Unwin (2003). "The pattern of distribution of selected ATP-sensitive P2 receptor subtypes in normal rat kidney: an immunohistological study." Cells Tissues Organs **175**(2): 105-17.
- Tveten, K., O. L. Holla, T. Ranheim, K. E. Berge, T. P. Leren et M. A. Kulseth (2007). "4-Phenylbutyrate restores the functionality of a misfolded mutant low-density lipoprotein receptor." Febs J **274**(8): 1881-93.
- Uawithya, P., T. Pisitkun, B. E. Ruttenberg et M. A. Knepper (2008). "Transcriptional profiling of native inner medullary collecting duct cells from rat kidney." Physiol Genomics **32**(2): 229-53.

- Ulloa-Aguirre, A., J. A. Janovick, S. P. Brothers et P. M. Conn (2004). "Pharmacologic rescue of conformationally-defective proteins: implications for the treatment of human disease." Traffic **5**(11): 821-37.
- Ulloa-Aguirre, A., J. A. Janovick, A. Leanos-Miranda et P. M. Conn (2004). "Misrouted cell surface GnRH receptors as a disease aetiology for congenital isolated hypogonadotropic hypogonadism." Hum Reprod Update **10**(2): 177-92.
- Upreti, R. K., M. Kumar et V. Shankar (2003). "Bacterial glycoproteins: functions, biosynthesis and applications." Proteomics **3**(4): 363-79.
- Uversky, V. N., J. Li et A. L. Fink (2001). "Pesticides directly accelerate the rate of alpha-synuclein fibril formation: a possible factor in Parkinson's disease." FEBS Lett **500**(3): 105-8.
- Vaisse, C., K. Clement, E. Durand, S. Hercberg, B. Guy-Grand et P. Froguel (2000). "Melanocortin-4 receptor mutations are a frequent and heterogeneous cause of morbid obesity." J Clin Invest **106**(2): 253-62.
- Valenzano, K. J., E. R. Benjamin, P. René et M. Bouvier (2010). Pharmacological chaperones: Potential for the treatment of hereditary diseases caused by mutations in G protein-coupled receptors. GPCR molecular pharmacology and drug targeting: Shifting paradigms and new directions, John Wiley and Sons, Inc.: 460-510.
- Valverde, P., E. Healy, S. Sikkink, F. Haldane, A. J. Thody, A. Carothers, I. J. Jackson et J. L. Rees (1996). "The Asp84Glu variant of the melanocortin 1 receptor (MC1R) is associated with melanoma." Hum Mol Genet **5**(10): 1663-6.
- van Anken, E., E. P. Romijn, C. Maggioni, A. Mezghrani, R. Sitia, I. Braakman et A. J. Heck (2003). "Sequential waves of functionally related proteins are expressed when B cells prepare for antibody secretion." Immunity **18**(2): 243-53.
- van Balkom, B. W., P. J. Savelkoul, D. Markovich, E. Hofman, S. Nielsen, P. van der Sluijs et P. M. Deen (2002). "The role of putative phosphorylation sites in the targeting and shuttling of the aquaporin-2 water channel." J Biol Chem **277**(44): 41473-9.
- Van Craenenbroeck, K., S. D. Clark, M. J. Cox, J. N. Oak, F. Liu et H. H. Van Tol (2005). "Folding efficiency is rate-limiting in dopamine D4 receptor biogenesis." J Biol Chem **280**(19): 19350-7.
- van Lieburg, A. F., M. A. Verdijk, F. Schoute, M. J. Ligtenberg, B. A. van Oost, F. Waldhauser, M. Dobner, L. A. Monnens et N. V. Knoers (1995). "Clinical phenotype of nephrogenic diabetes insipidus in females heterozygous for a vasopressin type 2 receptor mutation." Hum Genet **96**(1): 70-8.
- Van, P. N., F. Peter et H. D. Soling (1989). "Four intracisternal calcium-binding glycoproteins from rat liver microsomes with high affinity for calcium. No indication for calsequestrin-like proteins in inositol 1,4,5-trisphosphate-sensitive calcium sequestering rat liver vesicles." J Biol Chem **264**(29): 17494-501.
- Varki, A. (1993). "Biological roles of oligosaccharides: all of the theories are correct." Glycobiology **3**(2): 97-130.
- Vassart, G. et S. Costagliola (2011). "G protein-coupled receptors: mutations and endocrine diseases." Nat Rev Endocrinol **7**(6): 362-72.
- Vassilakos, A., M. F. Cohen-Doyle, P. A. Peterson, M. R. Jackson et D. B. Williams (1996). "The molecular chaperone calnexin facilitates folding and assembly of class I histocompatibility molecules." Embo J **15**(7): 1495-506.

- Vassilakos, A., M. Michalak, M. A. Lehrman et D. B. Williams (1998). "Oligosaccharide binding characteristics of the molecular chaperones calnexin and calreticulin." Biochemistry **37**(10): 3480-90.
- Vassilatis, D. K., J. G. Hohmann, H. Zeng, F. Li, J. E. Ranchalis, M. T. Mortrud, A. Brown, S. S. Rodriguez, J. R. Weller, A. C. Wright, J. E. Bergmann et G. A. Gaitanaris (2003). "The G protein-coupled receptor repertoires of human and mouse." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(8): 4903-8.
- Verkman, A. S. (2008). "Mammalian aquaporins: diverse physiological roles and potential clinical significance." Expert Rev Mol Med **10**: e13.
- Vincent, J. L. et F. Su (2008). "Physiology and pathophysiology of the vasopressinergic system." Best Pract Res Clin Anaesthesiol **22**(2): 243-52.
- Violin, J. D. et R. J. Lefkowitz (2007). "Beta-arrestin-biased ligands at seven-transmembrane receptors." Trends Pharmacol Sci **28**(8): 416-22.
- Vitzthum, H., B. Weiss, W. Bachleitner, B. K. Kramer et A. Kurtz (2004). "Gene expression of adenosine receptors along the nephron." Kidney Int **65**(4): 1180-90.
- Voisin, D. L. et C. W. Bourque (2002). "Integration of sodium and osmosensory signals in vasopressin neurons." Trends Neurosci **25**(4): 199-205.
- von Zastrow, M. (2003). "Mechanisms regulating membrane trafficking of G protein-coupled receptors in the endocytic pathway." Life Sci **74**(2-3): 217-24.
- Wada, I., S. Imai, M. Kai, F. Sakane et H. Kanoh (1995). "Chaperone function of calreticulin when expressed in the endoplasmic reticulum as the membrane-anchored and soluble forms." J Biol Chem **270**(35): 20298-304.
- Walker, L. C. et H. LeVine (2000). "The cerebral proteopathies: neurodegenerative disorders of protein conformation and assembly." Mol Neurobiol **21**(1-2): 83-95.
- Walter, P. et A. E. Johnson (1994). "Signal sequence recognition and protein targeting to the endoplasmic reticulum membrane." Annu Rev Cell Biol **10**: 87-119.
- Walter, P. et V. R. Lingappa (1986). "Mechanism of protein translocation across the endoplasmic reticulum membrane." Annu Rev Cell Biol **2**: 499-516.
- Wang, C. C., C. P. Ng, H. Shi, H. C. Liew, K. Guo, Q. Zeng et W. Hong (2009). "A role of VAMP8/endobrevin in surface deployment of the water channel aquaporin 2." Mol Cell Biol.
- Ware, F. E., A. Vassilakos, P. A. Peterson, M. R. Jackson, M. A. Lehrman et D. B. Williams (1995). "The molecular chaperone calnexin binds Glc1Man9GlcNAc2 oligosaccharide as an initial step in recognizing unfolded glycoproteins." J Biol Chem **270**(9): 4697-704.
- Waring, A. J., L. Kajdi et V. Tappan (1945). "A Congenital Defect of Water Metabolism." American Medical Association.
- Wearsch, P. A. et C. V. Nicchitta (1996). "Endoplasmic reticulum chaperone GRP94 subunit assembly is regulated through a defined oligomerization domain." Biochemistry **35**(51): 16760-9.
- Weingartner, H., P. Gold, J. C. Ballenger, S. A. Smallberg, R. Summers, D. R. Rubinow, R. M. Post et F. K. Goodwin (1981). "Effects of vasopressin on human memory functions." Science **211**(4482): 601-3.
- Wenkert, D., T. Schoneberg, J. J. Merendino, Jr., M. S. Rodriguez Pena, R. Vinitzky, P. K. Goldsmith, J. Wess et A. M. Spiegel (1996). "Functional characterization of five V2 vasopressin receptor gene mutations." Mol Cell Endocrinol **124**(1-2): 43-50.

- White, J. H., A. Wise, M. J. Main, A. Green, N. J. Fraser, G. H. Disney, A. A. Barnes, P. Emson, S. M. Foord et F. H. Marshall (1998). "Heterodimerization is required for the formation of a functional GABA(B) receptor." *Nature* **396**(6712): 679-82.
- Wiedmann, M., D. Goerlich, E. Hartmann, T. V. Kurzchalia et T. A. Rapoport (1989). "Photocrosslinking demonstrates proximity of a 34 kDa membrane protein to different portions of preprolactin during translocation through the endoplasmic reticulum." *FEBS Lett* **257**(2): 263-8.
- Williams, D. B. (2006). "Beyond lectins: the calnexin/calreticulin chaperone system of the endoplasmic reticulum." *J Cell Sci* **119**(Pt 4): 615-23.
- Williams, R. et C. Henry (1947). "Nephrogenic Diabetes Insipidus: Transmitted by Females and Appearing During Infancy in Males " *Annals of Internal Medicine* **27**: 84-95.
- Winchester, B., A. Vellodi et E. Young (2000). "The molecular basis of lysosomal storage diseases and their treatment." *Biochem Soc Trans* **28**(2): 150-4.
- Wormald, M. R., A. J. Petrescu, Y. L. Pao, A. Glithero, T. Elliott et R. A. Dwek (2002). "Conformational studies of oligosaccharides and glycopeptides: complementarity of NMR, X-ray crystallography, and molecular modelling." *Chem Rev* **102**(2): 371-86.
- Wu, G., G. Zhao et Y. He (2003). "Distinct pathways for the trafficking of angiotensin II and adrenergic receptors from the endoplasmic reticulum to the cell surface: Rab1-independent transport of a G protein-coupled receptor." *J Biol Chem* **278**(47): 47062-9.
- Wu, G. C., H. L. Lai, Y. W. Lin, Y. T. Chu et Y. Chern (2001). "N-glycosylation and residues Asn805 and Asn890 are involved in the functional properties of type VI adenylyl cyclase." *J Biol Chem* **276**(38): 35450-7.
- Wu, S., M. Birnbaumer et Z. Guan (2008). "Phosphorylation analysis of G protein-coupled receptor by mass spectrometry: identification of a phosphorylation site in V2 vasopressin receptor." *Anal Chem* **80**(15): 6034-7.
- Wu, Y., M. T. Swulius, K. W. Moremen et R. N. Sifers (2003). "Elucidation of the molecular logic by which misfolded alpha 1-antitrypsin is preferentially selected for degradation." *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**(14): 8229-34.
- Wuller, S., B. Wiesner, A. Loffler, J. Furkert, G. Krause, R. Hermosilla, M. Schaefer, R. Schulein, W. Rosenthal et A. Oksche (2004). "Pharmacochaperones post-translationally enhance cell surface expression by increasing conformational stability of wild-type and mutant vasopressin V2 receptors." *J Biol Chem* **279**(45): 47254-63.
- Wurch, T., A. Matsumoto et P. J. Pauwels (2001). "Agonist-independent and -dependent oligomerization of dopamine D(2) receptors by fusion to fluorescent proteins." *FEBS Lett* **507**(1): 109-13.
- Xiao, R. P., H. Cheng, Y. Y. Zhou, M. Kuschel et E. G. Lakatta (1999). "Recent advances in cardiac beta(2)-adrenergic signal transduction." *Circ Res* **85**(11): 1092-100.
- Xu, J., J. He, A. M. Castleberry, S. Balasubramanian, A. G. Lau et R. A. Hall (2003). "Heterodimerization of alpha 2A- and beta 1-adrenergic receptors." *J Biol Chem* **278**(12): 10770-7.
- Yagil, Y. (1990). "Interaction of adenosine with vasopressin in the inner medullary collecting duct." *Am J Physiol* **259**(4 Pt 2): F679-87.
- Yamada, T., Y. Terada, M. K. Homma, H. Nonoguchi, S. Sasaki, Y. Yuasa, K. Tomita et F. Marumo (1995). "AVP inhibits EGF-stimulated MAP kinase cascade in Madin-Darby canine kidney cells." *Kidney Int* **48**(3): 745-52.

- Yamaguchi, S., S. Umemura, K. Tamura, T. Iwamoto, N. Nyui, T. Ishigami et M. Ishii (1995). "Adenosine A1 receptor mRNA in microdissected rat nephron segments." Hypertension **26**(6 Pt 2): 1181-5.
- Yan, A. et W. J. Lennarz (2005). "Unraveling the mechanism of protein N-glycosylation." J Biol Chem **280**(5): 3121-4.
- Yang, D. S., C. M. Yip, T. H. Huang, A. Chakrabartty et P. E. Fraser (1999). "Manipulating the amyloid-beta aggregation pathway with chemical chaperones." J Biol Chem **274**(46): 32970-4.
- Yang, Y. et Z. Li (2005). "Roles of heat shock protein gp96 in the ER quality control: redundant or unique function?" Mol Cells **20**(2): 173-82.
- Yarus, M. (1979). "The accuracy of translation." Prog Nucleic Acid Res Mol Biol **23**: 195-225.
- Ye, Y., H. H. Meyer et T. A. Rapoport (2001). "The AAA ATPase Cdc48/p97 and its partners transport proteins from the ER into the cytosol." Nature **414**(6864): 652-6.
- Ye, Y., H. H. Meyer et T. A. Rapoport (2003). "Function of the p97-Ufd1-Npl4 complex in retrotranslocation from the ER to the cytosol: dual recognition of nonubiquitinated polypeptide segments and polyubiquitin chains." J Cell Biol **162**(1): 71-84.
- Ye, Y., Y. Shibata, M. Kikkert, S. van Voorden, E. Wiertz et T. A. Rapoport (2005). "Inaugural Article: Recruitment of the p97 ATPase and ubiquitin ligases to the site of retrotranslocation at the endoplasmic reticulum membrane." Proc Natl Acad Sci U S A **102**(40): 14132-8.
- Ye, Y., Y. Shibata, C. Yun, D. Ron et T. A. Rapoport (2004). "A membrane protein complex mediates retro-translocation from the ER lumen into the cytosol." Nature **429**(6994): 841-7.
- Yen, C., L. Green et C. G. Miller (1980). "Degradation of intracellular protein in Salmonella typhimurium peptidase mutants." J Mol Biol **143**(1): 21-33.
- Yip, K. P. (2002). "Coupling of vasopressin-induced intracellular Ca²⁺ mobilization and apical exocytosis in perfused rat kidney collecting duct." J Physiol **538**(Pt 3): 891-9.
- Yoshida, H., T. Yoshizawa, F. Shibasaki, S. Shoji et I. Kanazawa (2002). "Chemical chaperones reduce aggregate formation and cell death caused by the truncated Machado-Joseph disease gene product with an expanded polyglutamine stretch." Neurobiol Dis **10**(2): 88-99.
- Younkin, S. G. (1998). "The role of A beta 42 in Alzheimer's disease." J Physiol Paris **92**(3-4): 289-92.
- Zelenina, M., B. M. Christensen, J. Palmer, A. C. Nairn, S. Nielsen et A. Aperia (2000). "Prostaglandin E(2) interaction with AVP: effects on AQP2 phosphorylation and distribution." Am J Physiol Renal Physiol **278**(3): F388-94.
- Zerbe, R., L. Stropes et G. Robertson (1980). "Vasopressin function in the syndrome of inappropriate antidiuresis." Annu Rev Med **31**: 315-27.
- Zhou, S. F., Y. M. Di, E. Chan, Y. M. Du, V. D. Chow, C. C. Xue, X. Lai, J. C. Wang, C. G. Li, M. Tian et W. Duan (2008). "Clinical pharmacogenetics and potential application in personalized medicine." Curr Drug Metab **9**(8): 738-84.
- Zhu, C. C., L. B. Cook et P. M. Hinkle (2002). "Dimerization and phosphorylation of thyrotropin-releasing hormone receptors are modulated by agonist stimulation." J Biol Chem **277**(31): 28228-37.