

**Direction des bibliothèques**

**AVIS**

Ce document a été numérisé par la Division de la gestion des documents et des archives de l'Université de Montréal.

L'auteur a autorisé l'Université de Montréal à reproduire et diffuser, en totalité ou en partie, par quelque moyen que ce soit et sur quelque support que ce soit, et exclusivement à des fins non lucratives d'enseignement et de recherche, des copies de ce mémoire ou de cette thèse.

L'auteur et les coauteurs le cas échéant conservent la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent ce document. Ni la thèse ou le mémoire, ni des extraits substantiels de ce document, ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans l'autorisation de l'auteur.

Afin de se conformer à la Loi canadienne sur la protection des renseignements personnels, quelques formulaires secondaires, coordonnées ou signatures intégrées au texte ont pu être enlevés de ce document. Bien que cela ait pu affecter la pagination, il n'y a aucun contenu manquant.

**NOTICE**

This document was digitized by the Records Management & Archives Division of Université de Montréal.

The author of this thesis or dissertation has granted a nonexclusive license allowing Université de Montréal to reproduce and publish the document, in part or in whole, and in any format, solely for noncommercial educational and research purposes.

The author and co-authors if applicable retain copyright ownership and moral rights in this document. Neither the whole thesis or dissertation, nor substantial extracts from it, may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms, contact information or signatures may have been removed from the document. While this may affect the document page count, it does not represent any loss of content from the document.

Université de Montréal

Effets du *myo*-inositol sur la perméabilité à l'eau d'ovocytes de *Xenopus laevis*  
exprimant les formes native et mutée D150E de l'aquaporine-2

par

Yoann Lussier

Département de Physiologie  
Faculté de Médecine

Octobre 2007

© Yoann Lussier

Université de Montréal  
Faculté des études supérieures



Ce mémoire intitulé :

Effets du *myo*-inositol sur la perméabilité à l'eau d'ovocytes de *Xenopus laevis*  
exprimant les formes native et mutée D150E de l'aquaporine-2

est présenté par :

Yoann Lussier

et a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Dr Alfred Berteloot  
Président-rapporteur

Dr Daniel G. Bichet  
Directeur de recherche

Dr Jean-Yves Lapointe  
Co-directeur de recherche

Dr Jean-Louis Schwartz  
Membre du jury

## Résumé

Le repliement correct d'une protéine et son acheminement vers le bon compartiment cellulaire sont nécessaires au fonctionnement d'une protéine. Lorsque mal repliée, la protéine peut rester dans le réticulum endoplasmique ou être dirigée vers le protéasome pour sa dégradation, le sort réservé aux protéines mutantes. L'aquaporine-2 est un pore à eau dont les défauts de fonctionnement conduisent à une forme de diabète insipide néphrogénique. Les composés comme le *myo*-inositol pourraient jouer un rôle de chaperonne chimique et aider au repliement de certaines protéines mutées comme le CFTR- $\Delta$ F508. La présente étude vise à déterminer si le *myo*-inositol peut aider le mutant AQP2-D150E à atteindre la membrane plasmique après expression dans les ovocytes de *Xenopus laevis*. La présence de *myo*-inositol à une concentration de 500  $\mu$ M dans le milieu extracellulaire conduit à une augmentation de 50 % de la perméabilité à l'eau des ovocytes exprimant l'AQP2-D150E. Comparativement, l'injection intracellulaire de *myo*-inositol n'altère aucunement l'activité membranaire du mutant AQP2-D150E, démontrant ainsi qu'il ne s'agit pas d'un effet de chaperonne chimique. L'effet d'augmentation de fonctionnalité, observé sur la perméabilité à l'eau et dû au *myo*-inositol extracellulaire, est spécifique à l'AQP2-D150E en comparaison aux AQP2 native ou portant la mutation G196D. La concentration de *myo*-inositol augmentant de moitié la perméabilité à l'eau d'ovocytes exprimant l'AQP2-D150E est d'environ 130  $\mu$ M, une concentration physiologique. En comparaison à d'autres osmolytes (bétaine, glycérol, taurine, *D-chiro*-inositol, *L-chiro*-inositol), seul le *myo*-inositol stimule la perméabilité à l'eau des ovocytes exprimant l'AQP2-D150E. Toutefois, le mécanisme d'action du *myo*-inositol extracellulaire n'a pas encore été élucidé.

**Mots-clés :** aquaporine-2, AQP2-D150E, CFTR, *myo*-inositol, osmolyte, chaperonne, repliement protéique, diabète insipide néphrogénique, médullaire rénale.

## Abstract

The correct folding of a protein and its targeting to the proper cellular compartment are necessary for the function of a protein. When a protein doesn't fold correctly it will stay in the endoplasmic reticulum or may be sent to the proteasome for degradation. This is what awaits mutant proteins AQP2-D150E and cystic fibrosis CFTR- $\Delta$ F508. Aquaporin-2 is a water pore that confers nephrogenic diabetes insipidus when impaired in its functionality. Nephrogenic diabetes insipidus is accompanied by a water reabsorption decrease in the renal medulla. Recently, studies have shown that molecules such as *myo*-inositol have chemical chaperone properties in assisting protein folding as was the case for CFTR- $\Delta$ F508. This study's aim is to evaluate if *myo*-inositol promotes AQP2-D150E to the plasma membrane in *Xenopus laevis* oocytes. At a concentration of 500  $\mu$ M in the extracellular medium, *myo*-inositol increases by 50 % the water permeability of oocytes expressing AQP2-D150E. Contrastingly, internally-injected *myo*-inositol doesn't modify AQP2-D150E's water permeability, thus not behaving as a chemical chaperone. This external effect *myo*-inositol has on AQP2-D150E is specific because it modifies neither the wild-type nor the mutant AQP2-G196D's water permeability. The concentration of *myo*-inositol showing a 50 % increase of AQP2-D150E's functionality in oocytes is in the order of 130  $\mu$ M, which is a physiologic concentration. *Myo*-inositol action is also stereospecific because other osmolytes (betain, glycerol, taurine, *D-chiro*-inositol or *L-chiro*-inositol) do not exert the same effect. Unfortunately, the pathway that external *myo*-inositol uses to do its effect has not been resolved yet.

**Keywords** : aquaporin-2, AQP2-D150E, CFTR, *myo*-inositol, osmolyte, chaperone, protein folding, nephrogenic diabetes insipidus, renal medulla.

## Table des matières

|  |            |
|--|------------|
| <b>RÉSUMÉ .....</b>  | <b>III</b> |
| <b>ABSTRACT.....</b>   | <b>IV</b>  |
| <b>TABLE DES MATIÈRES.....</b>   | <b>V</b>   |
| <b>LISTE DES FIGURES .....</b>   | <b>IX</b>  |
| <b>LISTE DES TABLEAUX.....</b>   | <b>XI</b>  |
| <b>LISTE DES ABRÉVIATIONS .....</b>  | <b>XII</b> |
| <b>REMERCIEMENTS .....</b>   | <b>XVI</b> |
| <b>1. INTRODUCTION.....</b>  | <b>1</b>   |
| <b>1.1. SYNTHÈSE, CIBLAGE ET CONTRÔLE DE QUALITÉ DES PROTÉINES.....</b>    | <b>1</b>   |
| 1.1.1. SYNTHÈSE ET CIBLAGE DES PROTÉINES.....                              | 1          |
| 1.1.2. CONTRÔLE DE QUALITÉ DES PROTÉINES.....                              | 2          |
| 1.1.3. MALADIES CAUSÉES PAR UN MAUVAIS REPLIEMENT PROTÉIQUE .....          | 5          |
| 1.1.4. CHAPERONNES ASSOCIÉS AU RÉTICULUM ENDOPLASMIQUE.....                | 7          |
| 1.1.4.1. Vue d'ensemble.....   | 7          |
| 1.1.4.2. Les lectines et la N-glycosylation.....                           | 7          |
| 1.1.4.3. Autres systèmes de repliement protéique .....                     | 10         |
| 1.1.4.4. Chaperonnes d'adressage .....                                     | 10         |
| 1.1.5. SYSTÈMES DE DÉGRADATION PROTÉIQUE .....                             | 11         |
| 1.1.5.1. Vue d'ensemble.....   | 11         |
| 1.1.5.2. Dégradation lysosomiale .....                                     | 11         |
| 1.1.5.3. Dégradation assistée par le RE (ERAD).....                        | 12         |
| <b>1.2. CORRECTION DES PROBLÈMES DE REPLIEMENT ET DE CIBLAGE .....</b>     | <b>13</b>  |
| 1.2.1. CHAPERONNES PHARMACOLOGIQUES .....                                  | 13         |
| 1.2.2. CHAPERONNES CHIMIQUES.....  | 15         |
| <b>1.3. AQUAPORINES .....</b>  | <b>17</b>  |
| 1.3.1. LE TRANSPORT DE L'EAU.....  | 17         |
| 1.3.2. CARACTÉRISTIQUES DES AQUAPORINES.....                               | 18         |
| 1.3.3. LOCALISATION DES AQPS DU REIN PERMETTANT LA RÉABSORPTION D'EAU..... | 19         |
| 1.3.4. STRUCTURE DES AQUAPORINES.....                                      | 20         |

|   |           |
|---|-----------|
| 1.3.5. SYNTHÈSE ET CIBLAGE DE L'AQP2.....   | 22        |
| 1.3.6. RÉGULATION PAR L'AVP.....  | 24        |
| 1.3.7. DIABÈTE INSIPIDE NÉPHROGÉNIQUE.....  | 24        |
| 1.3.8. MUTATIONS DE L'AQP2.....   | 25        |
| 1.3.8.1. Destinée des mutants de l'AQP2.....  | 25        |
| 1.3.8.2. Mutants AQP2-D150E et AQP2-G196D.....  | 28        |
| <b>1.4. RÉGULATEUR DE CONDUCTANCE TRANSMEMBRANAIRE DE LA FIBROSE KYSTIQUE (CFTR).....</b> | <b>29</b> |
| 1.4.1. CARACTÉRISTIQUES DU CFTR.....  | 29        |
| 1.4.2. MUTATIONS DU CFTR.....   | 31        |
| 1.4.3. CFTR-ΔF508.....  | 32        |
| <b>1.5. MYO-INOSITOL.....</b>   | <b>33</b> |
| 1.5.1. STRUCTURE ET FAMILLE DES INOSITOLS.....  | 33        |
| 1.5.2. ABSORPTION ET SYNTHÈSE.....  | 34        |
| 1.5.2.1. Consommation d'inositol.....   | 34        |
| 1.5.2.2. Synthèse et catabolisme des inositols.....                                       | 34        |
| 1.5.2.3. Présence au cerveau.....   | 35        |
| 1.5.3. MODES DE TRANSPORTS.....   | 35        |
| 1.5.3.1. Les cotransporteurs Na <sup>+</sup> - <i>myo</i> -inositol (SMIT).....           | 35        |
| 1.5.3.2. Cotransporteur H <sup>+</sup> - <i>myo</i> -inositol (HMIT).....                 | 36        |
| 1.5.4. RÔLES PHYSIOLOGIQUES.....  | 37        |
| 1.5.4.1. Besoins nutritionnels et corporels.....  | 37        |
| 1.5.4.2. Rôles en tant que molécule signalisatrice et second messenger.....               | 37        |
| 1.5.4.3. Rôles en tant qu'osmolyte compatible.....  | 38        |
| 1.5.4.4. Rôles en tant que chaperonne chimique.....                                       | 39        |
| <b>1.6. HYPOTHÈSES ET OBJECTIFS.....</b>  | <b>42</b> |
| <b>2. MATÉRIEL ET MÉTHODES.....</b>   | <b>44</b> |
| 2.1. SYNTHÈSE DES ARNC MUTÉS.....   | 44        |
| 2.2. PRÉPARATION ET CONSERVATION DES OVOCYTES.....  | 44        |
| 2.3. INJECTION DES OVOCYTES.....  | 46        |
| 2.4. IMMUNOFLUORESCENCE.....  | 46        |
| 2.5. MILIEUX D'INCUBATION DES OVOCYTES.....   | 47        |
| 2.6. PERMÉABILITÉ À L'EAU (VOLUMÉTRIE).....   | 48        |

|  |           |
|--|-----------|
| <b>2.7. ENREGISTREMENTS ÉLECTROPHYSIOLOGIQUES</b> .....  | <b>50</b> |
| <b>2.8. IMMUNOBUVARDAGE DE TYPES WESTERN</b> .....   | <b>51</b> |
| 2.8.1. PRÉPARATION DES ÉCHANTILLONS .....  | 51        |
| 2.8.2. ÉLECTROPHORÈSE, TRANSFERT ET IMMUNOBUVARDAGE.....   | 52        |
| <b>2.9. ABSORPTION DE <i>MYO</i>-INOSITOL RADIOACTIF</b> .....   | <b>54</b> |
| <b>2.10. ANALYSES</b> .....  | <b>54</b> |
| <b>3. RÉSULTATS</b> .....  | <b>56</b> |
| <b>3.1. EXPRESSION DES FORMES NATIVE ET MUTÉES DE L’AQP2</b> .....   | <b>56</b> |
| 3.1.1. IMMUNOFLUORESCENCE.....   | 56        |
| 3.1.2. PERMÉABILITÉS MEMBRANAIRES .....  | 57        |
| <b>3.2. EFFET DU <i>MYO</i>-INOSITOL SUR L’EXPRESSION DES FORMES NATIVE ET MUTÉES DE L’AQP2</b> .....  | <b>59</b> |
| 3.2.1. EN PRÉSENCE DE SMIT2.....   | 59        |
| 3.2.2. REPRODUCTIBILITÉ ET SPÉCIFICITÉ DE LA FONCTION DE L’AQP2-D150E.....   | 64        |
| <b>3.3. CARACTÉRISATION DE L’EFFET DU <i>MYO</i>-INOSITOL SUR LA PERMÉABILITÉ À L’EAU D’OVOCYTES EXPRIMANT LE MUTANT D150E DE L’AQP2</b> ..... | <b>67</b> |
| 3.3.1. INFLUENCE DE LA CONCENTRATION EN <i>MYO</i> -INOSITOL.....  | 67        |
| 3.3.2. SPÉCIFICITÉ DU <i>MYO</i> -INOSITOL COMPARATIVEMENT À D’AUTRES OSMOLYTES COMPATIBLES.....   | 68        |
| 3.3.3. SPÉCIFICITÉ POUR LE MUTANT D150E DE L’AQP2 COMPARATIVEMENT AU MUTANT CFTR- $\Delta$ F508 .....  | 71        |
| 3.3.4. EFFET DE L’AMPC.....  | 71        |
| 3.3.5. EFFET DE L’URÉE .....   | 73        |
| 3.3.6. MODIFICATION DU PROFIL DE MIGRATION ÉLECTROPHORÉTIQUE .....   | 74        |
| <b>4. DISCUSSION</b> .....   | <b>77</b> |
| <b>4.1. MISE EN CONTEXTE</b> .....   | <b>77</b> |
| <b>4.2. PROFIL DE L’EXPRESSION ET DE LA FONCTION DE L’AQP2</b> .....   | <b>77</b> |
| <b>4.3. DISCUSSION DE L’EFFET DU MI SUR L’EXPRESSION DE L’AQP2</b> .....   | <b>78</b> |
| 4.3.1. EFFET INTRACELLULAIRE .....   | 78        |
| 4.3.2. EFFET EXTRACELLULAIRE .....   | 79        |
| <b>4.4. SPÉCIFICITÉ DE L’EFFET DU <i>MYO</i>-INOSITOL</b> .....  | <b>80</b> |
| <b>4.5. MODES D’ACTION POSSIBLES DU <i>MYO</i>-INOSITOL SUR LE MUTANT D150E DE L’AQP2</b> .....  | <b>82</b> |



|  |           |
|--|-----------|
| 4.5.1. ACTION PAR L'INTERMÉDIAIRE D'UN MÉCANISME DE SIGNALISATION<br>INTRACELLULAIRE ..... | 82        |
| 4.5.2. ACTION PROTECTRICE FACE À LA PRÉSENCE D'URÉE.....                                   | 83        |
| 4.5.3. MODE D'ACTION SUGGÉRÉ PAR LES ANALYSES EN IMMUNOBUVARDAGE .....                     | 84        |
| <b>5. CONCLUSION &amp; PERSPECTIVES .....</b>  | <b>86</b> |
| <b>5.1. CONCLUSIONS .....</b>  | <b>86</b> |
| <b>5.2. PERSPECTIVES.....</b>  | <b>86</b> |
| <b>BIBLIOGRAPHIE .....</b>   | <b>88</b> |

## Liste des figures

|   |           |
|---|-----------|
| <b>Figure 1.1. Schéma de la maturation et de la dégradation protéique (d'après Trombetta et Parodi, 2003).....</b>  | <b>4</b>  |
| <b>Figure 1.2. Schéma de la glycosylation au niveau du RE (d'après Helenius et Aebi, 2001).....</b>   | <b>8</b>  |
| <b>Figure 1.3. Cycle chaperonique au niveau du RE (d'après Helenius et Aebi, 2001).....</b>   | <b>9</b>  |
| <b>Figure 1.4. Carte tridimensionnelle hypothétique de l'aquaporine-2 (d'après Schenk et al., 2005). ....</b>   | <b>20</b> |
| <b>Figure 1.5. Alignement de séquence des aquaporines.....</b>  | <b>22</b> |
| <b>Figure 1.6. Représentation schématique d'une cellule principale du canal collecteur rénal et des éléments qui conduisent à la réabsorption transcellulaire de l'eau. (d'après Bichet, 2006a). ....</b> | <b>23</b> |
| <b>Figure 1.7. Représentation schématique de la structure secondaire de l'AQP2 (d'après Bichet, 2006c). ....</b>  | <b>26</b> |
| <b>Figure 1.8. Perméabilité à l'eau des ovocytes exprimant les formes native et mutées de l'aquaporine-2 (d'après Guyon, 2004).....</b>   | <b>29</b> |
| <b>Figure 1.9. Représentation schématique du CFTR (d'après Loo et al., 2005)...</b>   | <b>30</b> |
| <b>Figure 1.10. Structure des stéréoisomères de l'inositol (d'après Moris, 2006)..</b>  | <b>33</b> |
| <b>Figure 2.1 Appareillage servant à la mesure de volume chez les ovocytes. ....</b>  | <b>49</b> |
| <b>Figure 2.2 Enregistrement des variations de volume d'un ovocyte.....</b>   | <b>50</b> |
| <b>Figure 3.1. Localisation des formes native (wt) et mutées de l'AQP2 dans les ovocytes.....</b>   | <b>57</b> |
| <b>Figure 3.2. Réponse des ovocytes exprimant les AQP2 native et mutées à un choc hypotonique de 20 mOsmol. ....</b>  | <b>58</b> |
| <b>Figure 3.3. Transport du <i>myo</i>-inositol sur des ovocytes exprimant ou non SMIT2.....</b>  | <b>60</b> |
| <b>Figure 3.4. Effet du <i>myo</i>-inositol sur l'expression ovocytaire des formes native et mutées de l'AQP2 en présence de SMIT2.....</b>   | <b>62</b> |
| <b>Figure 3.5 Effet du <i>myo</i>-inositol intracellulaire sur l'expression ovocytaire de l'AQP2-D150E. ....</b>  | <b>63</b> |

|   |           |
|---|-----------|
| <b>Figure 3.6. Effet du <i>myo</i>-inositol sur les AQP2 mutées et native exprimées dans des ovocytes.....</b>  | <b>65</b> |
| <b>Figure 3.7. Distribution des données de l'effet du <i>myo</i>-inositol sur l'AQP2-D150E. ....</b>  | <b>66</b> |
| <b>Figure 3.8. Courbe dose-réponse de l'effet du <i>myo</i>-inositol extracellulaire.....</b>   | <b>68</b> |
| <b>Figure 3.9. Effet de divers osmolytes sur l'expression d'AQP2-D150E dans les ovocytes.....</b>   | <b>70</b> |
| <b>Figure 3.10. Effet de la forskoline sur l'expression de l'AQP2-D150E.....</b>  | <b>72</b> |
| <b>Figure 3.11. Effet du <i>myo</i>-inositol sur la capacité dénaturante de l'urée. ....</b>  | <b>74</b> |
| <b>Figure 3.12. Analyse par immunobuvardage de type Western des formes native (AQP2wt) et mutées (D150E et G196D) exprimées dans des ovocytes de <i>Xenopus laevis</i>.....</b> | <b>76</b> |

## Liste des tableaux

|  |          |
|--|----------|
| <b>Tableau 1.1. Maladies reliées à des défauts de maturation dans le RE (adapté de Aridor et Balch, 1999).....</b> | <b>6</b> |
|--|----------|

## Liste des abréviations

|            |  |
|------------|--|
| AC         | Adénylate Cyclase  |
| ADN        | Acide désoxyribonucléique  |
| ADNc       | Acide désoxyribonucléique clonal   |
| AMPc       | Adénosine monophosphate cyclique   |
| ARN        | Acide ribonucléique  |
| ARNc       | Acide ribonucléique clonal   |
| ARNm       | Acide ribonucléique messenger  |
| AQP        | Aquaporine   |
| AQP2-wt    | Aquaporine-2 de type sauvage   |
| ATP        | Adénosine triphosphate   |
| AVP        | Arginine-vasopressine  |
| AVPR2      | Arginine-vasopressin receptor 2, Récepteur de l'arginine vasopressine de type 2  |
| BBM        | Brush-border membrane, membrane en bordure en brosse   |
| BGT1       | Betaine/ <i>Gamma</i> -aminobutyric acid Transporter, cotransporteur bétaine/acide <i>gamma</i> -aminobutyrique                          |
| BiP        | Binding Protein, chaperonne trouvée dans le réticulum endoplasmique, nommée également grp78  |
| BSA        | Bovine Serum Albumin, albumine de sérum bovin  |
| CFTR       | Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator, régulateur de conductance transmembranaire de la fibrose kystique                   |
| CHIP28     | CHannel forming Integral Protein of 28 kDa, protéine intégrale de 28 kDa formant un canal maintenant connu sous le nom de AQP1           |
| CNX        | Calnexine  |
| COS-7 cell | African green monkey simian virus 40-transformed kidney cell, cellule rénales du singe vert d'Afrique transformée par le virus simien 40 |
| CRT        | Calréticuline  |
| $\Delta G$ | Gibbs energy, différence d'énergie de Gibbs  |
| DIN        | Nephrogenic Diabetes Insipidus, diabète insipide néphrogénique   |

|                  |   |
|------------------|---|
| Dlg              | <i>Drosophila discs-large</i> , Disque large de la drosophile   |
| ED <sub>50</sub> | Median effective dose, dose effective médiane   |
| EDTA             | Éthylènediaminetétraacétate   |
| ERAD             | Endoplasmic Reticulum-Associated Degradation, dégradation assistée par le réticulum endoplasmique   |
| ERGIC-53         | Endoplasmic Reticulum-Golgi Intermediate Compartment protein of 53 kDa, protéine du compartiment médiant le réticulum endoplasmique et le Golgi de 53 kDa   |
| ERp57            | Endoplasmic Reticulum protein-57, protéine-57 du réticulum endoplasmique  |
| G6P              | D-glucose-6-phosphate   |
| GFP              | Green Fluorescence Protein, protéine de fluorescence verte  |
| GPCR             | G Protein Coupled Receptor, récepteur couplé aux protéines G  |
| HbA              | Homogenization Buffer A, tampon d'homogénéisation de type A   |
| HFE              | Hereditary hemochromatosis protein, protéine d'hémochromatose héréditaire   |
| HMIT             | cotransporteur proton- <i>myo</i> -inositol   |
| HSD              | Honestly Significant Differences, différences franchement significatives  |
| Hsp70            | Heat Shock Protein 70, protéine de choc thermique de 70 kDa   |
| I3P              | D-inositol-3-phosphate  |
| IB3 cell         | Immortalized pseudotetraploid cystic fibrosis Bronchial epithelial cell, cellule immortalisée pseudotétraploïde de l'épithélium bronchique de mucoviscidose |
| IBMX             | 3-Isobutyl-1-Méthyl Xanthine  |
| IgG              | Immunoglobuline G   |
| Kir6.2           | Inward rectifying potassium channel 6.2, canal potassique à rectification entrante 6.2  |
| LED              | Light-Emitting Diode, diode à émission lumineuse  |
| MBSS             | MES-Buffered Saline for Silica, salin tamponné au MES pour silice   |

|                |  |
|----------------|--|
| MDCK           | Madin-Darby Canine Kidney cells, cellules rénales de chien Madin-Darby   |
| MDR-1          | Multi-Drug Resistance gene-1, produit du gène 1 de la résistance multi-drogue  |
| MES            | 2-(N-Morpholino)Ethane Sulfonic acid, acide 2-(N-Morpholino)éthane sulfonique  |
| mIMCD3 cell    | murine Inner Medullary Collecting Duct-3 cell, cellule murine du canal collecteur médullaire interne de type 3   |
| NBD            | Nucleotide-Binding Domain, domaine à liaison de nucléotide   |
| ORCC           | Outwardly Rectifying Cl <sup>-</sup> Channel, canal Cl <sup>-</sup> à rectification sortante   |
| P <sub>d</sub> | Perméabilité par diffusion   |
| P <sub>f</sub> | Perméabilité osmotique   |
| PBS            | phosphate-buffered saline  |
| PDI            | Protein Disulfide Isomerase, protéine disulfure isomérase  |
| PDZ            | PostSynaptic Density/Drosophila discs-large/ <i>Zona Occludens</i> , motif de type densité postsynaptique/disque large de la drosophile/ <i>Zona Occludens</i> |
| PKA            | Phosphorylase kinase A   |
| PSD            | Postsynaptic Density, densité postsynaptique   |
| RE             | Réticulum endoplasmique  |
| SDS            | Sodium dodécylsulfate  |
| Sec61          | protéine sécrétoire soluble-61   |
| SEM            | standard error of the mean, écart standard à la moyenne  |
| SMIT           | Cotransporteur sodium- <i>myo</i> -inositol  |
| SNC            | système nerveux central  |
| SUR1           | Sulfonyl-Urea Receptor-1, récepteur sulfonyl-urée-1  |
| TauT           | Taurine transporter, transporteur à taurine  |
| TBS            | Tris-Buffered Saline, salin tamponné au tris   |
| TonEBP         | Tonicity-responsive Element Binding Protein, protéine de liaison à l'élément de réponse à la tonicité  |
| Tris           | Trishydroxyméthylaminométhane  |

|     |   |
|-----|---|
| UPR | Unfolded Protein Response, systèmes de réponse au stress du réticulum endoplasmique |
| V2R | Vasopressin Receptor-2, récepteur à la vasopressine de type 2                       |
| ZO  | Zona Occludens  |



## Remerciements

Ce fut une belle entreprise d'effectuer une maîtrise sous la codirection des Dr. Daniel G. Bichet et Jean-Yves Lapointe que je remercie de m'avoir accueilli à bras ouverts. Dans le laboratoire, j'ai trouvé des gens dynamiques, intéressés et passionnés en plus d'être sympathiques et loufoques. Je voudrais remercier les personnes qui étaient présentes pour me soutenir tout au long de mon séjour de maîtrise, en particulier: Pierre, Karim, Sandra, Rym et Alexandre. De plus, bien d'autres individus m'ont rendu la vie au laboratoire plus agréable comme : Bernadette, Francis, François Charron, Maxime, Julie, Eugénie, Yolaine, Louis et Michel, sans qui venir travailler n'aurait pas été aussi plaisant.

Je voudrais porter une attention particulière aux personnes de grande importance qui m'ont supporté durant mon périple de maîtrise, et j'ai nommé mes parents, Yolande et Michel pour m'avoir soutenu dans mes études graduées et pour m'avoir donné un goût à l'étude en me poussant à persévérer dans cette voie.

Finalement, je veux dire un merci tout exceptionnel à ma femme, Beth, qui m'a supporté et encouragé dans les durs moments que sont la recherche et l'écriture et qui a su me reconforter quand j'avais besoin de sa présence. Elle a été une source d'inspiration pour moi car elle est calme, intelligente et compréhensive. Ces 3 années que j'ai passées à traverser la maîtrise n'auraient pas été aussi belles si je ne m'étais marié, si je n'avais continué à danser et si je n'étais déménagé à Montréal pour vivre avec Beth.

# **1. Introduction**

## **1.1. Synthèse, ciblage et contrôle de qualité des protéines**

### **1.1.1. Synthèse et ciblage des protéines**

Les protéines, macromolécules composées d'acides aminés qui résultent de la traduction du message génétique, sont présentes dans tous les organismes vivants où elles assurent l'essentiel des fonctions de la cellule, soient sous formes d'enzymes, de transporteurs membranaires, de récepteurs ou autres. Pour être biologiquement actives, chacune doit être exprimée en un endroit précis de la cellule où elle y est acheminée grâce à des signaux particuliers contenus dans la séquence peptidique. Les protéines faisant partie de la voie sécrétoire, c'est-à-dire celles qui sont sécrétées, membranaires ou résidentes dans une organelle, doivent traverser différents compartiments en partant de leur lieu de synthèse qu'est le réticulum endoplasmique (RE) (Römisch, 2005, Trombetta et Parodi, 2003). Ce type de protéines, par comparaison aux protéines cytoplasmiques, doit traverser plusieurs compartiments cellulaires dont la composition moléculaire diffère de l'un à l'autre. Une protéine membranaire sécrétoire nouvellement synthétisée contient un peptide signal, nécessaire pour l'enchâssement membranaire, qui est clivé à son insertion dans la membrane du RE après translocation à travers le complexe protéine sécrétoire soluble-61 (Sec61), un complexe enchâssé dans la membrane du RE permettant l'entrée d'une protéine néo-synthétisée dans la voie sécrétoire (Bron et al., 1998, Dalbey et al., 2000, Higy et al., 2004, Johnson et van Waes, 1999, Nicchitta, 2002).

À partir de son lieu de synthèse, la protéine sera dirigée vers son compartiment de résidence, soient l'appareil de Golgi, les endosomes, les lysosomes ou la membrane plasmique, dans lesquels elle demeurera ou cheminera pour poursuivre son chemin jusqu'à sa cible finale (Gorelick et Shugrue, 2001). Différentes séquences peptidiques ou modifications post-traductionnelles reconnues par des protéines résidant dans le RE ou l'appareil de Golgi permettent le triage des protéines sécrétoires vers leurs lieux de résidence. Ce tri protéique est permis par le

transport vésiculaire qui achemine les protéines d'une organelle à l'autre, un processus ayant fait l'objet de nombreuses revues dans la littérature. (Balch et al., 1984, Bonifacino et Glick, 2004, Novick et al., 1980, Rothman, 1996).

### **1.1.2. Contrôle de qualité des protéines**

Le RE, où la concentration protéique avoisine les 100 mg/ml, doit constamment évaluer la qualité des protéines qu'il synthétise à l'aide de chaperonnes qui réagissent à tout type de configurations non-natives (Hampton, 2002). Lorsque le processus d'aide au repliement fourni par les chaperonnes n'est plus apte à contrôler le niveau élevé de protéines mal repliées ou dépasse sa capacité de fonctionnement, des systèmes de réponse au stress (unfolded protein response; UPR) sont induits dans la cellule (Kaufman, 2002, Mori et al., 2000). Les protéines de contrôle du repliement s'accrochent aux protéines tronquées ou mutées en des positions qui interfèrent avec le repliement protéique. Elles peuvent ainsi faciliter la multimérisation et mener à une structure quaternaire fonctionnelle (Béguin et al., 2000, Hammond et Helenius, 1995). Le système de contrôle de qualité empêche aussi les protéines non-liées à un ligand spécifique ou n'ayant pas subi de modification post-traductionnelle (clivage du peptide signal, formation de ponts disulfures, N-glycosylations appropriées ou ancre glycoposphoinositide manquante) de quitter le RE (Trombetta et Parodi, 2003). Sont aussi interceptées les protéines qui ont une conformation native afin d'évaluer leur bon repliement et de réguler leur acheminement (Nishikawa et al., 2005). *De facto*, les protéines défectueuses sont prises en charge par le système de dégradation associé au contrôle de qualité. Autrement, les modifications conformationnelles ou post-traductionnelles subies dans le RE identifient les protéines à évaluer par le système de contrôle de qualité (Hampton, 2002).

La figure 1.1 dresse un aperçu succinct et schématisé du système de contrôle de qualité qui s'amorce dans le RE. En premier lieu, suivant l'état de repliement d'une protéine, celle-ci peut être conservée dans le RE, s'agrèger à d'autres peptides ou poursuivre son chemin si sa conformation native a été parachevée (Trombetta et

Parodi, 2003). Les protéines retenues dans le RE ont une période de temps déterminée pour adopter une conformation native, sinon elles seront détruites par le protéasome dans un processus appelé dégradation assistée par le RE ou ERAD (ER-associated degradation) (Römisch, 2005). Dans ce cas, elles sont transloquées vers le cytosol avant d'aboutir au protéasome (Kamhi-Nesher et al., 2001). En continuant leur route vers l'appareil de Golgi, les protéines mal repliées seront soit réacheminées vers le RE par un système de *cis*-vésiculation ou ciblées vers la dégradation lysosomiale (Schulein, 2004).

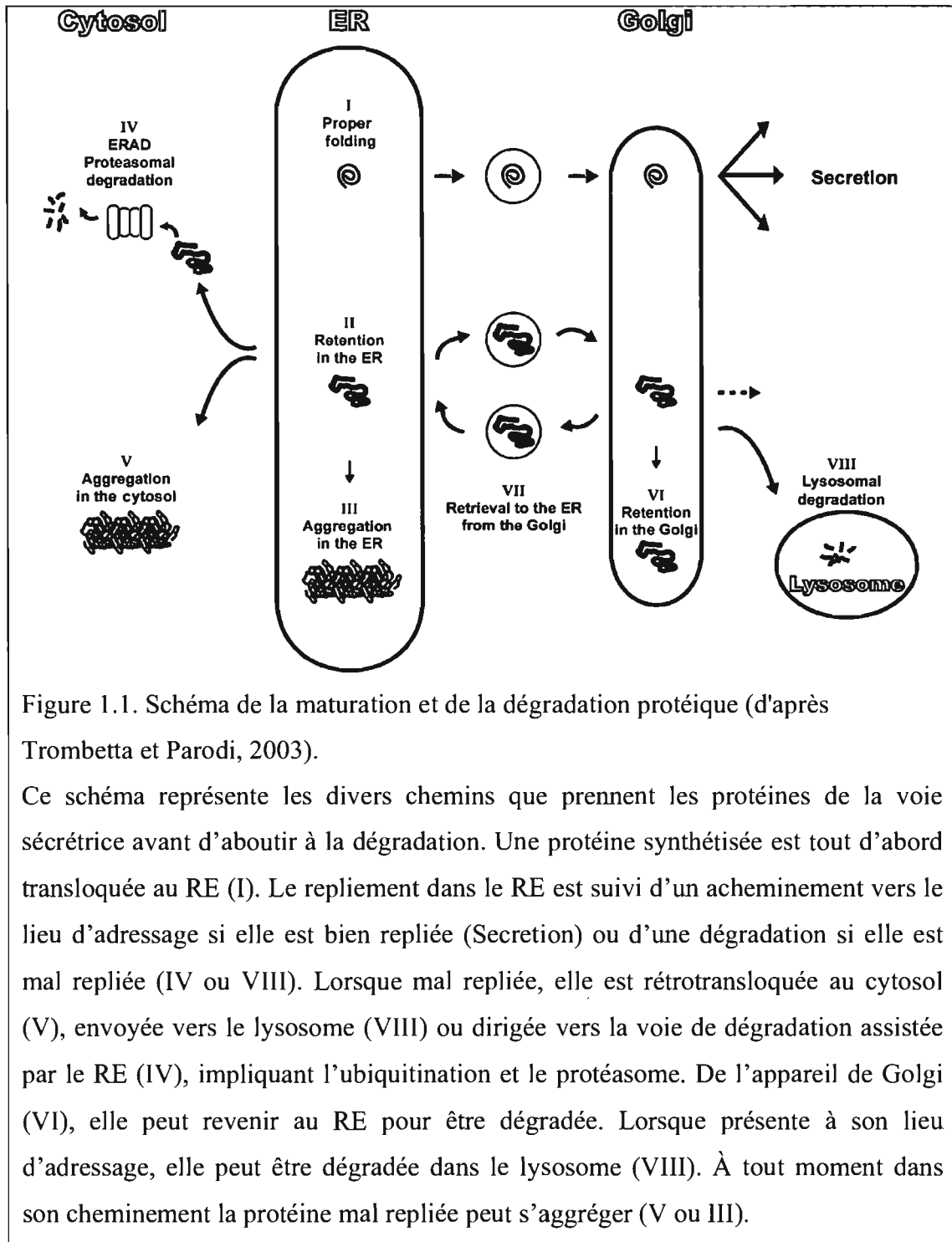


Figure 1.1. Schéma de la maturation et de la dégradation protéique (d'après Trombetta et Parodi, 2003).

Ce schéma représente les divers chemins que prennent les protéines de la voie sécrétrice avant d'aboutir à la dégradation. Une protéine synthétisée est tout d'abord transloquée au RE (I). Le repliement dans le RE est suivi d'un acheminement vers le lieu d'adressage si elle est bien repliée (Secretion) ou d'une dégradation si elle est mal repliée (IV ou VIII). Lorsque mal repliée, elle est rétrotransloquée au cytosol (V), envoyée vers le lysosome (VIII) ou dirigée vers la voie de dégradation assistée par le RE (IV), impliquant l'ubiquitination et le protéasome. De l'appareil de Golgi (VI), elle peut revenir au RE pour être dégradée. Lorsque présente à son lieu d'adressage, elle peut être dégradée dans le lysosome (VIII). À tout moment dans son cheminement la protéine mal repliée peut s'aggréger (V ou III).

### 1.1.3. Maladies causées par un mauvais repliement protéique

Parfois, la fonctionnalité d'une protéine peut être perturbée par un mauvais repliement au niveau du RE sans que cela n'amène de conséquence sur l'adressage, tandis qu'en d'autres temps, ce n'est pas le repliement qui est la cause du manque de fonctionnalité de la protéine mais tout simplement que celle-ci n'a pas été correctement acheminée vers son lieu d'action (Bernier et al., 2006). De multiples raisons peuvent exister pour expliquer ce mauvais adressage comme l'agrégation au niveau du RE, un mauvais repliement protéique ou une glycosylation non-appropriée. Le mauvais adressage vient *a priori* d'une mutation peptidique. Des mutations observées dans des protéines telles l'alpha1-antitrypsine mènent à l'emphysème ou à des maladies du foie (Qu et al., 1996). De même, un mutant du canal régulateur de conductance transmembranaire de la fibrose kystique (CFTR; Cystic Fibrosis Transmembrane Receptor), le  $\Delta F508$ , mène à la fibrose kystique (Kerem et al., 1989, Loo et al., 1998, Riordan et al., 1989, Rommens et al., 1989), alors que certains mutants de l'aquaporine-2 (AQP2) sont responsables du diabète insipide néphrogénique (DIN) (Bernier et al., 2006). D'autres maladies comme l'Alzheimer, le Creutzfeld-Jacob, le Parkinson et des formes de scléroses latérales amyotrophiques résultent de mutations qui provoquent un mauvais repliement ou une agrégation protéique induisant des problèmes d'adressage intracellulaire (Aridor et Balch, 1999, Perlmutter, 2002). Le Tableau 1.1 présente une liste non-exhaustive des maladies associées à des défauts de maturation supposément dus à un mauvais repliement dans le RE.

Tableau 1.1. Maladies reliées à des défauts de maturation dans le RE (adapté de Aridor et Balch, 1999).

| Maladie                                       | Protéine mal-repliée  |
|---|---|
| Fibrose kystique (mucoviscidose)              | régulateur de conductance transmembranaire de la fibrose kystique (CFTR; Cystic fibrosis transmembrane regulator) |
| Emphysème héréditaire                         | $\alpha$ 1-Antitrypsine   |
| Hémochromatose héréditaire                    | Protéine d'hémochromatose héréditaire (HFE).<br>Perte de liaison au récepteur transferrine                        |
| Déficience en Protéin C                       | Protéine C  |
| Facteurs V et VIII de la coagulation sanguine | protéine du compartiment médiant le réticulum endoplasmique et le Golgi de 53 kDa (ERGIC-53)                      |
| Angioœdème héréditaire de type I              | Complément C1   |
| Hypercholestérolémie familiale                | Récepteur à lipoprotéine de faible densité  |
| Chylomicronémie de type I                     | Lipoprotéine lipase, lipase active dans la circulation sanguine   |
| Abétalipoprotéïnémie                          | Protéine microsomale d'échange de triglycérides, sa cible est l'apolipoprotéine B                                 |
| Lipoprotéine (a)                              | Lipoprotein (a)   |
| Maladie des I-cell/Pseudo-Hurler              | N-acétylglucosamine phosphotransférase  |
| Mucopolysaccharidoses                         | Enzymes de maturation du lysosome   |
| Sandhof/Tay-Sachs                             | $\beta$ -Hexosaminidase   |
| Déficience congénitale en sucrase-isomaltase  | Sucrased-isomaltase   |
| Crigler-Najjar type II                        | Uridine diphosphate-glucoronyl-sialylc-transférase  |
| Polyendocrinopathie/Hyperinsulinémie          | Carboxypeptidase E  |
| Diabète mellitus                              | Récepteur à l'insuline  |
| Nanisme de Laron                              | Récepteur à l'hormone de croissance   |
| Déficience en myeloperoxydase                 | Myeloperoxydase   |
| Hypoparathyroïdisme primaire                  | Hormone préparathyroïde   |
| Mélanome                                      | Tyrosinase  |

## **1.1.4. Chaperonnes associés au réticulum endoplasmique**

### **1.1.4.1. Vue d'ensemble**

Au sein du système de contrôle de qualité, les mécanismes qui assurent le repliement des protéines glycosylées sont des lectines qui se collent aux chaînes de N-glycosylation des protéines (Parodi, 2000), telles les glucotransférases (Hammond et Helenius, 1993) et les chaperonnes s'attachant à des parties hydrophobes des entités protéiques (Hayer-Hartl et al., 1994, Lin et al., 1995). Les protéines disulfures isoméras (protein disulfide isomerase; PDI), menant à bien la formation des ponts disulfures, font aussi partie du contrôle de qualité puisque leur fonction de formation de ponts disulfures entre deux cystéines est crucial pour le bon repliement protéique et pour le cheminement dans la voie sécrétoire (Gillece et al., 1999, Molinari et Helenius, 1999, Wang et Chang, 2003). Le système de contrôle de qualité emploie aussi ces composantes pour la détermination et l'adressage d'une protéine vers la dégradation (Goldberg, 2003, Lomas et Parfrey, 2004, Schubert et al., 2000). À celles-ci peuvent être ajoutées des protéines faisant partie du signal UPR. Les protéines membranaires sont enchâssées dans un environnement stérique lipophile et, de ce fait, elles évitent habituellement le système des chaperonnes (Popot et Engelman, 2000).

### **1.1.4.2. Les lectines et la N-glycosylation**

La grande majorité des protéines sont glycosylées par l'oligosaccharyl transférase. Cette protéine ajoute un résidu N-glycosyl, provenant du dolichol-phosphate, sur le site consensus de N-glycosylation (-Asn-X-Ser/Thr-) (Helenius et Aebi, 2001, Moore, 1999) (voir figure 1.2). Cette N-glycosylation, prenant place dans le RE, permet l'ajout d'un sucre riche en mannose sur un résidu asparagine. Ce groupement glycosyl sera reconnu par le contrôle de qualité, qui décidera du futur de la protéine (Dupré et al., 2004).



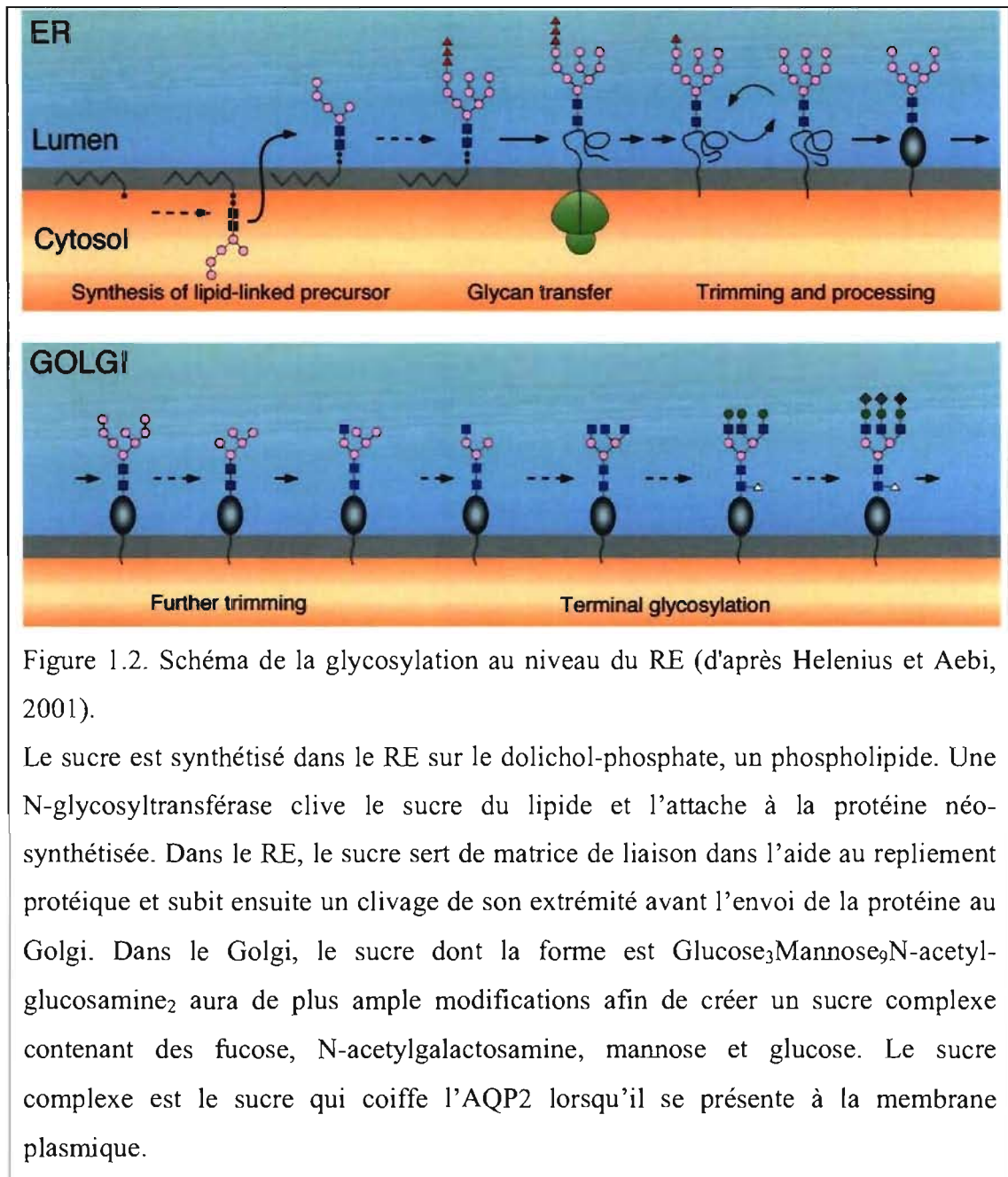


Figure 1.2. Schéma de la glycosylation au niveau du RE (d'après Helenius et Aebi, 2001).

Le sucre est synthétisé dans le RE sur le dolichol-phosphate, un phospholipide. Une N-glycosyltransférase clive le sucre du lipide et l'attache à la protéine néo-synthétisée. Dans le RE, le sucre sert de matrice de liaison dans l'aide au repliement protéique et subit ensuite un clivage de son extrémité avant l'envoi de la protéine au Golgi. Dans le Golgi, le sucre dont la forme est  $\text{Glucose}_3\text{Mannose}_9\text{N-acetylglucosamine}_2$  aura de plus ample modifications afin de créer un sucre complexe contenant des fucose, N-acetylgalactosamine, mannose et glucose. Le sucre complexe est le sucre qui coiffe l'AQP2 lorsqu'il se présente à la membrane plasmique.

Une protéine néo-synthétisée se replie alors sur elle-même pour adopter sa conformation native. C'est la présence de chaperonnes intraréticulaires qui la maintient dans le RE jusqu'à son repliement. La présence de N-glycosylation y facilite sa rétention en créant un site d'attache pour les lectines que sont la calnexine (CNX), protéine membranaire du RE, et la calréticuline (CRT), son homologue soluble (Ellgaard et Helenius, 2001, Hammond et Helenius, 1993, Ou et al., 1993).

Ces dernières ne peuvent s'attacher qu'à des groupements N-saccharidiques de protéines spécifiques où le sucre est monoglucosylé. Cette monoglucosylation est maintenue par un cycle de dé- et reglucosylation assuré par les glycosylase II ou reglucosylase qui reconnaissent diverses configurations non-natives de la protéine. L'oxydoréductase nommée protéine-57 du réticulum endoplasmique ou ERp57 (Endoplasmic Reticulum protein-57), liant les lectines CNX/CRT en leur domaine P, domaine qui est exposé en surface (Ellgaard et Helenius, 2001, Frickel et al., 2001, Oliver et al., 1999), agit comme PDI en catalysant la formation de ponts disulfures (Antoniou et al., 2002, Lindquist et al., 2001) (voir figure 1.3).

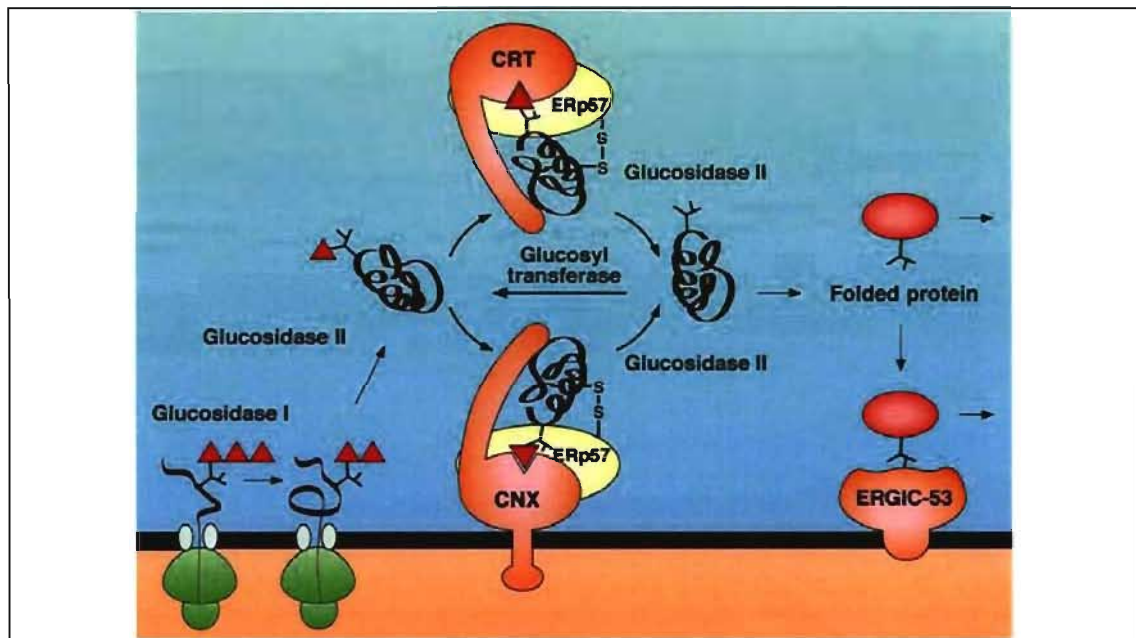


Figure 1.3. Cycle chaperonique au niveau du RE (d'après Helenius et Aebi, 2001).

Ce schéma décrit le cycle de glycosylation et déglycosylation faisant intervenir les enzymes glucosidase I, glucosidase II, glucosyltransférase et la protéine chaperonne calnexine (calréticuline). Sont aussi présent ERp57 (protéine-57 du réticulum endoplasmique), une protéine disulfure isomérase, en tant qu'entité attachée à la calnexine, une chaperonne se trouvant au RE se liant aux zones hydrophobes. Après avoir adopté une structure repliée, la protéine chemine vers le Golgi suite à une liaison à la protéine des compartiments intermédiaires RE-Golgi (ERGIC-53, ER-Golgi intermediate compartment protein), une lectine se liant aux protéines en conformation native pour les faire cheminer du RE au Golgi.

### **1.1.4.3. Autres systèmes de repliement protéique**

Tel que mentionné préalablement, PDI est une isomérase qui crée des ponts disulfures entre résidus cystéines, permettant ainsi aux protéines néosynthétisées d'adopter une structure adéquate. L'adoption de la structure tertiaire est facilitée par la formation de ponts intrachaînes alors que celle de la structure quaternaire l'est par la création de ponts interchaînes (Jessop et al., 2004). En plus de ces chaperonnes qui interagissent avec les groupements N-glycosylés, certaines reconnaissent les régions hydrophobes des protéines. C'est le cas de la protéine liante (binding protein; BiP), aussi connue sous le nom de grp78 qui facilite le repliement protéique en permettant aux zones hydrophobes d'interagir ensemble pour éviter ainsi l'apparition de conformations non-naturelles pouvant se former en un milieu aqueux (Foresti et al., 2003, Gething, 1999). Lorsque les protéines sont non-glycosylées, BiP est le seul acteur au niveau du repliement (Tsai et al., 2002). BiP amène aussi la protéine plus près de sa forme native en contrecarrant la formation d'agrégats (Flynn et al., 1991, Kabani et al., 2003).

### **1.1.4.4. Chaperonnes d'adressage**

Le repliement protéique assisté par les chaperonnes se termine par le cycle de déglucosylation impliquant la glycosidase II (Ellgaard et al., 1999, Frigerio et Lord, 2000). À moins que la protéine ne réside dans le RE, elle poursuit son chemin vers l'appareil de Golgi. C'est à ce niveau que s'effectue la dernière étape de contrôle de qualité des protéines issues du RE grâce au rôle de chaperonne exercé par ERGIC-53 qui permet leur envoi vers le Golgi et leur retour vers le RE en cas de nécessité (Hauri et al., 2000, Schrag et al., 2003, Velloso et al., 2002). Dans les citernes du Golgi, la protéine est tout d'abord partiellement déglycosylée avant l'ajout de nouveaux résidus glycosylés pour former un polysaccharide plus complexe (Agarraberes et Dice, 2001). Plusieurs revues font une description détaillée de la

déglycosylation et des autres processus post-transcriptionnels (de Graffenried et Bertozzi, 2004, Edge, 2003, Suzuki et al., 1995).

## **1.1.5. Systèmes de dégradation protéique**

### **1.1.5.1. Vue d'ensemble**

Malgré tous ces systèmes de contrôle de qualité des protéines, certaines ne seront quand même pas repliées de façon fonctionnelle et il y en a qui, même si elles sont bien repliées, ne doivent de toute façon résider dans la cellule que pour une durée finement déterminée (Lomas et Parfrey, 2004, Schubert et al., 2000). Afin que ces destinées soient assurées, la cellule a des mécanismes qui mènent à la dégradation protéique, l'aboutissement de toute protéine. Les mécanismes les plus connus font intervenir, lors de la dégradation, le protéasome, par la voie ERAD, ou le lysosome (Kolter et Sandhoff, 2005, Römisch, 2005).

### **1.1.5.2. Dégradation lysosomiale**

Une protéine bien ou mal repliée se rendant à la membrane plasmique peut quand même être dégradée. En aval du RE, cette dégradation fait intervenir le lysosome. Dans cette organelle à pH acide, il y a des hydrolases qui permettent le clivage des nucléotides, des protéines, des lipides, des sucres, des sulfates et même des phosphates (Ciechanover et Schwartz, 2004, Hunziker et Geuze, 1996, Winchester, 2001). La dégradation lysosomiale intervient dans quatre cas discutés dans la littérature. La microautophagie et la macroautophagie sont des dégradations de type général (Agarraberes et Dice, 2001), alors que, dans la dégradation médiée par une chaperonne, les protéines cytosoliques sont reconnues par la protéine de choc thermique de 70 kDa (hsp70, heat-shock protein-70), une protéine chaperonne répondant aux chocs thermiques que la cellule subie, et traversent la membrane du lysosome pour y être dégradées. Finalement, la dégradation précédée par l'endocytose, qui mène à une destruction de membrane plasmique et de milieu

extracellulaire, est médiée par un récepteur (Agarraberes et Dice, 2001, Terlecky et Dice, 1993). Par exemple, dans le cas du récepteur de l'hormone de croissance, celui-ci est internalisé suite à sa dimérisation induite par la liaison de l'hormone de croissance (van Kerkhof et Strous, 2001). Cette dégradation lysosomiale peut également être liée à une monoubiquitination (Marques et al., 2004). La monoubiquitination, où une molécule d'ubiquitine se lie à une protéine membranaire, est suivie de l'internalisation et de la dégradation sus-décrite (Hicke, 1999, Strous et Govers, 1999). Récemment, ce processus a été révisé où le lysosome agit en tant que destructeur non-spécifique des entités présentes à la membrane plasmique, c'est-à-dire que l'internalisation de matériel membranaire a pour seule fin de dégrader ce matériel (Kolter et Sandhoff, 2005, Mukherjee et Maxfield, 1999).

### **1.1.5.3. Dégradation assistée par le RE (ERAD)**

Les protéines échouant au test de contrôle de qualité sont envoyées vers l'ERAD. Certaines protéines bien repliées y sont également acheminées puisqu'une proportion de 30 % des protéines synthétisées s'y retrouve (Schubert et al., 2000). Pour éliminer la protéine à dégrader, l'ERAD fait intervenir l'ubiquitination et le protéasome 26S (Zhang et Kaufman, 2004). Ces protéines doivent être transloquées du RE vers le cytosol au travers de Sec61 et, pour ce faire, doivent en outre être solubles, non-complexées et ne plus contenir de ponts disulfures (Fiebigler et al., 2002, Sevilla et al., 2004, Zietkiewicz et al., 2004). Pour une protéine membranaire, le marquage pour la dégradation se fait à l'aide de protéines cytosoliques (Taxis et al., 2003). Il a été démontré que c'est la localisation du défaut protéique qui détermine si la protéine est un substrat pour l'ERAD (Vashist et Ng, 2004, Zhang et al., 2001). Pour appuyer cette idée, des chercheurs ont fait valoir que ce sont les domaines cytosoliques qui sont évalués en premier lieu par les chaperonnes (Vashist et Ng, 2004).

Pour la dégradation, PDI est nécessaire au clivage des ponts disulfures d'une protéine avant son envoi vers le cytosol et le protéasome (Fagioli et al., 2001, Tortorella et al., 1998, Tsai et al., 2001). Les protéines qui n'adoptent pas leur

structure quaternaire appropriée subissent fréquemment l'agrégation dans le RE. BiP et les protéines à domaine J, un type de chaperonne récemment décrite, tentent de désagréger les protéines, sans quoi elles aboutissent à l'ERAD (Kabani et al., 2003, Nishikawa et al., 2001).

La dégradation de type ERAD intervient par ailleurs pour réguler la durée de vie d'une protéine native (Bonifacino et Weissman, 1998, Brodsky et McCracken, 1999, Plemper et Wolf, 1999). Dans la majorité des cas, l'ubiquitination précède la dégradation faisant intervenir le protéasome 26S, complexe multiprotéique qui a pour fonction de cliver les protéines en acides aminés (Nandi et al., 2006). L'ubiquitination est une modification post-traductionnelle par laquelle une molécule d'ubiquitine, une unité protéique de 76 acides aminés, est attachée à une protéine (Nandi et al., 2006). Lors de la monoubiquitination, une unité d'ubiquitine forme un lien isopeptidique entre son groupe  $\alpha$ -carboxyl de l'extrémité C-terminale du résidu glycine et le groupement  $\epsilon$ -amino d'une lysine de la protéine-cible (Smalle et Vierstra, 2004). La polyubiquitination s'opère de la même façon mais, dans ce cas-ci, les molécules d'ubiquitine s'attachent entre elles pour former un trimère ou un tétramère qui sera rattaché à la protéine-cible (Smalle et Vierstra, 2004). Cet attachement mène à la dégradation, sauf pour une ubiquitination sur la lysine K63 (Hofmann et Pickart, 1999, Spence et al., 1995). Malgré l'aboutissement habituel des protéines ubiquitinées à la dégradation, certaines ubiquitinations peuvent amener les protéines à adopter différents rôles dans la cellule (Hicke, 2001, Katzmann et al., 2002).

## **1.2. Correction des problèmes de repliement et de ciblage**

### **1.2.1. Chaperonnes pharmacologiques**

En raison des nombreuses maladies qui sont associées à un mauvais repliement protéique, Welsh et al. (1993) ont orienté leurs recherches vers le sauvetage du mutant défectueux du CFTR, le CFTR- $\Delta$ F508. Ce canal chlore est décrit plus en détails à la section 1.4. Lorsque muté, ce canal est retenu à l'intérieur de la cellule, ce

qui se traduit par un transport de chlore absent au niveau de la membrane plasmique. Welsh et al. (1993) ont alors envisagé la possibilité que la température pourrait affecter le repliement protéique en agissant sur le système de chaperonnes de type hsp. Ainsi, en abaissant la température de croissance de cellules de fibroblastes 3T3 en culture exprimant le mutant CFTR- $\Delta$ F508, ces auteurs ont montré que la protéine était acheminée en plus grande quantité à la membrane sous forme fonctionnelle.

Suite à cette étude, Loo et Clarke (1994) ont concentré leurs études sur le sauvetage de la glycoprotéine-P, un transporteur issu du gène 1 responsable de la résistance multi-drogue (MDR-1, multi-drug resistance gene-1) qui est retenu dans le RE lorsque muté. Les premières analyses de ce groupe ont aussi mené à la conclusion que la température avait son rôle à jouer dans la maturation et le bon repliement des protéines mutées. Cet effet a été associé à une action de la température sur la liaison des mutants à la protéine calnexine dans le cycle de contrôle de qualité (Loo et Clarke, 1997). Ils ont ensuite réorienté leurs études sur des composés pharmacologiques susceptibles d'acheminer les mutants MDR-1 à la surface membranaire. En faisant intervenir des substrats (vinblastine et capsaïcine) ou des inhibiteurs (cyclosporine et verapamil) du transporteur, ils ont observé que les protéines complètement glycosylées étaient affichées à la membrane plasmique. Les conclusions tirées de ces observations impliquent que la protéine MDR-1 se rend à la membrane plasmique parce qu'elle a subi les modifications post-traductionnelles adéquates. Il semblerait donc que les sites de liaison des ligands se forment assez rapidement durant le repliement protéique et que la liaison des ligands sur ces sites favorise une conformation protéique capable de satisfaire au système de contrôle de qualité (Loo et Clarke, 1997).

D'autres exemples de sauvetage de mutants protéiques ont fait surface dans la littérature. L'un d'eux, associé à la protéine de type-P, un transporteur de cuivre dépendant de l'adénosine triphosphate (ATP) transitant de l'appareil de Golgi à la membrane plasmique, décrit une caractéristique intéressante d'un effecteur pharmacologique agissant dans le corps humain (Kaler et Tumer, 1998). Normalement, les mutants du transporteur de type-P ATP-dépendant qui résident dans le RE mènent à la maladie de Menkes à laquelle sont associés des défauts du

tissu conjonctif, une dégénérescence neurologique, un retard mental et d'autres pathologies. Toutefois, la supplémentation en cuivre de patients pourvus du mutant G1019D ramène la fonctionnalité du transporteur de type-P ATP-dépendant par une action de chaperonne pharmacologique jouée par le cuivre en s'attachant au transporteur (Kim et al., 2002). Un autre exemple de récupération protéique fait intervenir le diazoxide, un agoniste du récepteur sulfonyl-urée-1 (SUR-1, Sulfonyl-Urea Receptor-1), un canal cationique non-sélectif. Lors de la multimérisation du récepteur SUR-1 avec Kir6.2 (Inward rectifying potassium channel, Canal potassique à rectification entrante 6.2) il y a formation d'un canal potassique ATP-sensible dans les cellules  $\beta$  du pancréas (Thomas et al., 1995). L'agoniste permet une récupération de la fonction du mutant R1394H du SUR-1 en l'amenant du réseau trans-golgien à la membrane plasmique, comme en témoigne la correction de l'hypoglycémie hyperinsulinémique associée à cette mutation (Partridge et al., 2001). Un sauvetage pharmacologique a également été observé dans le cas de récepteurs couplés aux protéines G (G Protein Coupled Receptor; GPCR) comme celui de la vasopressine 2 (V2R) pour lequel, une récupération fructueuse a été obtenue dans deux tiers des cas (Morello et al., 2000). Le récepteur V2R mutant, qui sera décrit dans les sections 1.3.6-7, n'est pas acheminé vers la membrane cellulaire. Toutefois, l'ajout d'antagonistes peptidiques perméables à la cellule (SR121463 et VPA-985; antagonistes synthétisés chimiquement) permet de restaurer l'activité de 8 des 12 mutants par un effet intracellulaire dont l'efficacité a été corroborée par comparaison à des composés non-perméables (Morello et al., 2000).

### **1.2.2. Chaperonnes chimiques**

Dans la définition de chaperonnes chimiques, il arrive fréquemment que soient inclus les osmolytes organiques qui ont une activité osmoprotectrice sans pour autant démontrer une réelle activité de chaperonne chimique (Wright et al., 1986). Une chaperonne chimique a une action bénéfique sur un système dans la cellule et cet effet peut se traduire par une protection des protéines contre la dégradation ou certains stress cellulaires. La protection face aux stress cellulaires permet une



préservation des membranes sèches, membranes ayant perdues leurs capacités élastiques et fluides, la préservation des liposomes chez les plantes, par une diminution du stress oxydatif causé par la présence de radicaux libres ou par une défense contre la chaleur (Hare et al., 1998, McManus et al., 1995, Qu et al., 1998). Ces composés osmoprotecteurs font partie des familles des polyols, des acides aminés ou des méthylamines (Lang et al., 1998). À l'opposé du spectre, il existe les osmodénaturants comme l'urée ou les électrolytes que les chaperonnes doivent combattre (Felitsky et al., 2004).

C'est dans le rein que se produit la majeure partie de l'osmoprotection chez les mammifères. Au niveau du cortex rénal, l'osmolarité est isotonique comparée à l'osmolarité sanguine. Le fluide interstitiel devient de plus en plus hypertonique lorsque l'on va du cortex vers la médullaire externe, la médullaire interne et la papille rénale. (Woo et al., 2002). Les tubules proximaux sont responsables de la réabsorption de l'eau et des ions provenant de la filtration glomérulaire. Dans la portion ascendante de l'anse de Henlé du néphron a lieu la plus grande partie de la réabsorption de l'eau favorisée par l'hyperosmolarité du fluide interstitiel (Neuhöfer et Beck, 2005). De hautes tonicités en NaCl peuvent augmenter significativement la force ionique intracellulaire et mener à des complications telles des dommages à l'ADN et la mort cellulaire (Woo et Kwon, 2002). Durant le processus de réabsorption dans les tubules distaux, la médullaire rénale doit faire face à des conditions drastiques de teneurs sel et en urée élevées. À ce niveau, les sels ayant été presque tous réabsorbés, les cellules vont contrôler la réabsorption d'eau à l'aide de l'arginine-vasopressine (AVP) et, ainsi, permettre la concentration du liquide dans le tubule collecteur. Afin de faire face aux fluctuations de tonicité extracellulaire, la médullaire rénale exprime des transporteurs d'osmolytes neutre comme la bétaine, le *myo*-inositol et bien d'autres selon l'espèce animale étudiée (Beck et al., 1992, Neuhöfer et Beck, 2005, Schmolke et al., 1996).

L'activité chaperonique la plus étudiée est celle de l'action des osmolytes organiques sur le repliement protéique. *In vitro*, ces composés servent à augmenter la différence d'énergie libre de Gibbs ( $\Delta G$ ), une mesure de la différence d'énergie libre entre les états natif et dénaturé, en diminuant le potentiel chimique de l'état natif et

en augmentant celui de l'état dénaturé (Arakawa et al., 1990). Les actions qu'exercent les chaperonnes sur les protéines sont aussi diverses que la stabilisation d'un état hydrophobe par exclusion de l'eau autour des protéines, l'assistance au repliement protéique et la désagrégation des protéines (Kaushik et Bhat, 2003). Le triméthylamine N-oxyde a l'effet de favoriser l'état replié ou agrégé des protéines, par exemple, en facilitant la formation de microtubules, dans son aide à la cristallisation ou dans sa capacité de cacher le domaine N-H pour limiter le contact avec les protons de l'environnement (Hovagimyan et Gerig, 2005). Dans d'autres cas, sa présence au cerveau a un effet nocif car il mène à la formation d'agrégats de fragments d'amyloïde bêta causant l'Alzheimer (Yang et al., 1999).

## **1.3. Aquaporines**

### **1.3.1. Le transport de l'eau**

La bicouche lipidique ayant des propriétés lipophiles, au fil des ans des scientifiques se sont donc posés la question du soi-disant passage passif de l'eau établi comme idée de base (Harris et Zeidel, 1993). Ainsi, les échanges d'eau de part et d'autres de la membrane plasmique seraient effectués par un mécanisme diffusif impliquant un passage très lent des molécules d'eau au travers de la membrane plasmique, cependant certaines cellules spécialisées sont reconnues comme ayant un transport d'eau à très haute capacité (Agre, 2004). En observant plus spécifiquement le transport d'eau en bicouche reconstituée, la perméabilité osmotique ( $P_f$ ) est équivalente à la perméabilité disponible par diffusion ( $P_d$ ), tandis que sur cellules, la perméabilité par diffusion n'explique pas toute la perméabilité osmotique observable. En comparant la perméation de bicouches lipidiques et d'érythrocytes, cet écart entre  $P_f$  et  $P_d$  augmente (Finkelstein, 1987).

La protéine intégrale formant un canal à eau (channel forming integral protein of 28 kDa, CHIP28) a été identifiée après des études de perméabilité dans les globules rouges et dans des bicouches reconstituées (Preston et Agre, 1991). Par la suite, à partir de globules rouges, elle a pu être isolée et séquencée (Agre et al.,

1993). Afin de déterminer la fonctionnalité de CHIP28, Preston et al. (1992) ont isolé l'acide ribonucléique messager (ARNm) de globules rouges humains et l'ont injecté dans des ovocytes de *Xenopus laevis*. Ces œufs, placés dans l'eau, un milieu hypotonique par rapport à la tonicité intracellulaire des ovocytes, gonflaient rapidement jusqu'à l'éclatement comparativement aux ovocytes non-injectés. C'est à ce moment qu'Agre et al. (1993) ont identifié la nature moléculaire de la protéine qui permettait le passage de l'eau à travers les membranes : l'aquaporine (AQP1). Ce passage d'eau se fait à raison de  $3 \times 10^9$  molécules d'eau par secondes par monomère. Il fut établi que l'eau passait par cette protéine en majorité avec un assez faible transport à travers la membrane par diffusion passive. Pour s'en assurer, le groupe d'Agre a aussi démontré que l'AQP1 pouvait être bloquée par le chlorure de mercure, un agent connu pour inhiber le transport d'eau au travers d'une protéine tout en n'affectant pas le transport d'eau par diffusion. Cette méthode a été employé pour bloquer le canal AQP1 et, de ce fait, le transport d'eau (Agre et al., 1993). L'aquaporine constitue donc la voie d'entrée majeure de l'eau dans les cellules corporelles, autant au niveau de la barrière hématoencéphalique qu'au niveau du rein, de l'œil et du poumon.

### 1.3.2. Caractéristiques des aquaporines

À ce jour, 13 aquaporines ont été identifiées chez les mammifères et une pléiade d'autres sont présentes chez les bactéries, les amphibiens, les plantes, etc. (Masyuk et LaRusso, 2006). L'analyse de la séquence de l'AQP1 a permis l'identification de similitudes entre les AQPs, à savoir six segments transmembranaires contenant deux motifs Asparagine-Proline-Alanine (NPA) (Schrier et Cadnapaphornchai, 2003). Ces motifs sont présents sur les hélices hydrophobes B et E et s'assemblent au niveau de la membrane plasmique pour former une structure dite « modèle en sablier » (Jung et al., 1994). En analyse cristallographique, la protéine se replie pour former un assemblage d'hélices  $\alpha$  délimitant un puits favorisant un passage de molécules d'eau en file indienne. Le modèle en sablier présente l'arginine-195 et l'histidine-180 au centre du pore, et le

filtre de sélectivité étroit créé par les motifs NPA empêche le transport de protons et de molécules chargées ou plus grosses que l'eau (Jensen et al., 2005, Kozono et al., 2002).

L'aquaporine se présente à la membrane plasmique en état tétramérique où l'un des monomères est phosphorylé sur la sérine-256, tel que vérifié pour les AQP 1 à 5 pour le moment (Yang et Verkman, 1997). Dans les ovocytes, par contre, l'absence de phosphorylation n'affecte pas l'adressage à la membrane plasmique (de Mattia et al., 2005). D'autres analyses ont démontré que le canal de l'aquaporine possède une symétrie sagittale lorsqu'il est enchâssé dans la membrane plasmique, d'où l'idée d'un canal bidirectionnel (Ren et al., 2001). Malgré ces similarités entre les canaux à eau, certains d'entre eux possèdent d'autres capacités que le transport de l'eau et ont été nommées aquaglycéroporines afin de rendre compte du transport additionnel de glycérol, d'urée et de certains polyols (Hara-Chikuma et Verkman, 2006).

### **1.3.3. Localisation des AQPs du rein permettant la réabsorption d'eau**

Des treize aquaporines caractérisées, au moins sept sont présentes dans le rein et, plus spécifiquement, dans les néphrons (Nielsen et al., 2002). L'AQP1 se retrouve en abondance dans le tubule proximal et dans l'anse descendante mince, permettant la réabsorption efficace de l'eau au niveau du néphron proximal (Nielsen et al., 1993a, Nielsen et al., 1993b). L'AQP2 se présente dans les cellules principales du tubule collecteur où elle assure la fin de la réabsorption de l'eau (Nielsen et al., 1993a). Sa présence du côté apical, associée à celle sur la membrane basolatérale des AQP3 et AQP4, permet le passage de l'eau du filtrat glomérulaire vers le milieu interstitiel (Ecelbarger et al., 1995, Terris et al., 1995). Une régulation étroite de l'AQP2 permet d'assurer que l'être humain ne se déshydrate pas et préserve une osmolarité constante.

### 1.3.4. Structure des aquaporines

L'AQP2 est une protéine de 271 acides aminés qui présente la même morphologie structurale que les autres membres de la famille des aquaporines (Schrier et Cadnapaphornchai, 2003). La structure native de l'AQP2 n'a été obtenue qu'à une résolution de 4,5 Å telle qu'analysée par microscopie de force atomique (Schenk et al., 2005). Toutefois, Schenk et al. (2005) ont superposé la séquence peptidique et la densité électronique de l'AQP2 sur la structure cristalline de l'AQP1 (figure 1.4). Cette technique a permis d'observer une grande similitude entre le placement des différents éléments de la structure. Malgré une homologie de séquence de 47 %, les canaux ont un squelette carboné se superposant sans encombrement stérique. Suite à cette superposition des séquences, le modèle 3D obtenu *in silico* semble démontrer que l'AQP2 a les motifs NPA et traverse la membrane six fois, au même titre que l'AQP1.

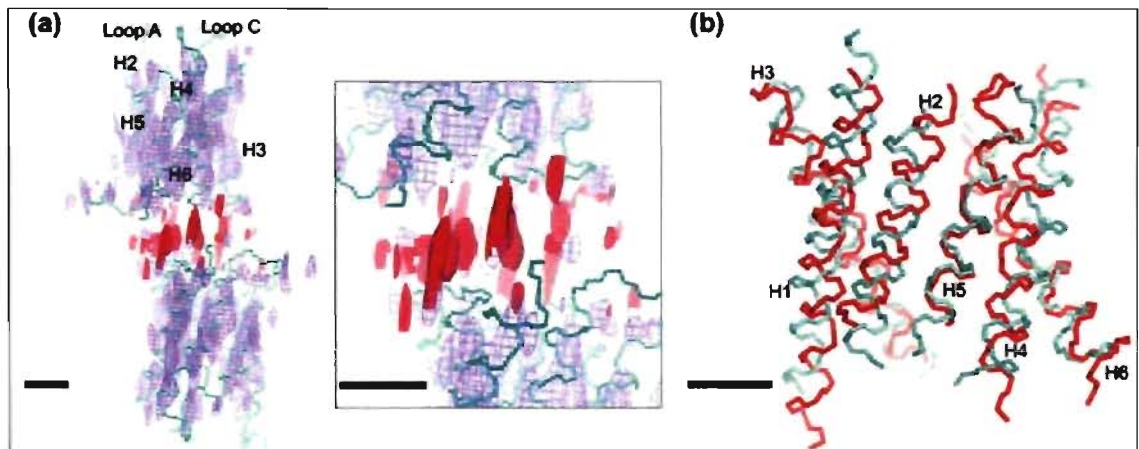


Figure 1.4. Carte tridimensionnelle hypothétique de l'aquaporine-2 (d'après Schenk et al., 2005).

(a) Deux monomères d'AQP2 sont représentés en pourpre, un de la couche du dessus et l'autre du dessous. En cyan, le squelette de carbone alpha de l'AQP1 est superposé au modèle présenté. La densité acceptée des chaînes latérales de l'AQP1 est représentée en rouge. La zone agrandie offre une vue rapprochée de ces chaînes latérales. (b) Les fragments hélicaux de l'AQP2 visibles en (a) sont de couleur rouge et pairés aux hélices, en cyan, de l'AQP1. Les échelles horizontales représentent 10 Å.

Vu l'homologie démontrée entre les protéines de la famille des aquaporines par la présence des mêmes motifs, les séquences représentant les AQP0 à 6, à l'exception de l'AQP3, ont été alignées afin d'observer le degré d'homologie de part et d'autre des acides aminés D150 et G196 qui sont mutés dans l'étude subséquente. Les 7 AQPs ne faisant pas partie de l'alignement étaient des aquaglycéroporines qui n'avaient pas les deux sections NPA ou n'avaient pas les régions présentées à la figure 1.5 conservées. Les aquaporines sont présentées dans leur ordre d'homologie avec la séquence d'AQP2 sur la première ligne. Pour l'acide aminé D150 de l'AQP2, qui représente D158 pour l'AQP1, il y a présence de cet acide aminé chez les autres aquaporines et même les quelques acides aminés avant et après sont pratiquement identiques, ce qui démontre une grande homologie de cette séquence. Cette homologie n'est pas observable pour l'AQP3 ou les AQP7 à 12. En amont du G196, il y a le motif NPA qui est une région très conservée dans toutes les AQPs. L'acide aminé G196, lui, n'est pas très bien conservé, à savoir que l'AQP1 présente une histidine et que l'AQP5 présente une asparagine. La région proche du G196 est assez bien conservée avec une grande présence d'acides aminés non-chargés et une section en aval de cet acide aminé, la glycine, qui est très similaire d'une AQP à l'autre. Les AQPs partagent aussi le fait qu'elles se présentent à la membrane sous forme homotétramérique comme l'ont démontré des études de microscopie de force atomique de l'AQP2 et des études cristallographiques sur l'AQP1 (Bai et al., 1996).

|      | 150                            | 196                              |
|------|--------------------------------|----------------------------------|
| AQP2 | ... QLVLCIFASTDERRGENPGTP ...  | SMNPARSLAPAVVTGKFD-DHWVFWIGP ... |
| AQP5 | ... QLALCIFASTDSRRTSPVGSP ...  | SMNPARSFGPAVVMNRFSPAHWVFWVGP ... |
| AQP6 | ... QLVLCVFASTDSRQTS--GSP ...  | SMNPARSFGPAIIIGKFT-VHWVFWVGP ... |
| AQP0 | ... QFVLCIFATYDERRNGQLGSV ...  | GMNPARSFAPAILTGNFT-NHWVYWVGP ... |
| AQP1 | ... QLVLCVLATTDRIIRDLGGSA ...  | GINPARSFGSAVITHNFS-NHWIFWVGP ... |
| AQP4 | ... QLVFTIFASCDISKRTDVTGSI ... | SMNPARSFGPAVIMGNWE-NHWIYWVGP ... |

Figure 1.5. Alignement de séquence des aquaporines.

Les séquences des aquaporines AQP0 à AQP6 sont présentées à l'exception de l'AQP3 dont l'homologie de séquence est trop faible pour ces zones. L'alignement de séquence compare les acides aminés D150 et G196 de l'AQP2 par rapport aux autres aquaporines ainsi qu'une dizaine d'acides aminés en aval et en amont de ces derniers.

### 1.3.5. Synthèse et ciblage de l'AQP2

Après synthèse et enchâssement membranaire dans le RE, l'AQP2 reçoit le polysaccharide Glucose<sub>3</sub>Mannose<sub>9</sub>N-acétyl-glucosamine<sub>2</sub> sur le résidu asparagine-123 et s'assemble en homotétramère. L'AQP2 est la seule aquaporine à posséder ce site consensus de glycosylation en Asparagine<sub>123</sub>-X-Tyrosine<sub>125</sub> où l'asparagine-123 est glycosylée (Bai et al., 1996). Ce canal à eau chemine ensuite jusqu'à l'appareil de Golgi. Dans cette organelle, le sucre riche en mannose se voit modifié en sucre complexe de plus d'une douzaine de kilodaltons selon un processus peu étudié (Bai et al., 1996). Cette glycosylation ne s'applique qu'à 25 % des AQP2 traversant le réseau golgien, c'est-à-dire l'équivalent d'une sous-unité du tétramère (Baumgarten et al., 1998, Hendriks et al., 2004). Le passage de l'appareil de Golgi vers la membrane plasmique requiert cette glycosylation. Avant l'acheminement à la membrane, les AQP2 résident dans des vésicules sous-membranaires nommées agrégaphores (figure 1.6) (Fushimi et al., 1997).

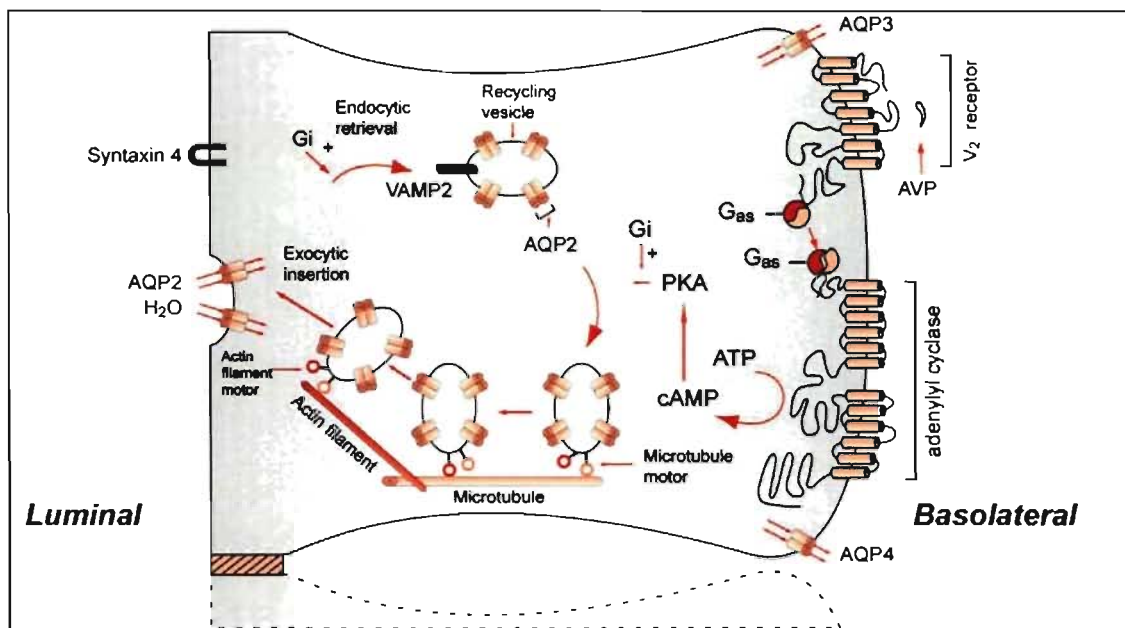


Figure 1.6. Représentation schématique d'une cellule principale du canal collecteur rénal et des éléments qui conduisent à la réabsorption transcellulaire de l'eau. (d'après Bichet, 2006a).

D'autres fonctions importantes de cette cellule, en particulier la réabsorption sodée par l'intermédiaire du canal épithélial sodique et sa régulation par l'aldostérone ne sont pas représentées (voir Bonnardeaux et Bichet, 2004). Le récepteur V2R à la vasopressine lie la vasopressine circulante sur le côté basolatéral de la cellule et induit la formation d'adénylate cyclase par l'intermédiaire d'une protéine G trimérique. La phosphorylation de différents effecteurs induit la fusion à la membrane de vésicules endocytaires portant les aquaporines-2. Les microtubules et les filaments d'actine facilitent le mouvement des vésicules porteuses d'aquaporine 2 à la membrane. En présence de vasopressine, la membrane luminaire devient perméable à l'eau, l'eau quitte la cellule par les aquaporines 3 et 4 exprimées constitutionnellement au niveau de la membrane basolatérale. L'eau suit les caractéristiques de tonicité environnantes : la lumière tubulaire est hypotonique (beaucoup de molécules d'eau par unité de volume), l'interstitium est hypertonique (peu de molécules d'eau par unité de volume). En l'absence de vasopressine, les vésicules endocytaires contenant les AQP2 sont récupérées par endocytose dans un compartiment sous-endothélial.



L'AQP2 est présente uniquement à la membrane apicale des cellules principales du tubule collecteur. Dans le rein, l'eau traverse le glomérule librement et n'est récupérée qu'à 80 % par l'AQP1 au niveau du tubule proximal (Schafer, 1990). Ainsi, au niveau du tubule collecteur, l'AQP2 doit concentrer l'urine afin d'éviter la déshydratation corporelle. Placée au niveau apical, elle laisse passer l'eau qui traverse ensuite les AQP3 et AQP4 situées du côté basolatéral de ces mêmes cellules (figure 1.6). L'absence de l'AQP2 à la membrane apicale de souris knock-out pour ce gène mène à la mort des souris en bas âge (Rojek et al., 2006).

### **1.3.6. Régulation par l'AVP**

Les tétramères d'AQP2 localisés dans les agrégophores se rendent à la membrane apicale sous l'influence de l'AVP (Nielsen et al., 1995). L'action de l'AVP sur le récepteur V2R présent à la membrane basolatérale active une cascade intracellulaire (Robben et al., 2006). Suite à l'activation du V2R, il y a stimulation de l'adénylate cyclase (AC) via les protéines  $G_i$ , ce qui mène à une augmentation d'adénosine monophosphate cyclique (AMPc) intracellulaire permettant une activation de la phosphorylase kinase A (PKA) et la phosphorylation de l'AQP2 sur la sérine-256 (Brown, 2003, Katsura et al., 1997). Cette phosphorylation exercée par la PKA est essentielle pour l'attachement et l'incorporation des agrégophores à la membrane plasmique (figure 1.6) (Lande et al., 1996).

### **1.3.7. Diabète insipide néphrogénique**

Le DIN fait partie d'un désordre rénal inclus dans la famille des diabètes insipides. Ces derniers sont associés à une incapacité à concentrer les urines et par une polyurie, troubles qui se traduisent par une diurèse anormalement élevée ( $> 30$  ml/kg/jour) et par une faible osmolarité urinaire ( $< 250$  mmol/kg) comparativement à un individu normal ( $> 500$  mmol/kg) (Bichet, 2006b, Walmsley et Koay, 1996).

Le DIN est observé lorsqu'un patient ne peut créer un gradient corticomédullaire rénal, ceci se traduisant par un état pathologique soit héréditaire,

soit acquis (Bichet et Zellweger, 2004). Pour la forme acquise, il s'agit majoritairement de modifications pathologiques qui apparaissent dans la vie d'un patient consécutivement à des traitements au lithium ou à une hypokaliémie (Frokiær et al., 1996, Marples et al., 1995, Timmer et Sands, 1999). En ce qui a trait à la forme héréditaire, 90 % des symptômes sont reliés au *gène du récepteur à la vasopressine V2 (AVPR2)*, un gène codant pour le V2R et situé sur le chromosome X (Birnbaumer et al., 1992). Les autres mutations faisant intervenir l'AQP2 empêchent le passage d'eau lors d'études *in vitro* et, *in vivo*, ne permettent pas la génération du gradient interstitiel corticomédullaire (Robben et al., 2006).

Lorsque le gène fautif est l'*AVPR2*, les cellules principales du tubule collecteur sont insensibles à l'action de l'AVP (Robben et al., 2006). Ceci se traduit chez un patient par une incapacité à concentrer ses urines suivant l'administration d'AVP (Bichet et al., 1992).

Le gène de l'AQP2, situé sur le chromosome 12 au locus 12q13, procure un phénotype récessif à 35 des 41 mutations connues à ce jour qui mènent au DIN (Robben et al., 2006). Contrairement aux patients sains, les patients dont les allèles du gène sont mutés n'excrètent pas d'AQP2 dans leur urine. Dans le cas des mutations récessives, les AQP2 sont absentes tant dans les vésicules sous-membranaires qu'à la membrane plasmique lors de la présence d'AVP. Pour les mutations autosomales dominantes, elles vont se présenter seulement sur un allèle. Malgré les modifications de séquences, le transport d'eau des hétérotétramères ainsi que l'adressage de l'AQP2 sauvage (AQP2-wt) ne sont pas modifiés. Toutefois, quelques mutations démontrent un mauvais adressage des tétramères et ils se retrouvent alors dans les endosomes tardifs (Robben et al., 2006).

### **1.3.8. Mutations de l'AQP2**

#### **1.3.8.1. Destinée des mutants de l'AQP2**

Les mutations sur le gène codant pour l'AQP2 ont été décrites par Deen et al. (1995) comme étant la cause du DIN autosomique puisque autant les hommes que

les femmes en sont atteints. Chacune des 41 mutations du gène d'AQP2 déjà recensées procure un phénotype du DIN variant de minime à sévère (figure 1.7). Parmi les mutants de l'AQP2 qui sont fonctionnels lors de leur expression dans des modèles cellulaires *in vitro*, bien que causant le DIN chez les patients chez qui on les retrouve, 7 sont à caractère dominant (721delG, 727delG, R254L, 763-772del, E258K, 779-780insA et 812-818del) et les 2 autres à caractère récessif (A147T et P262L). Les 32 autres mutations connues sont associées à une  $P_f$  réduite face au type sauvage (Robben et al., 2006).

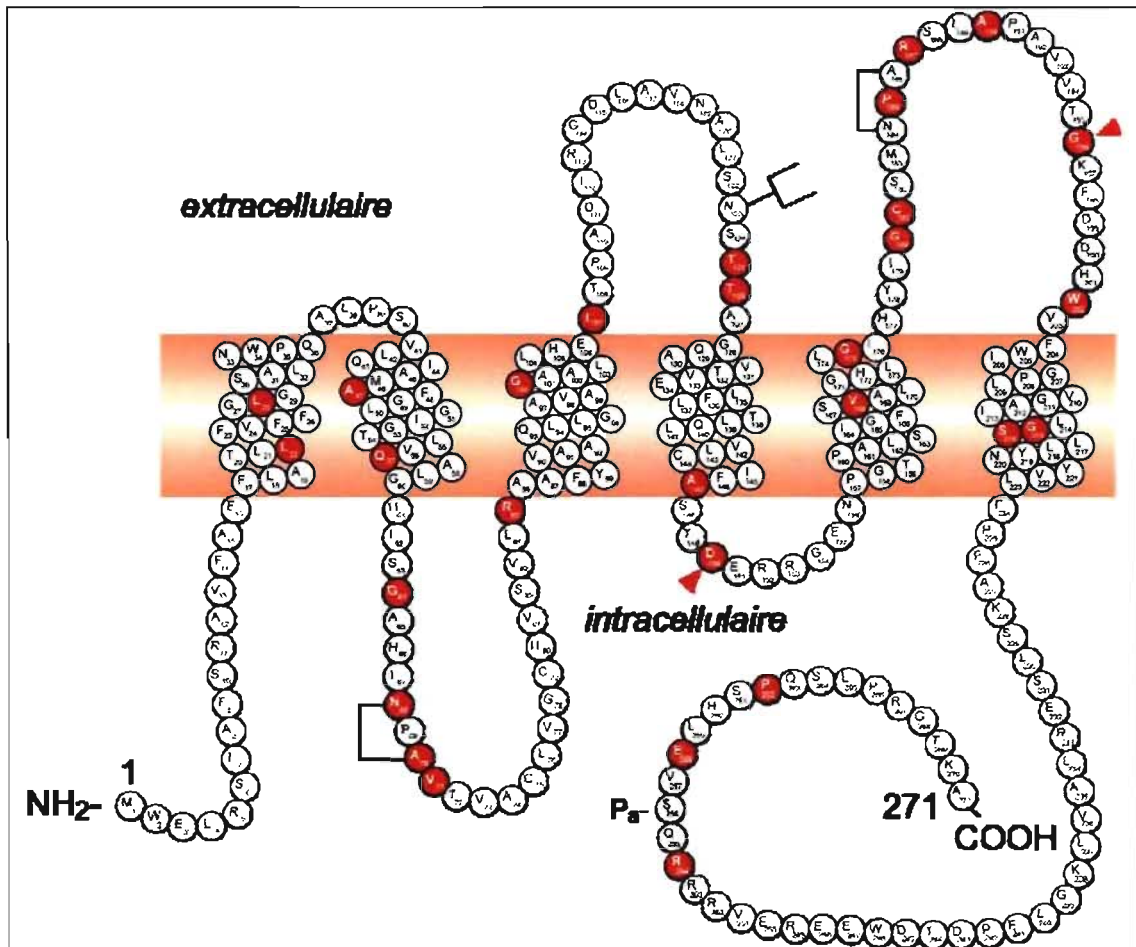


Figure 1.7. Représentation schématique de la structure secondaire de l'AQP2 (d'après Bichet, 2006c).

En rouge sont représentés les acides aminés mutés décrits dans la littérature (41 mutations). Deux flèches rouges (◄) ont été ajoutées pour situer les mutations de la présente étude (AQP2-D150E et -G196D).

Les mutations récessives présentent des trafics intracellulaires différents de ceux de la forme sauvage. En effet, ces mutations engendrent souvent un mauvais repliement de la protéine, ce qui se traduit par un adressage inadéquat qui achemine les protéines mutantes vers la dégradation ou les maintient liées au système des chaperonnes dans le RE (Marr et al., 2002a). Les mutants à caractère DIN récessif ne multimérisent pas avec l'AQP2-wt (Shi et al., 2007). Les mutations dites dominantes négatives de l'AQP2 rendent compte du fait que l'hétérotétramérisation en présence de protéine mutante séquestre la forme sauvage dans la cellule (Kamsteeg et al., 1999). Un dernier type de dominance pour les mutations de l'AQP2 est la possibilité d'acheminer la forme AQP2-wt à la membrane basolatérale au lieu de la membrane apicale de cellules polarisées (Kamsteeg et al., 2003). Les mutations causant un DIN dominant se localisent dans la portion C-terminale qui est nécessaire à l'insertion dans la membrane apicale de par la présence de phosphorylation en position 256, des acides aminés asparagine-220 à sérine-229 et d'autres régions de la séquence C-terminale (Robben et al., 2006, Shi et al., 2007).

Une étude de Hirano et al. (2003), portant sur 2 mutants, AQP2-T126M et -E258K, a évalué la dégradation de ces protéines. Les 2 mutants, qui sont séquestrés dans l'appareil de Golgi mais peuvent se rendre à la membrane plasmique sous forme glycosylée ou non, sont rapidement dégradés par le protéasome. L'étude tend aussi à démontrer que le mutant E258K n'est pas seulement retenu dans l'appareil de Golgi mais est aussi dégradé dans le lysosome en passant par les endosomes tardifs. Une autre étude a démontré, sur cellules rénales de chien Madin-Darby (MDCK; Madin-Darby canine kidney cells) en culture exprimant l'AQP2, que l'absence d'AVP (ou de forskoline) favorisait une ubiquitination de l'AQP2 (Kamsteeg et al., 2006). L'ubiquitine, qui est ajoutée sur Lys<sub>270</sub>, permet l'endocytose du pore à eau et sa dégradation subséquente par le lysosome. L'AQP2 nécessite d'être ubiquitinée pour être endocytée (Kamsteeg et al., 2006). Chez un patient atteint de DIN, l'AQP2 n'est pas excrétée dans l'urine si la mutation empêche la protéine de quitter le RE (Iolascon et al., 2007). De plus, lorsque séquestrées dans le RE des cellules rénales, les AQP2 mutantes ne sont pas stimulées en présence de forskoline (Iolascon et al.,

2007). Les mutants tels que AQP2-P262L, AQP2-A190T et AQP-R187C résidant dans des vésicules sous-membranaires et envoyés à la membrane lorsque analysé dans des ovocytes de *Xenopus laevis*, ne se rendent pas mieux à la membrane apicale chez le patient atteint (Robben et al., 2006, Shi et al., 2007). Certaines mutations avec déplacement du cadre de lecture de +1 vont être synthétisée et se rendre dans les endosomes/lysosomes sans toutefois se rendre à la membrane apicale (Kawahara et al., 2001, Marr et al., 2002b).

### **1.3.8.2. Mutants AQP2-D150E et AQP2-G196D**

Les mutations AQP2-D150E et -G196D ont été identifiées chez une patiente d'origine espagnole née en 1999 et atteinte de polyurie sévère accompagnée d'épisodes de déshydratation hypernatémique à 3, 5 et 8 mois. Cette patiente présente une osmolarité urinaire basale de 77 mmol/kg et un génotype hétérozygote où un allèle possède la mutation AQP2-D150E, et l'autre allèle AQP2-G196D. Lorsqu'exprimé dans des ovocytes, le mutant AQP2-D150E injecté à raison de 10 ng a une fonctionnalité partielle, présentant une perméabilité à l'eau beaucoup moins grande que le type sauvage injecté à raison de 1 ng (figure 1.8 AQP2-wt), tandis que le mutant G196D n'a pas une perméabilité à l'eau significativement différente de celle du contrôle non-injecté (figure 1.8).

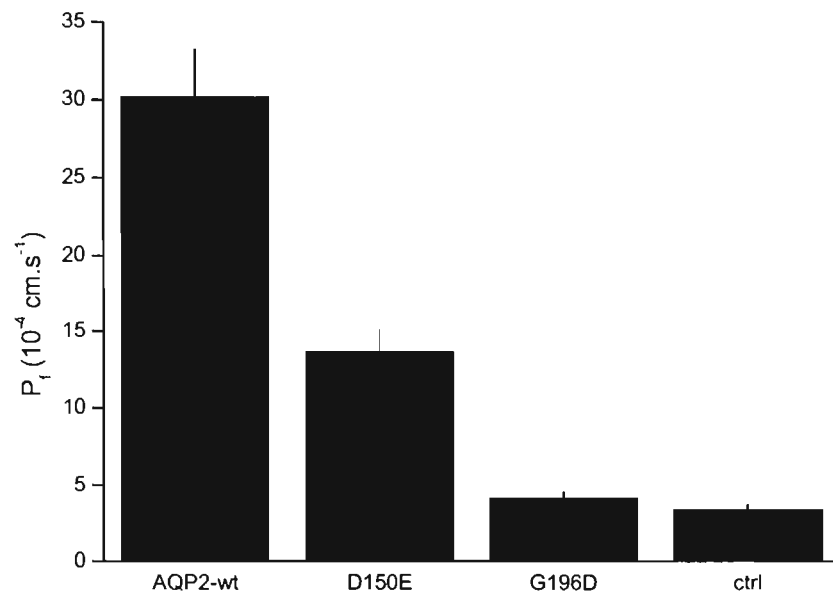


Figure 1.8. Perméabilité à l'eau des ovocytes exprimant les formes native et mutées de l'aquaporine-2 (d'après Guyon, 2004).

Les valeurs de  $P_f$  représentent la moyenne des perméabilités à l'eau mesurée sur 10-20 ovocytes exprimant l'AQP2-wt (1 ng), les mutants AQP2-D150E (10 ng) ou AQP2-G196D (10 ng) et injectés à l'eau (ctrl). Par comparaison aux ovocytes non-injectés, l'AQP2 augmente fortement ( $p < 0,001$ ) la  $P_f$  de l'ovocyte. La  $P_f$  de l'ovocyte exprimant le mutant AQP2-D150E est 2 fois plus faible que celle de l'AQP2-wt. Cependant, la présence du mutant G196D ramène la  $P_f$  des ovocytes au même niveau que celle des contrôles non-injectés.

## 1.4. Régulateur de conductance transmembranaire de la fibrose kystique (CFTR)

### 1.4.1. Caractéristiques du CFTR

Le CFTR est un canal faisant partie de la superfamille des transporteurs de type ATP-binding cassettes, une grande famille de récepteurs rassemblant

majoritairement des transporteurs (figure 1.9) (Riordan et al., 1989). Sa fonction première est de permettre le passage de chlore sous régulation d'une liaison d'ATP à des domaines à liaison de nucléotide (NBD; nucleotide-binding domain). Ce canal chlore est majoritairement localisé à la membrane apicale des cellules épithéliales du poumon où, lorsque muté, il est la cause de la fibrose kystique (Rowe et al., 2005). Il est aussi présent dans le tractus digestif, les testicules et les canaux sudoripares épidermiques. La fonction assurée par le canal est le transport ionique transépithélial et le mouvement de fluides (Li et al., 2004, Riordan et al., 1989). La protéine CFTR présente deux domaines traversant la membrane chacun étant constitué de six passages membranaires, 2 domaines NBD et un domaine régulateur (Riordan et al., 1989).

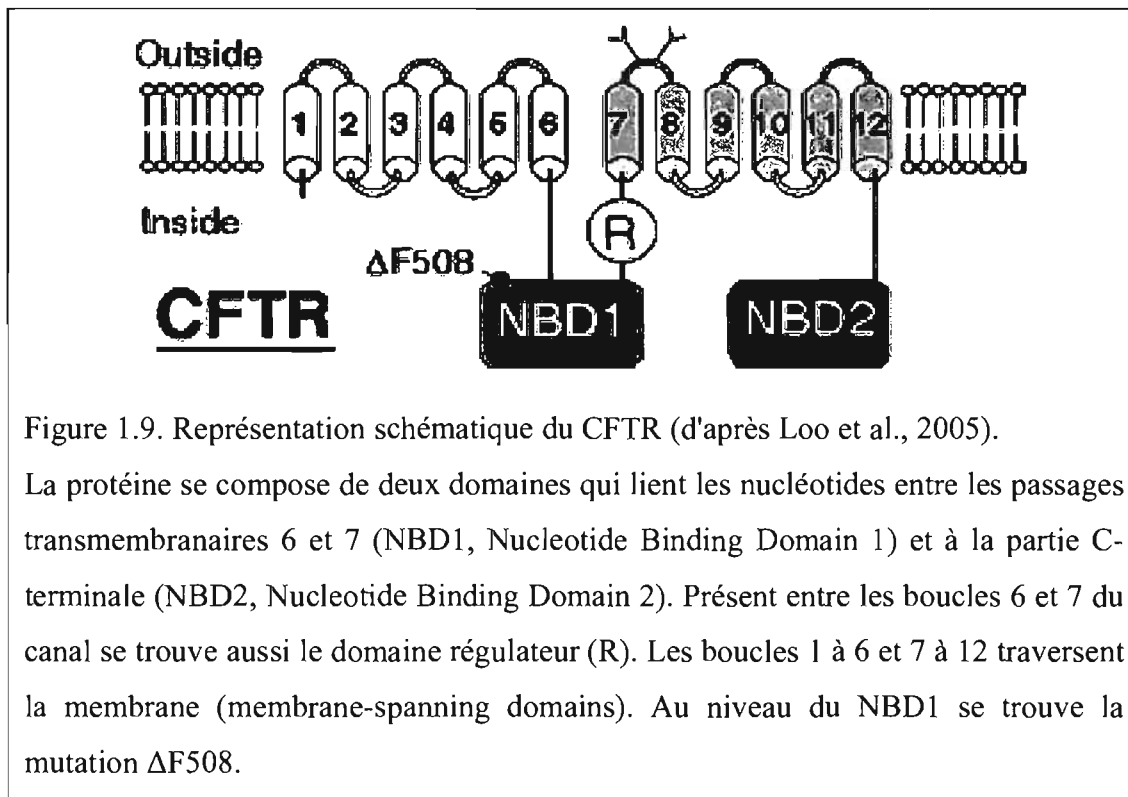


Figure 1.9. Représentation schématique du CFTR (d'après Loo et al., 2005).

La protéine se compose de deux domaines qui lient les nucléotides entre les passages transmembranaires 6 et 7 (NBD1, Nucleotide Binding Domain 1) et à la partie C-terminale (NBD2, Nucleotide Binding Domain 2). Présent entre les boucles 6 et 7 du canal se trouve aussi le domaine régulateur (R). Les boucles 1 à 6 et 7 à 12 traversent la membrane (membrane-spanning domains). Au niveau du NBD1 se trouve la mutation  $\Delta F508$ .

La présence du canal CFTR dans la membrane des cellules épithéliales qui tapissent l'appareil respiratoire aide à l'hydratation des poumons et de la couche de mucus qui les recouvre. Pour moduler le niveau d'eau dans les poumons, ce canal contrôle les flux de chlore sous régulation de l'AMPc ainsi que le transport de fluides à travers la membrane plasmique (Loo et al., 2005). Malgré un nombre élevé

d'études effectuées sur le canal CFTR, bien peu de choses sont connues quant à sa structure quaternaire, comme par exemple la question de savoir si il se multimérise ou non avant d'atteindre la membrane plasmique (McCarty, 2000, Yue et al., 2000, Zerhusen et al., 1999). Un autre point nébuleux dans le fonctionnement du canal est son mécanisme d'ouverture, à savoir lequel des 2 domaines NBD lie l'ATP et quelle importance à l'hydrolyse d'ATP puisque des nucléotides non-hydrolysables ont la capacité d'ouvrir le canal (Aleksandrov et al., 2000, Aleksandrov et al., 2002). Toutefois, des calculs d'énergie de fermeture du canal sont compatibles avec une absence d'hydrolyse nucléotidique (Riordan, 2005). L'activation du canal a cependant été démontrée nécessiter la phosphorylation du domaine régulateur par la PKA (Frizzell et al., 1986, Gadsby et al., 1995). L'activation a aussi pu être associée à l'élévation d'AMPc (augmentant la phosphorylation du CFTR par la PKA), l'inhibition de l'activité phosphatase et l'interaction directe de l'AMPc avec le canal (Schultz et al., 1999). Les activateurs mis en évidence dans les études électrophysiologiques sont habituellement la forskoline et la 3-Isobutyl-1-Méthyl Xanthine (IBMX), tandis que la glibenclamide agit comme inhibiteur en bloquant le pore du canal en position ouverte (Thiagarajah et Verkman, 2003). D'autres mécanismes de régulations du CFTR mettent en jeu sa liaison à d'autres protéines par son motif de type densité postsynaptique/disque large de la drosophile/*Zona Occludens* (PDZ; PSD-95/Dlg/ZO-1; PostSynaptic Density/*Drosophila disc-large/Zona Occludens*), motif assurant la signalisation cellulaire ou l'adressage chez les protéines (Naren et al., 2003).

### **1.4.2. Mutations du CFTR**

La fibrose kystique est une maladie autosomique récessive dans laquelle le gène du CFTR est muté, ce qui se traduit par une pneumopathie chronique, une insuffisance pancréatique, un taux de chlore élevé dans le sang et l'infertilité masculine (Ribeiro, 2006). À ce jour, il y a plus de mille mutations connues dans le gène du CFTR qui mènent à une forme autosomale récessive de la fibrose kystique. La majorité des patients affectés par ces mutations synthétisent des protéines qui sont



dégradées rapidement après avoir échoué au contrôle de qualité (Cheng et al., 1990, Rosenberg et al., 2004). Bien qu'une partie de ces mutants et le type sauvage du CFTR vont atteindre une conformation native, le pourcentage des canaux Cl<sup>-</sup> qui quittent le RE est d'environ 20 % pour le type sauvage et 0 % pour la forme mutante de la protéine (Xiong et al., 1997). Des études de blocage du protéasome ont permis de découvrir que c'est un défaut de repliement ou d'adoption de forme native dans le RE qui empêche l'acheminement de CFTR à son lieu d'adressage (Jensen et al., 1995, Ward et Kopito, 1994, Ward et al., 1995).

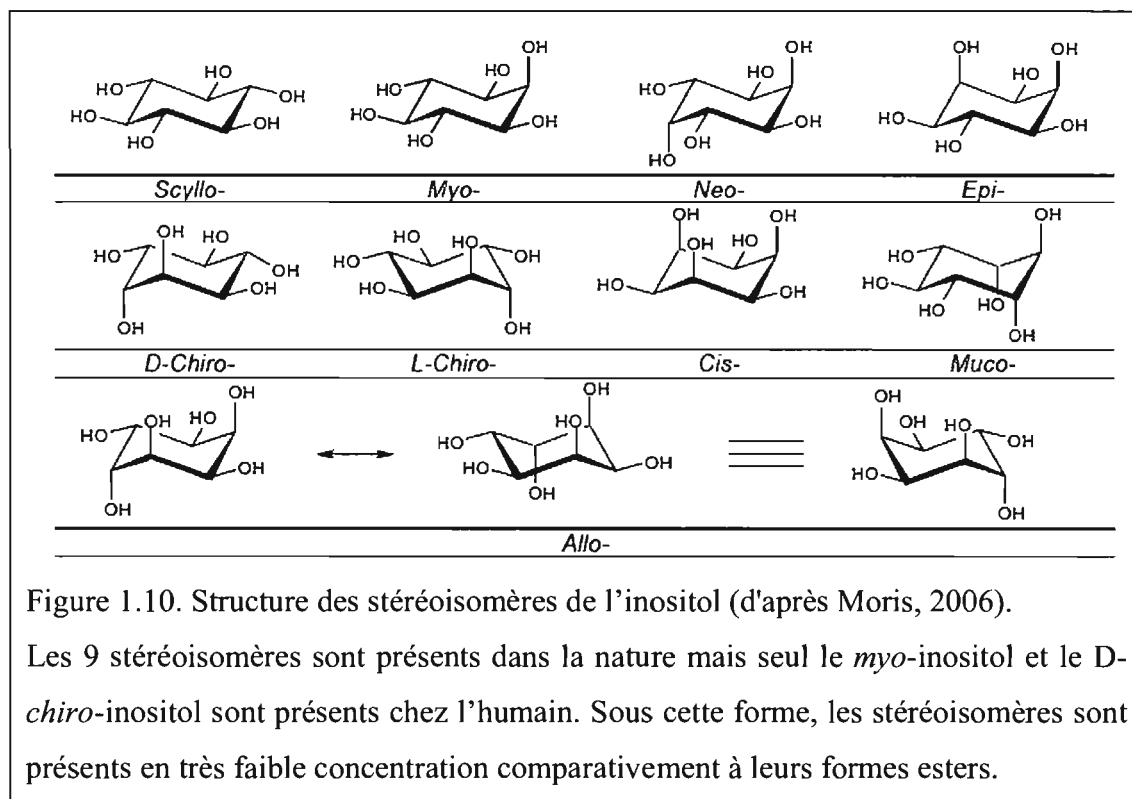
### **1.4.3. CFTR-ΔF508**

Parmi les mutations recensées, le CFTR-ΔF508 est associé à une forme sévère de la fibrose kystique. Cette mutation est particulièrement courante puisque portée sur au moins un allèle chez 90 % des patients atteints. Elle est causée par l'absence de 3 paires de bases codant pour une phénylalanine, ce qui empêche la protéine de quitter le RE (Cheng et al., 1990). Lorsqu'exprimée dans des ovocytes à une température d'incubation de 18°C, la protéine mutée se rend très faiblement à la membrane tandis qu'elle ne s'y rend pas dans des lignées cellulaires humaines. Ce canal mutant, bien qu'il s'affiche à la membrane plasmique, ne présente pas l'activité de transport de chlore activé par l'AMPc intracellulaire que le type sauvage démontre dans les ovocytes (Drumm et al., 1991). La rétention dans le RE vient du fait que le CFTR-ΔF508 reste associé avec la protéine sensible aux chocs thermiques hsp70 et la CNX, ce qui empêche la protéine mutée de cheminer plus avant tant que le repliement ne correspond pas à celui de la forme native de la protéine (Kopito, 1999, Pind et al., 1994, Yang et al., 1993). Cependant, l'existence d'osmolytes compatibles, présents au niveau du rein mais absents dans le poumon, permet à la protéine rénale d'être bien repliée et de se rendre à la membrane plasmique où elle sera fonctionnelle.

## 1.5. *Myo*-inositol

### 1.5.1. Structure et famille des inositols

Les composés de la famille des inositols sont connus depuis plus de 150 ans et le *myo*-inositol a été nommé ainsi dû à son isolement premier des muscles (où *myo* signifie muscle en grec). Cette famille de composés est de type carbohydrate en raison de leur ressemblance au glucose (formule empirique  $C_6H_{12}O_6$ ) et, aussi, de leur forme cyclohexanehexol. En 1894, Bouveault a établi que cette famille de composées comprenait un minimum de sept énantiomères; toutefois, sa classification n'a pas tenu compte de tous les énantiomères puisqu'il y en a en fait 9. Le stéréoisomère le plus important dans le corps humain est le *myo*-inositol, le deuxième en abondance est le *D-chiro*-inositol tandis que les autres n'y sont présents que sous forme de traces (figure 1.9).



## 1.5.2. Absorption et synthèse

### 1.5.2.1. Consommation d'inositol

L'être humain ne peut pratiquement pas souffrir d'un manque de *myo*-inositol puisque son alimentation en est riche. Toutefois, un déficit peut mener à des maladies comme le *diabetes mellitus* et la galactosémie, alors que la carence en *myo*-inositol des cellules eucaryotes peut mener à la mort cellulaire (Holub, 1982, Ju et al., 2004). Autant chez les animaux que chez les végétaux, les inositols sont présents soit à l'état libre, soit phosphorylés. La plante donne majoritairement son *myo*-inositol à l'être humain sous forme d'acide phytique qui est ensuite dégradé, tandis que les poissons, les produits laitiers ainsi que les viandes fournissent le *myo*-inositol sous forme métabolisable ou sous forme de sucre libre (Empson et al., 1991). La consommation journalière d'inositol avoisine le gramme par jour (Fisher et al., 2002). Chez l'être humain, les niveaux de *myo*-inositol chez l'adulte se situent entre 4 et 8 mmol/kg tandis qu'un enfant peut voir cette quantité triplée (Stork et Renshaw, 2005). La circulation sanguine n'en contient qu'une faible partie comparativement au liquide céphalorachidien avec des concentrations respectives de 0,03 et 6 mM (Fisher et al., 2002, Shetty et al., 1995).

En ce qui concerne les autres polyols cycliques de la famille des inositols, ils sont présents dans la nature sous forme d'esters et, seul, le *D-chiro*-inositol apparaît sous forme de traces chez l'être humain. Ceci vient du fait que la consommation de l'être humain inclut les plantes qui présentent du *D-chiro*-inositol sous forme de phytate.

### 1.5.2.2. Synthèse et catabolisme des inositols

Chez l'être humain, les besoins en *myo*-inositol sont en partie couverts par la diète, mais en plus grande partie encore par synthèse dans le rein où le D-glucose-6-phosphate (G6P) est converti en D-inositol-3-phosphate (I3P) qui est ensuite déphosphorylé et relargué dans le sang sous forme de *myo*-inositol libre (Ferrier et Middleton, 1993, Fisher et al., 2002, Loewus et Loewus, 1983). Cette valeur peut

atteindre 4 g par jour (Sherman et al., 1977). De plus, le phytate que l'humain ingère est transformé en inositol libre sous l'action de phytases, elles aussi ingérées ou présentes dans la muqueuse intestinale. Selon les études de Eagle et al. (1960), certaines cellules en culture nécessitent du *myo*-inositol pour leur survie, sans toutefois posséder un métabolisme intrinsèque suffisant pour le synthétiser.

### **1.5.2.3. Présence au cerveau**

Des études effectuées par Spector (1988) ont déterminé que la barrière hématoencéphalique est partiellement perméable au *myo*-inositol selon un mode de transport par diffusion passive et qu'un transport de *myo*-inositol saturable est également présent au niveau de cette barrière, démontrant ainsi que l'acheminement au cerveau n'est pas négligeable. Dans le système nerveux central (SNC), les niveaux de *myo*-inositol sont très élevés et la forme majeure qui y est retrouvée est le phytate (inositol hexakisphosphate). De multiples sites de liaisons de cette molécule ont été répertoriés dans le SNC, ce qui indique que ce composé y effectue de nombreuses tâches (Sasakawa et al., 1995). Les concentrations d'inositol atteignent 2 à 15 mM lorsqu'on évalue le poids sec ou le poids humide du cerveau. Des études tendent à démontrer que cet inositol est concentré dans les cellules gliales (Brand et al., 1993, Glanville et al., 1989). Par contre, des analyses subséquentes sur animaux et corroborées en cultures cellulaires indiquent que l'inositol est retrouvé dans les cellules de Purkinje, les neuroblastomes ou dans les cellules granulaires de cervelet de rat (Godfrey et al., 1982, Koch et al., 1999, Novak et al., 1999).

## **1.5.3. Modes de transports**

### **1.5.3.1. Les cotransporteurs Na<sup>+</sup>-*myo*-inositol (SMIT)**

L'accumulation de *myo*-inositol au niveau du rein et, en moindre importance, au niveau d'autres organes, est assurée par cotransport avec le sodium (Na<sup>+</sup>). L'acide déoxyribonucléique clonal (ADNc) pour le transporteur sodium-*myo*-inositol SMIT1

a été cloné à partir des cellules MDCK. La fonction de la protéine issue de ce gène a été évaluée dans des ovocytes de *Xenopus laevis* (Kwon et al., 1992). Le cotransporteur SMIT1 a été localisé dans les lentilles oculaires, le rein, les cellules endothéliales et le SNC par hybridation des séquences d'ARN de ces tissus avec l'ADNc de SMIT1 des cellules MDCK utilisé comme sonde (Gamba, 2001). La séquence protéique contient 718 acides aminés et 14 passages transmembranaires. SMIT1 est soumis à un contrôle transcriptionnel sensible à la tonicité extracellulaire par l'intermédiaire du facteur de transcription liant le promoteur sensible à la tonicité (TonEBP; Tonicity-Enhancer Binding Protein) (Burg et al., 1997, Franchi-Gazzola et al., 2001, Miyakawa et al., 1999), qui lie des promoteurs à la tonicité en amont du gène.

Un second transporteur de *myo*-inositol couplé au sodium (SMIT2) a été cloné et injecté dans les ovocytes pour réévaluer sa fonction qui avait été assimilée à celle d'un transporteur de glucose (Hitomi et Tsukagoshi, 1994, Roll et al., 2002). Les observations subséquentes de Bissonnette et al. (2004) montrent plutôt que le sucre transporté est le *myo*-inositol et que le transporteur réside dans la membrane en bordure en brosse (BBM) du rein (Bissonnette et al., 2004). Il est aussi présent au niveau du foie, du cœur et du cerveau (Hitomi et Tsukagoshi, 1994, Roll et al., 2002).

### 1.5.3.2. Cotransporteur $H^+$ -*myo*-inositol (HMIT)

Un second type de transporteur a été découvert où le cotransport est activé par les protons. HMIT possède 12 segments transmembranaires et est majoritairement exprimé au cerveau dans l'hypothalamus (Uldry et al., 2001). Ce transporteur s'active lorsque le pH extracellulaire diminue et, contrairement à SMIT1, est inhibé à bas pH. L'expression de HMIT à la membrane dépend de la dépolarisation cellulaire et de l'activation de la phosphokinase C (Uldry et al., 2004). Sa fonction spécifique supposée aurait à voir avec la régulation du pH au niveau du cerveau.

## **1.5.4. Rôles physiologiques**

### **1.5.4.1. Besoins nutritionnels et corporels**

Puisque le *myo*-inositol est présent à bien des endroits dans le corps humain, plusieurs rôles lui sont attribués et nous allons en faire une brève description. Ces différentes fonctions impliquent aussi bien la forme libre du *myo*-inositol que son métabolite l'inositol phosphate.

Ainsi, l'importance de ces molécules est soulignée par le fait qu'un dérèglement du métabolisme des inositols mène à diverses maladies. Il a été récemment déterminé que le *myo*-inositol pourrait être impliqué dans les maladies bipolaires puisque le lithium, un composé administré aux patients souffrants de dépression, agit sur ce métabolisme (Vaden et al., 2001, Williams et Harwood, 2000). Des résultats de résonance magnétique nucléaire ont d'ailleurs démontré un taux de *myo*-inositol au cerveau plus faible chez des rats traités chroniquement au lithium (O'Donnell et al., 2000). À l'état libre, le *myo*-inositol peut jouer un rôle dans des complications de la neuropathie diabétique et du *diabetes mellitus* (Hansen, 2001, Hotta, 1997, Stevens et al., 1993). Bien d'autres maladies ou troubles peuvent être liés au métabolisme ou à des fluctuations du *myo*-inositol et des inositols, ils sont revus dans la littérature (Pendaries et al., 2003).

### **1.5.4.2. Rôles en tant que molécule signalisatrice et second messenger**

Afin d'exercer un rôle de signalisation, les données de la littérature indiquent que le *myo*-inositol doit être complexé en inositol-phosphate ou en phosphatidylinositide. Ces composés peuvent agir en tant que seconds messagers après avoir été libérés suite à une stimulation en provenance soit de l'extérieur, soit de l'intérieur de la cellule, mais plus spécialement l'activation de la phospholipase C et la libération d'oxyde nitrique (Rosenbach et al., 1993, Tritsarlis et al., 2000, Williamson, 1986). Le *myo*-inositol, en passant par le RE, peut être incorporé dans les lipides, les phosphatidylinositols (Stork et Renshaw, 2005). Afin d'éviter à des

agents extracellulaires de traverser la membrane plasmique, une cascade signalisatrice peut être initiée de l'extérieur de la cellule et se traduire en une relâche des inositols membranaires pour propager une action dans la cellule (Zhang et Majerus, 1998). Sous forme complexée, le *myo*-inositol peut agir sur la prolifération cellulaire, l'attachement d'enzymes à la membrane plasmique, la mobilisation de calcium intracellulaire et les processus synaptiques (Berridge, 1993, Cremona et De Camilli, 2001, Cremona et al., 1999, Osborne et al., 2001, Toker et Cantley, 1997). Quant à l'inositol-1,4,5-triphosphate, il peut intervenir dans l'exportation de l'ARNm du noyau, la transcription, le remodelage de la chromatine, la modification des télomères et la morphologie cellulaire (Odom et al., 2000, Saiardi et al., 2000, Saiardi et al., 2005, Shears, 1998, Steger et al., 2003, York et al., 2001, York et al., 1999, York et al., 2005).

#### **1.5.4.3. Rôles en tant qu'osmolyte compatible**

Les osmolytes compatibles sont des petites molécules neutres qui réagissent peu avec le contenu cellulaire. Dans le cas des cellules de la médulla rénale, les osmolytes compatibles servent à maintenir une osmolarité élevée sans augmenter la force ionique afin de ne pas perturber l'équilibre homéostatique de l'eau et les processus biochimiques (Ho, 2006). Des molécules comme le *myo*-inositol, la bétaine et la taurine sont utilisées pour conserver l'osmolarité constante dans les cellules. Si la cellule venait à être soumise à un milieu hypotonique soutenu, des altérations de l'ADN, des arrêts du cycle cellulaire, des inhibitions de traduction protéique ou d'autres problèmes cellulaires surviendraient (Ho, 2006).

Il a été démontré que des mécanismes de transport responsables de leur accumulation intracellulaire étaient régulés en fonction de la tonicité extracellulaire. D'ailleurs, un facteur de transcription osmorégulateur, TonEBP, lie des éléments de réponse à la tonicité sur la séquence d'ADN de certaines protéines en réponse à l'hypertonie (Burg et al., 1997, Ho, 2006). Les gènes ciblés par TonEBP sont, dans un premier temps, des transporteurs d'osmolytes utilisés pour rétablir l'osmolarité comme les SMIT, le transporteur de bétaine et de glycine BGT1 et le

transporteur de taurine TauT. Les autres gènes régulés par TonEBP codent pour des chaperonnes qui accélèrent l'expression protéique et pour l'AQP2 (Bissonnette et al., 2004, Burg et al., 1997, Wiese et al., 1996, Yamauchi et al., 1996, Yorek et al., 1999).

#### **1.5.4.4. Rôles en tant que chaperonne chimique**

Les chaperonnes chimiques servent à faire face à des environnements néfastes pour les cellules ou les protéines. Elles sont utilisées par des organismes procaryotes lors du dessèchement de l'organisme ou pour survivre à des conditions extrêmes de températures. Pour une chaperonne comme le tréhalose, il peut favoriser la synthèse et réduire la dégradation protéique (Crowe et al., 2001). La présence de chaperonnes chimiques dans le RE peu réduire le nombre de protéines mal repliées (Amaral, 2006). C'est cette capacité qui a été découverte pour le *myo*-inositol. Il a tout d'abord été invoqué comme stabilisateur des liens hydrophobes (Back et al., 1979, Gekko, 1981). Tout récemment, il a été utilisé comme chaperonne chimique pour l'aide au repliement protéique, plus précisément du canal CFTR- $\Delta$ F508 (Howard et al., 2003, Zhang et al., 2003).

La mutation  $\Delta$ F508 est la mutation la plus commune du canal chlore CFTR qui cause la fibrose kystique. Par observation des patients, le Dr. di Sant'Agnese (1967) a remarqué que la sueur contenait de grandes quantités de sels puisqu'il y a détérioration des fonctions excrétrices de chlore du poumon causé par l'absence de CFTR (Di Sant'Agnese, 1967). Toutefois, les concentrations de chlore et de sodium dans l'urine étaient normales (Howard et al., 2003). De ce fait, dans les cellules alvéolaires du poumon, le canal  $\text{Cl}^-$  est non-fonctionnel physiologiquement parce qu'il ne se rend pas à la membrane plasmique. Par contre, dans le rein, le  $\Delta$ F508 conserve ses fonctions de réabsorption de  $\text{Cl}^-$ .

Le mécanisme expliquant cette différence n'ayant toujours pas été élucidé, Howard et al. (2003) ont entrepris de le déterminer. Ainsi, ces auteurs se sont penchés sur une différence notable entre les 2 organes, à savoir que le rein puisse accumuler des osmolytes compatibles au niveau de la médullaire tandis que les



cellules pulmonaires ne le peuvent. Leur recherche a tenté d'évaluer si les osmolytes pourraient avoir un rôle à jouer dans l'acheminement du mutant  $\Delta F508$  à la membrane plasmique.

En utilisant des cellules de fibroblastes 3T3, Howard et al. (2003) ont analysé l'effet des osmolytes (bétaine, *myo*-inositol, sorbitol, taurine, triméthylamine N-oxyde) lorsqu'ajoutés à une concentration de 300 mM au milieu extracellulaire, rendant ce dernier hypertonique. Après des mesures en immunobuvardage et en électrophysiologie, le groupe a remarqué que le *myo*-inositol, la taurine, le triméthylamine N-oxyde et le sorbitol augmentent la concentration de CFTR- $\Delta F508$  dans l'extrait cellulaire total ainsi que la fonction des cellules l'exprimant. Cet effet d'augmentation observé par immunobuvardage est accru lorsque la température d'incubation cellulaire des cellules 3T3 passe de 37°C à 27°C. Sur des cellules épithéliales rénales provenant de tubules collecteurs de la médullaire interne de souris (mIMCD3; mouse renal inner medullary collecting duct cells), l'effet est aussi obtenu en présence pendant 24 heures d'un milieu extracellulaire contenant du *myo*-inositol, du sorbitol ou de la taurine. Toutefois, il est bien plus faible que sur des fibroblastes. Des analyses subséquentes sur des cellules mIMCD3 ont aussi prouvé que le S-nitrosoglutathione agissait comme osmolyte ayant un effet sur l'augmentation de fonctionnalité du mutant. L'étude suggère donc que c'est la présence d'osmolyte qui permet la sauvegarde du mutant défectueux plutôt que l'hyperosmolarité engendrée lors de l'ajout des osmolytes.

En faisant la même hypothèse que Howard et al. (2003), mais en modifiant l'expérience, Zhang et al. (2003) ont également tenté de récupérer le mutant CFTR- $\Delta F508$  en diminuant les concentrations d'osmolytes extracellulaires utilisées puisque la présence de cotransporteurs devrait permettre aux osmolytes de pénétrer et de s'accumuler dans le cytosol. Pour analyser l'effet des osmolytes sur le CFTR- $\Delta F508$ , les études en immunobuvardage suite à une immunoprécipitation ont utilisé la propriété du canal CFTR à présenter 2 bandes, soient la bande B, immature et non-fonctionnelle, et la bande C, mature et de plus haut poids moléculaire (Zhang et al., 2003). En analyse sur des cellules de l'épithélium bronchique humain (IB3; human bronchial epithelial cell) ont été testés les osmolytes que sont le *myo*-inositol (10

mM) et le glycérol (1 mM), ainsi qu'une séquence d'osmolytes représentée par du *myo*-inositol (10 mM) suivi de bétaine (10 mM) suivi de taurine (10 mM) sur une période de 48 heures. Dans les trois conditions, il y a une augmentation des bandes B et C du CFTR- $\Delta$ F508 qui traduit un accroissement de la protéine synthétisée. De plus, le rapport des bandes C/B est significativement plus élevé que dans les contrôles, ce qui indique un affichage membranaire accru de la protéine mutée. Pour déterminer si le mutant avait également une durée de vie plus longue, les expériences précédentes ont été répétées en utilisant la séquence d'osmolytes préalablement mentionnée qui a été ajoutée à des cellules transformées de rein de singe (COS-7; culture of transformed monkey kidney cells) exprimant un variant couplé à la protéine fluorescente verte (Green Fluorescent Protein; GFP) des CFTR-wt et - $\Delta$ F508. Cette fois encore, les osmolytes peuvent augmenter le rapport C/B et ainsi promouvoir une augmentation de la forme fonctionnelle de la protéine. En outre, un marquage bref des protéines nouvellement synthétisées en présence de méthionine S<sup>35</sup>, suivi d'une chasse de traceur radioactif à temps variables, démontre que la présence d'osmolytes durant 48 h augmente de 2 heures la durée de vie du CFTR- $\Delta$ F508 sous ses formes mature et immature. Ils ont testé la turbidité par diffraction de la lumière afin de déterminer la stabilité des NBD1 de la forme sauvage et mutante. La mesure de turbidité évaluée à 400 nm donne un aperçu du degré d'agrégation d'une protéine. Cette expérience a permis d'observer que le NBD1 a une plus grande stabilité lorsque le *myo*-inositol est présent. En dernier lieu, des analyses en immunobuvardage couplées à des tests fonctionnels confirment que la présence de 10 mM de *myo*-inositol augmente bien l'activité des canaux CFTR- $\Delta$ F508 activés en présence de 1 mM ATP + 75 nM PKA. Ces dernières études ont de plus mis en évidence que la présence d'osmolytes active un canal associé au CFTR, le canal Cl<sup>-</sup> à rectification sortante ORCC (Outwardly Rectifying Cl<sup>-</sup> Channel) (Zhang et al., 2003).

## 1.6. Hypothèses et objectifs

Tel que discuté ci-dessus, les mutations de l'AQP2 D150E et G196D sont présentes chez un même patient qui souffre de polyurie, une conséquence du DIN. Est-il possible, à l'aide de composés chimiques ou de techniques biochimiques, de régler ou tout au moins d'améliorer la condition de ce patient en tentant de cibler spécifiquement ces mutants et de les forcer à exercer leur transport d'eau ?

Le mutant du canal chlore CFTR- $\Delta$ F508 est reconnu pour être peu actif à la membrane des cellules alvéolaires des poumons alors qu'il est fonctionnel au niveau des cellules rénales (Howard et al., 2003). Cette observation a mené l'équipe de Howard et al. (2003) à tenter de comprendre par quel moyen le mutant du CFTR peut se rendre à la membrane des cellules rénales. Suite aux expériences décrites dans l'introduction, Howard et al. (2003) ont pu déterminer que c'est la présence d'osmolytes compatibles, présents en abondance dans le rein mais pas dans le poumon, qui permet un sauvetage de la protéine mutée en favorisant son affichage membranaire au détriment de sa rétention intracellulaire au niveau des systèmes de contrôle de qualité qui l'orientent vers la voie de dégradation. Des études subséquentes de Zhang et al. (2003) ont déterminé que l'ajout de *myo*-inositol à des cellules tumorales IB3 exprimant le CFTR- $\Delta$ F508 jouait le même rôle. Ces résultats s'ajoutent à ceux réalisées sur des AQP2 mutées qui ont montré que les osmolytes compatibles, grâce à leur pouvoir de facilitateurs du repliement protéique, permettent d'acheminer correctement les protéines à la membrane plasmique (Tamarappoo et Verkman, 1998).

Dans la présente étude, nous avons fait l'hypothèse que le *myo*-inositol pourrait favoriser une insertion membranaire plus grande des protéines AQP2-D150E et AQP2-G196D mutantes, de la même façon que le *myo*-inositol avait agi sur CFTR- $\Delta$ F508 (Howard et al., 2003, Zhang et al., 2003).

Pour examiner si le *myo*-inositol permet le sauvetage des AQP2 mutées lorsqu'exprimées dans des ovocytes de *Xenopus laevis*, nous nous sommes fixés les objectifs spécifiques suivants. Dans un premier temps, nous avons étudié la capacité du *myo*-inositol à stimuler l'expression membranaire et la fonctionnalité des mutants

d'AQP2 en fonction de son lieu d'action intra- ou extracellulaire. L'accès du *myo*-inositol au cytosol des ovocytes a été favorisé par la coexpression de son transporteur spécifique SMIT2. Par la suite, nous avons évalué la spécificité (autres types d'inositols) et la sensibilité en évaluant la dose effective médiane ( $ED_{50}$ ) du *myo*-inositol sur l'expression membranaire de différentes formes mutantes de l'AQP2. La spécificité du *myo*-inositol a aussi été analysée en fonction de son effet sur une protéine complètement différente des aquaporines, le CFTR- $\Delta F508$ .

## 2. Matériel et méthodes

### 2.1. Synthèse des ARNc mutés

Au vecteur pT7Ts-wt-AQP2, gracieusement obtenu du Dr. Peter Deen (Centre Médical Nijmegen, Université Radboud), ont été incorporées des mutations ponctuelles par mutagenèse dirigée. Les plasmides mutants sont synthétisés à l'aide d'amorces contenant les mutations AQP2-D150E (sens : 5'-CCTCCACCGAAGAG-CGCCGCG-3' et anti-sens : 5'-CGCGGCGCTCTTCGGTGGAGG-3') et AQP2-G196D (sens : 5'-GTCGTCACCTGACAAATTTGATG-3' et anti-sens : 5'-CATCAAATTTGTCAGTGACGAC-3'). Un séquençage subséquent démontre bien que la mutation désirée est bien présente dans les vecteurs AQP2-D150E et AQP2-G196D. Les plasmides sont ensuite linéarisés à l'aide de l'enzyme de restriction *Sall* (New England Biolabs, Ipswich, MA) à 37°C au cours de la nuit. Pour obtenir l'acide ribonucléique clonal (ARNc), la transcription de l'ADN a été produite par la trousse *T7 RNA polymérase* (Promega, Madison, WI) en utilisant le protocole fourni par le fabricant. Le produit réactionnel final est purifié avec de l'éthanol froid, puis séché et resuspendu dans de l'eau autoclavée. L'intégrité de la séquence de l'ARNc synthétisé a été testée sur gel d'agarose et la concentration établie par dosage de l'ARNc.

### 2.2. Préparation et conservation des ovocytes

*Xenopus laevis*, grenouille sud-africaine utilisée en laboratoire, produit des ovocytes d'environ 1 millimètre de diamètre. Arrivés à leur stade mature (stade V-VI selon Dumont et al. (1978)), ils sont employés pour des analyses d'expression protéique. L'avantage des ovocytes sur les autres modèles, tel la cellule en culture ou la levure, pour l'étude des protéines tient dans le fait que l'ovocyte est de grande taille, facilitant sa manipulation et son observation. Aux stades V-VI, l'ovocyte exprime peu de protéine dû au fait que la machinerie métabolique est prête à la synthèse de protéines *de novo* suivant la fécondation. Donc, l'expression d'ADN ou

d'ARN injecté est maximisé face à l'expression intrinsèque de l'ovocyte (Brown, 2004, Wagner et al., 2000).

Afin d'extraire les ovocytes, les grenouilles sont tout d'abord anesthésiées avec de la tricaine (4 g dans 3 l d'eau) pendant approximativement 20 minutes. Lorsqu'endormies, le réflexe moteur peut être évalué en pinçant une patte tout en observant si l'amphibien réagit par rétraction. Couchée sur le dos sur une couche jetable placée sur de la glace, une grenouille reste endormie durant toute la procédure. Tout d'abord, il faut désinfecter le ventre puis effectuer une incision d'un centimètre de longueur avec une lame stérile à 0,5 cm à droite ou à gauche de la ligne médiane de l'abdomen. Suite à cette coupure de la peau, une seconde incision doit être pratiquée au travers du muscle abdominal pour rendre les ovaires accessibles. Il suffit alors d'extraire les ovocytes contenus dans un lobe ovarien à l'aide de pinces recourbées non-dentées. Ces paquets d'ovocytes recouverts de cellules folliculaires sont ensuite déposés dans une boîte de Pétri contenant une solution de Barth (voir composition plus bas) pour en isoler les ovocytes par balayage des paquets folliculaires à l'aide de pinces recourbées. De la grenouille est extraite la quantité voulue d'ovocytes avant de replacer le lobe ovarien dans la grenouille. La plaie ouverte est ensuite désinfectée avec des serviettes antiseptiques (chlorure de benzalconium) et recousue avec du fil de soie en faisant des points de suture chirurgicaux liant les lèvres de la plaie et de l'entaille dans le muscle abdominal. De 3 à 4 opérations peuvent être faites sur une même grenouille en s'assurant de laisser un intervalle d'au moins un mois entre chaque opération pour que la plaie de l'opération précédente ait le temps de se cicatriser.

Des ovocytes isolés, nous ne prenons que ceux ayant atteint le stade V de maturation (1 mm de diamètre) afin d'obtenir une expression optimale et une faible activité intrinsèque de l'ovocyte. Après ce tri, la défolliculation enzymatique est effectuée en plaçant les ovocytes dans une solution de Barth sans calcium avec de la collagénase (1,625 mg/ml) sur une plaque tournant à basse vitesse pendant environ 1 heure. Un lavage avec un milieu de Barth sans calcium permet ensuite d'éliminer une grande quantité de membranes folliculaires. Les ovocytes sont finalement conservés dans un milieu de Barth avec sérum maintenu à 18°C où ils restent jusqu'à leur

utilisation. Afin de permettre aux ovocytes ayant subi un tel traitement de bien reprendre leur rondeur et de s'habituer au milieu artificiel, une période de récupération variant de une à 18 heures est souhaitable avant l'injection.

### **2.3. Injection des ovocytes**

Pour l'injection, les ovocytes sont placés dans un milieu ne contenant pas de sérum. L'injection s'effectue avec l'aide du microinjecteur Nanoject II (Drummond Scientific Company, Broomall, PA) dans lequel est placé un tube de verre qui est rempli d'huile, pour éliminer la présence d'air en son sein, et de la quantité d'ARNc nécessaire pour l'injection. Les ovocytes sont perforés et injectés un à un à raison de 1 ou 10 ng d'ARNc dans les cas respectifs des AQP2-wt ou des mutants de l'AQP2, SMIT2, CFTR et CFTR- $\Delta$ F508. Suite à l'injection, les ovocytes sont replacés dans une solution de Barth contenant du sérum et incubés à 16°C. Le temps d'incubation des différentes AQP2 est d'une journée tandis qu'il est de 3 à 4 jours pour SMIT2, CFTR et CFTR- $\Delta$ F508. Lorsque les ovocytes sont mis en présence d'osmolytes, le milieu d'incubation des ovocytes est une solution saline supplémentée avec les différents osmolytes compatibles.

### **2.4. Immunofluorescence**

Trois jours après injection, les ovocytes servant à l'immunofluorescence sont fixés avec 1 % de formaldéhyde dans du méthanol suite à une équilibration d'une nuit dans une solution de Barth supplémentée de 30 % de sucrose. Les ovocytes sont enveloppés dans un milieu d'enrobage Tissue-Tek dilué 1/7<sup>ième</sup> dans de l'eau (Sakura Finetek, USA), congelés et coupés en tranches d'une épaisseur de 10  $\mu$ m à l'aide d'un cryostat. Les coupes sont montées sur des lames de verre, rincées trois fois dans de la solution saline en tampon phosphaté (PBS; Phosphate Buffer Saline) et bloquées contre les liaisons non-spécifiques en appliquant une solution d'albumine de sérum bovin (Bovine Serum Albumine; BSA) à 2 % pendant 30 minutes à la température ambiante. Elles sont ensuite incubées avec l'anticorps primaire  $\alpha$ -AQP2

(1/20:N-20, Santa Cruz Biotechnology, goat polyclonal antibody), dans une chambre humide pendant 90 minutes. Après trois lavages dans du PBS, l'anticorps secondaire conjugué à l'Alexa 488 (1/1000:anti-goat, Molecular Probes) est ajouté pour une durée de 1 heure. Les coupes ont été recouvertes de lamelles de verre pour éviter qu'elles ne rétrécissent ou ne se désagrègent à l'air libre. L'observation se fait à un grossissement de 20X en utilisant une longueur d'onde d'excitation de 488 nm et un filtre d'émission centré à 515 nm.

## 2.5. Milieux d'incubation des ovocytes

Les milieux d'incubation des ovocytes sont préparés à partir d'une solution de Barth (en mM : 90 NaCl, 3 KCl, 0,82 MgSO<sub>4</sub>, 0,41 CaCl<sub>2</sub>, 0,33 Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, et 5 Hepes, pH 7,6). La solution de Barth avec sérum est supplémentée avec 5 % de sérum de cheval, 2,5 mM de pyruvate de sodium, 100 U/ml de pénicilline, et 0,1 mg/ml de streptomycine.

Les solutions contrôles iso-osmotiques (saline) employées lors des expériences de volumétrie et d'électrophysiologie contiennent (en mM): 80 NaCl, 3 KCl, 0,82 MgCl<sub>2</sub>, 0,74 CaCl<sub>2</sub> et 25 mannitol à pH 7,6. Pour obtenir la solution saline de 20 mOsmol hypotonique (saline-hypo), milieu ayant 20 mOsmol de moins que la saline et utilisée lors de la volumétrie, 20 mM de mannitol a été enlevé de la solution précédente. Les solutions comportant des osmolytes compatibles voyaient leur quantité de mannitol diminuée de 0,5, 1, 2, 5 ou 15 mM de mannitol au profit de bétaine, glycérol, *myo*-inositol, taurine, *D-chiro*-inositol ou *L-chiro*-inositol. Pour des concentrations plus négligeables d'osmolytes compatibles (0,05, 0,1, 0,2 ou 0,4 mM), ceux-ci étaient ajoutés à la solution saline sans tenir compte de l'osmolarité additionnelle. Les solutions incorporant du *myo*-inositol étaient fraîchement faites le jour de l'expérience. Les solutions iso-osmotique et hypo-osmotique faisant intervenir de l'urée (saline-urée) avaient respectivement une base de solution saline ou une base de solution saline-hypo à laquelle était ajouté 200 mM d'urée.

Les osmolalités mesurées pour la saline et ses dérivés comprenant des osmolytes compatibles étaient de 197 mOsmol(kg H<sub>2</sub>O)<sup>-1</sup>, la solution saline-hypo



ayant une différence d'osmolalité inférieure de  $20 \text{ mOsmol}(\text{kg H}_2\text{O})^{-1}$ . La salinurée, elle, présentait une osmolalité de  $397 \text{ mOsmol}(\text{kg H}_2\text{O})^{-1}$  et la même déduction que précédemment était maintenue pour sa contrepartie hypo-osmotique. L'osmolalité des solutions était mesurée à  $\pm 2 \text{ mOsmol}(\text{kg H}_2\text{O})^{-1}$  en se servant d'un osmomètre à point de congélation (Advanced DigiMatic Osmometer, model 3D2, Advanced Instruments, Needham Heights, MA, USA).

## 2.6. Perméabilité à l'eau (volumétrie)

L'appareil employé pour effectuer les mesures de volumétrie (figure 2.1) ressemble à celui décrit par Zeuthen et al.(1997) et présente une chambre d'analyse de  $120 \mu\text{l}$  environ taillée dans une plaque de plexiglass et ouverte sur le dessus. Le flux de solution est de  $1,2 \text{ ml/min}$  et l'espace mort entre le sélecteur de solution, une valve électrique activée par un bras, et le bain est d'environ  $50 \mu\text{l}$ . En dedans de 3 secondes, la chambre peut être complètement vidée et remplie d'une solution fraîche. La source lumineuse est une diode à émission de lumière (LED; Light-Emitting Diode) de  $2 \text{ mm}$  par  $15 \text{ mm}$  apposée sur la surface de la solution afin de diminuer la distorsion ou la réflexion lumineuse.

Le volume de l'ovocyte a été calculé par un ordinateur (Athlon P4 avec carte Firewire) qui mesure préalablement la surface d'une coupe transversale d'ovocyte dans la chambre d'analyse à l'aide d'une caméra (Baster AG A601f, Germany) captant ses images par l'intermédiaire d'un objectif 3X. Le système est calibré à l'aide d'une bille d'acier de  $1 \text{ millimètre}$  de diamètre représentant un ovocyte. Les images sont transmises à l'ordinateur dans lequel elles sont digitalisées par un convertisseur digital/analogique connecté au port parallèle. Le volume estimé est transmis par réseau interne à un autre ordinateur qui l'affiche dans Clampex 9.2 (Axon Instruments Inc., Sunnyvale, CA) sous forme d'une courbe de changement de volume en temps réel. La caméra permet la capture de 60 images par seconde et, pour chaque tranche de 30 données, une moyenne est effectuée qui représente le volume observé à chaque demi-seconde. Le niveau de bruit d'une mesure dans ces conditions est de  $0,001 \%$ .

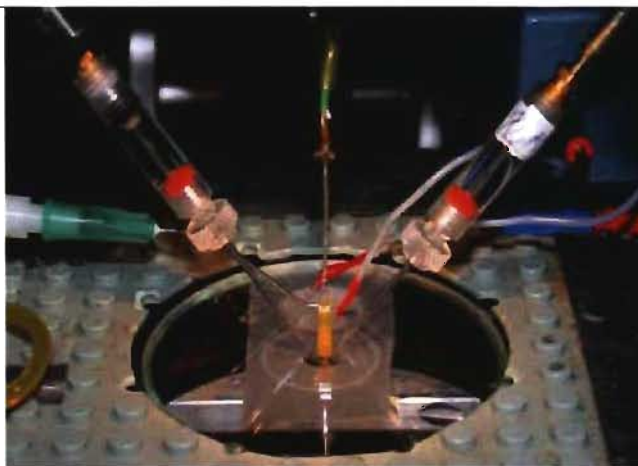
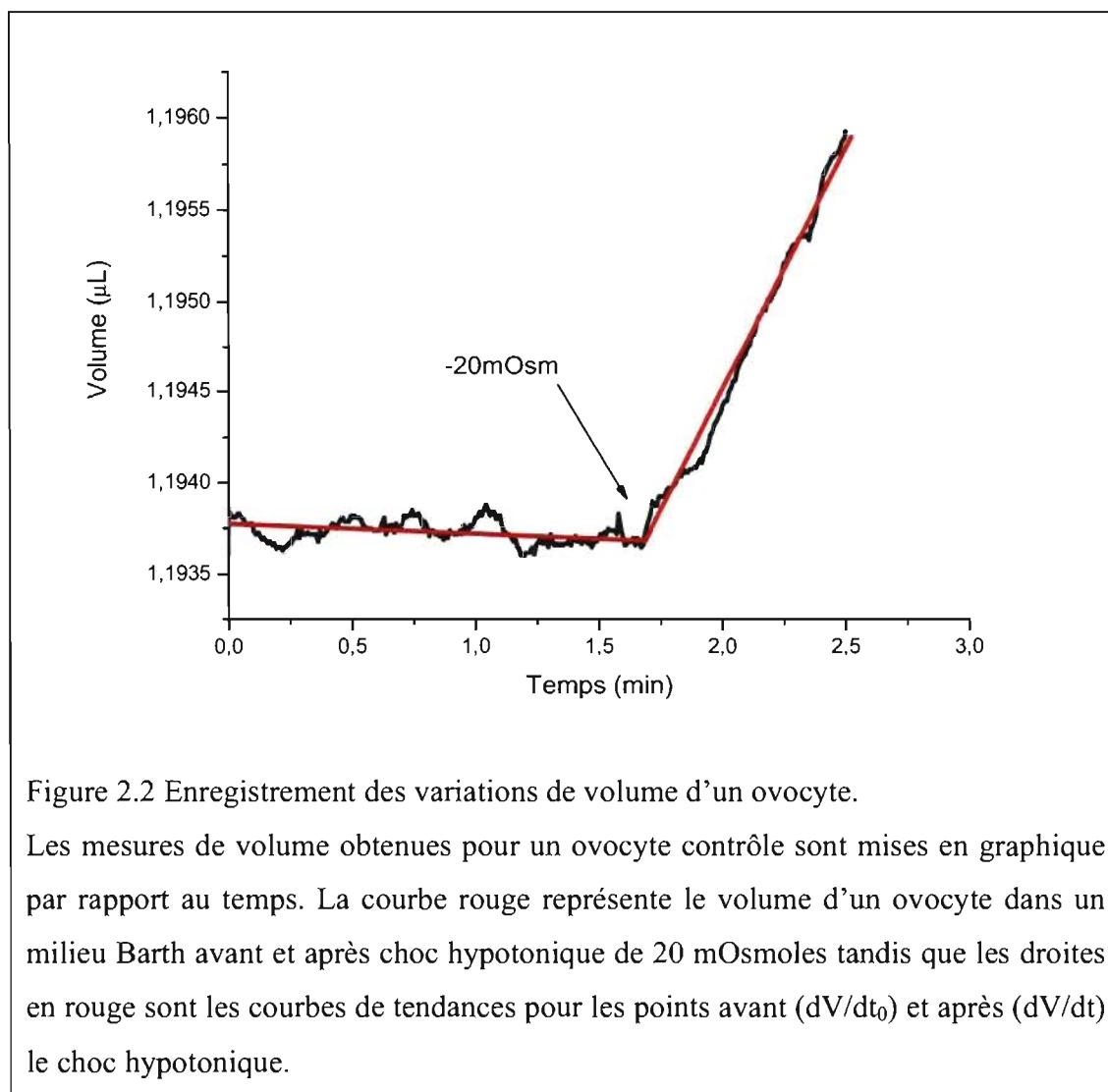


Figure 2.1 Appareillage servant à la mesure de volume chez les ovocytes.

L'appareillage est muni de deux porte-électrodes, servant à immobiliser l'ovocyte, et d'une source lumineuse servant à fournir la lumière pour la prise de mesure effectuée par une caméra connectée à un objectif 3x d'un microscope inversé. Le montage comporte aussi une chambre de perfusion de volume réduit où une solution physiologique circule du fond vers la surface.

Avant l'expérience, les ovocytes incubés dans une solution de Barth sont transférés dans la solution saline pendant 15 minutes afin qu'ils s'adaptent à la solution de flux. Le volume d'un ovocyte dans la solution saline est fixé à 0 et les perméabilités membranaires pour l'eau ( $P_f$ ) sont mesurées en fonction de cette valeur. Dans la figure 2.2, la valeur de  $P_f$  est obtenue par la différence entre les pentes mesurée avant et après le choc hypotonique et reportée en  $\mu\text{l}\cdot\text{s}^{-1}$ .



## 2.7. Enregistrements électrophysiologiques

Le courant résultant des charges transportées à travers la membrane des ovocytes exprimant le CFTR est enregistré à l'aide de la technique de voltage imposé à double électrodes insérées dans un ovocyte. Une électrode mesure le potentiel membranaire par rapport à une électrode de référence placée dans le bain. L'autre électrode est sous contrôle de l'amplificateur (Oocyte clamp OC-725C de Warner Instrument Corp.) qui injecte un courant jusqu'à ce que le potentiel demandé soit atteint. Ceci permet de mesurer le courant pour une gamme de potentiels membranaires s'étalant de -125 mV à +50 mV, par saut de 25 mV. Les données de

voltages et de courants sont numérisées par un convertisseur Digidata 1322A (Axon Instruments Inc., Sunnyvale, CA) et enregistrées par Clampex 9.2.

Les microélectrodes de verre de borosilicate sont d'environ 1,5 mm de diamètre avant étirement. L'étirement avec une étireuse (Flaming/Brown micropipette puller Model P-97, Sutter Instrument Company, USA) résulte en une cassure franche formant deux bouts pointus de 0,5-1  $\mu\text{m}$  de diamètre interne. Ces deux tubes de verres pointus à une extrémité servent d'électrodes qui sont remplies de 1 M KCl et peuvent atteindre une résistance de 2 à 5  $\text{M}\Omega$  avec un potentiel de pointe inférieur à 5 mV.

Les enregistrements électrophysiologiques récoltés étaient en temps continu à un potentiel de -50 mV ou variant sur des gammes de potentiels mentionnés ci-haut, récoltés à toutes les minutes. L'analyse des données a été effectuée à l'aide de Clampfit 9.0 (Axon Instruments Inc., Sunnyvale, CA) afin de passer des données courant-voltage (I-V) brutes à des courbes I-V avant et après activation des canaux Cl<sup>-</sup>. Les données ont été analysées exprimées pour chacun des ovocytes testés afin de déterminer la variabilité et de caractériser ponctuellement l'expression du CFTR mutant.

## **2.8. Immunobuvardages de type Western**

### **2.8.1. Préparation des échantillons**

La préparation de membranes totales a été effectuée sur 50 à 200 ovocytes, initialement placés dans un volume de 1,5 ml de PBS contenant 0,05 % de Triton X-100 par lot de cinquante ovocytes. Ils sont homogénéisés à l'aide de 10 coups d'un homogénéisateur Potter-Elvehjem. La solution homogène ainsi obtenue est ensuite centrifugée à 4°C durant 5 minutes à 200g. Le surnageant est récupéré et recentrifugé à 20 000g pour une période de 20 minutes à 4°C. Le surnageant obtenu est éliminé et la portion blanche du culot resuspendue dans un volume de 1  $\mu\text{l}$  de PBS par ovocyte initial.

Les membranes plasmiques ont été obtenues de 40 ovocytes. Au départ, les ovocytes sont rincés dans une solution tamponnée à pH 6,0 par l'acide 2-(N-Morpholino)éthane sulfonique (MES) et contenant 80 mM NaCl puis placés dans cette solution additionnée de 0,005 % de subtilisine A (Sigma-Aldrich, St Louis, MO) pendant 10 minutes avec faible agitation pour permettre la digestion de la membrane vitelline. Les deux incubations suivantes de 60 minutes sont effectuées à 4°C dans la solution MBSS, la première en présence de 1 % de ludox (Sigma-Aldrich) et la seconde de 0,1 % d'acide polyacrylique (Sigma-Aldrich) avec trois rinçages subséquents des ovocytes. L'homogénéisation des ovocytes est effectuée à l'aide d'un micropipetteur dans un tampon d'homogénéisation A (HbA) froid (en mM) : 5 MgCl<sub>2</sub>, 5 NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1 Éthylènediaminetétraacétate (EDTA), 80 sucrose, and 20 Trishydroxyméthylaminométhane (Tris) pH 7,4). Le volume est augmenté à 1,5 ml avec du HbA et la préparation centrifugée à 16g pendant 30 s à 4°C. Après élimination du surnageant, le culot (~ 100 µl) est resolubilisé dans 1 ml de HbA et recentrifugé dans les mêmes conditions avec élimination du surnageant. Ces opérations sont répétées pour des centrifugations à 25g et à 35g, toujours en récupérant un culot de membranes plasmiques. Une dernière centrifugation à 16 000g est effectuée pour obtenir des membranes plasmiques pures dans le culot qui est resuspendu dans 10 µl de HbA froid.

### **2.8.2. Électrophorèse, transfert et immunobuvardage**

Des volumes de 1 µl (homogénats) et 5 µl (membranes plasmiques) additionnés de tampon d'échantillon (1:1;125 mM Tris/HCl, glycérol 20 % (v/v), sodium dodécylsulfate (SDS) 4 % (w/v), β-mercaptoéthanol 5 % (v/v), bleu de bromophénol 0,0005 % (w/v), pH 6,8) sont chargés sur un gel de polyacrylamide. Le gel de séparation de 12 % est formé en mélangeant 4,0 ml d'acrylamide 30 %, 2,5 ml de Tris 1,5 M pH 8,8, 3,4 ml d'eau distillée et désionisée, 0,1 ml de SDS 10 %, 0,05 ml d'ammonium persulfate et 0,01 ml de N,N,N',N'-Tétraméthyléthylènediamine (TEMED). Suite à l'ajout du TEMED, le gel est coulé rapidement, en évitant les

bulles d'air, entre deux plaques de verres (Bio-Rad, Hercules, CA) espacées d'un centimètre et demi. Il polymérise en dedans d'une demi-heure. Pour obtenir le gel de concentration de 4 %, il suffit de mélanger 1,3 ml d'acrylamide 30 %, 7,35 ml d'eau distillée et désionisée, 1,25 ml de Tris 1,0 M pH 6,8, 0,1 ml de SDS 10 %, 0,05 ml d'APS et 0,01 ml de TEMED. Le gel est coulé par dessus le gel de séparation et le peigne, délimitant les puits, y est inséré jusqu'à la fin de la polymérisation (environ 15 min).

L'électrophorèse des protéines est effectuée à 150 V dans le tampon de migration (Tris 25 mM, glycine 192 mM, pH 8,3, SDS 0,1 %) jusqu'à ce que le bleu de bromophénol, délimitant le front de migration, atteigne le bas du gel. Dans le premier puits des gels ont été introduits des standards protéiques de masse moléculaire connue (250, 150, 100, 75, 50, 37, 25, 15 et 10 kDa). Les protéines du gel sont électrotransférées, sous un voltage de 100 V pendant 45 minutes à 4°C, sur membrane de nitrocellulose mise en sandwich entre des feuilles de papier Whatman et des éponges de mousse qui sont équilibrées dans du tampon de transfert froid (Tris 25 mM, glycine 192 mM, pH 8,3, méthanol 20 % (v/v)), le tout placé dans une cassette de transfert et immergé dans le tampon de transfert. Par la suite, la feuille de nitrocellulose est tout d'abord incubée dans une solution saline tamponnée au Tris (Tris-buffered saline; TBS)-Tween 0,1 % (40 mM de Tris, 0,274 M NaCl à pH 7,5, Tween 0,1 %) avec 5 % de lait écrémé pendant 30 minutes à température pièce et, par la suite, incubée à 4°C pendant la nuit avec cette solution contenant l'anticorps  $\alpha$ -AQP2 (1/500:N-20). Après trois rinçages de 15 minutes dans 15 ml de solution de TBS-Tween 0,1 %, la membrane est réincubée en suivant la même procédure que précédemment mais cette fois avec un anticorps secondaire anti-immunoglobuline G (IgG) de chèvre (1/20 000) lié à la peroxydase de raifort (Santa Cruz Biotech, CA) durant 1 heure. Il y a rinçage de l'anticorps secondaire trois fois avec 15 ml de solution TBS-Tween 0,1 %. La révélation est obtenue avec un Phototope-HRP de chimiluminescence (New England Biolabs, Ipswich, MA). Pour obtenir la solution de révélation, il faut mélanger dans un tube les solutions de détection A et B dans un rapport 1:1. Celle-ci est ensuite appliquée sur la membrane de nitrocellulose partiellement séchée pendant 5 minutes. La membrane est ensuite placée dans un

plastique d'acétate de cellulose ou recouverte de papier cellulose sans laisser de bulles d'air, le tout étant introduit dans la cassette à révélation. Dans la chambre noire est introduit un film pour rayon X sur la membrane pour des temps de contact de 5 sec, 30 sec, 1 min, 5 min, 15 min ou 1 heure.

## 2.9. Absorption de *myo*-inositol radioactif

Pour les analyses de transport du *myo*-inositol radioactif, les ovocytes contrôles exprimant SMIT2 (incubation de 5-7 jours) sont rincés deux fois avec une solution de Barth et le transport est initié par le remplacement de cette solution par la solution de transport contenant 10  $\mu\text{M}$  de *myo*-inositol ainsi que du *myo*-inositol radioactif (1  $\mu\text{Ci}\cdot\text{ml}^{-1}$  [ $^3\text{H}$ ]*myo*-inositol, activité spécifique, 20  $\text{Ci}\cdot\text{mmol}^{-1}$ ). La composante non-spécifique du transport a été évaluée par une incubation similaire en présence de 15 mM de *myo*-inositol froid. Les ovocytes sont incubés par groupe de 8 à 10 à température de la pièce pendant 1 heure dans 1 ml de milieu. L'incubation est arrêtée par l'élimination rapide du traceur radioactif suivie d'une addition de 2 ml de solution de Barth conservée sur glace. Les ovocytes sont rincés trois fois et placés individuellement dans des fioles à scintillation. La lyse des ovocytes est effectuée en présence de 0,2 ml d'une solution de 10 % SDS pendant 2 heures avant l'addition du mélange à scintillation (BetaBlend, ICN Biomedicals, Aurora, Ohio). Les fioles à scintillation sont ensuite placées dans un compteur à scintillation LS6000 SC (Beckman Instruments, Inc., Anaheim, CA) en utilisant une fenêtre de lecture adéquate pour le tritium.

## 2.10. Analyses

La perméabilité membranaire pour l'eau ( $P_f$ ) d'un ovocyte est calculée à l'aide de l'équation suivante

$$P_f = \frac{1}{S \times v_w \times \Delta\pi} \left[ \frac{dV}{dt} - \frac{dV}{dt_{t=0}} \right] \quad (1)$$

dans laquelle  $dV/dt_0$  ( $\mu\text{l/s}$ ) et  $dV/dt$  ( $\mu\text{l/s}$ ) sont les flux d'eau mesurés avant et après le choc hypotonique,  $S$  est la surface standard d'un ovocyte ( $3,14 \times 10^{-2} \text{ cm}^2$ ),  $v_w$

représente le volume spécifique de l'eau ( $18,2 \text{ cm}^3 \cdot \text{mol}^{-1}$ ) et  $\Delta\pi$  indique la variation d'osmolarité durant l'expérience ( $200 \text{ mOsmol} - 180 \text{ mOsmol} = 20 \text{ mOsmol}$  ou  $0,2 \text{ mmol cm}^{-3}$ ) (Zampighi et al., 1995).

Les expériences ont été faites sur un minimum de 8 ovocytes et répétées sur au moins 3 groupes d'ovocytes différents (i.e. provenant de 3 grenouilles différentes). Les données présentées sont les moyennes de 8 expériences ou plus avec leurs écarts standards à la moyenne (SEM) qui sont portés en barres d'erreur. Les données électrophysiologiques ont été traitées différemment puisqu'elles représentent un nombre  $n$  de mesures effectués sur 6 grenouilles différentes. Toutes les données obtenues en électrophysiologie ont été analysées une à une afin d'évaluer la tendance au cours des semaines. Les groupes de données ont été comparés par tests  $t$  de Student pairés ou par analyse de variance à l'aide d'un test de différence franchement significatives (HSD; honestly significant difference) de Tukey selon les circonstances.



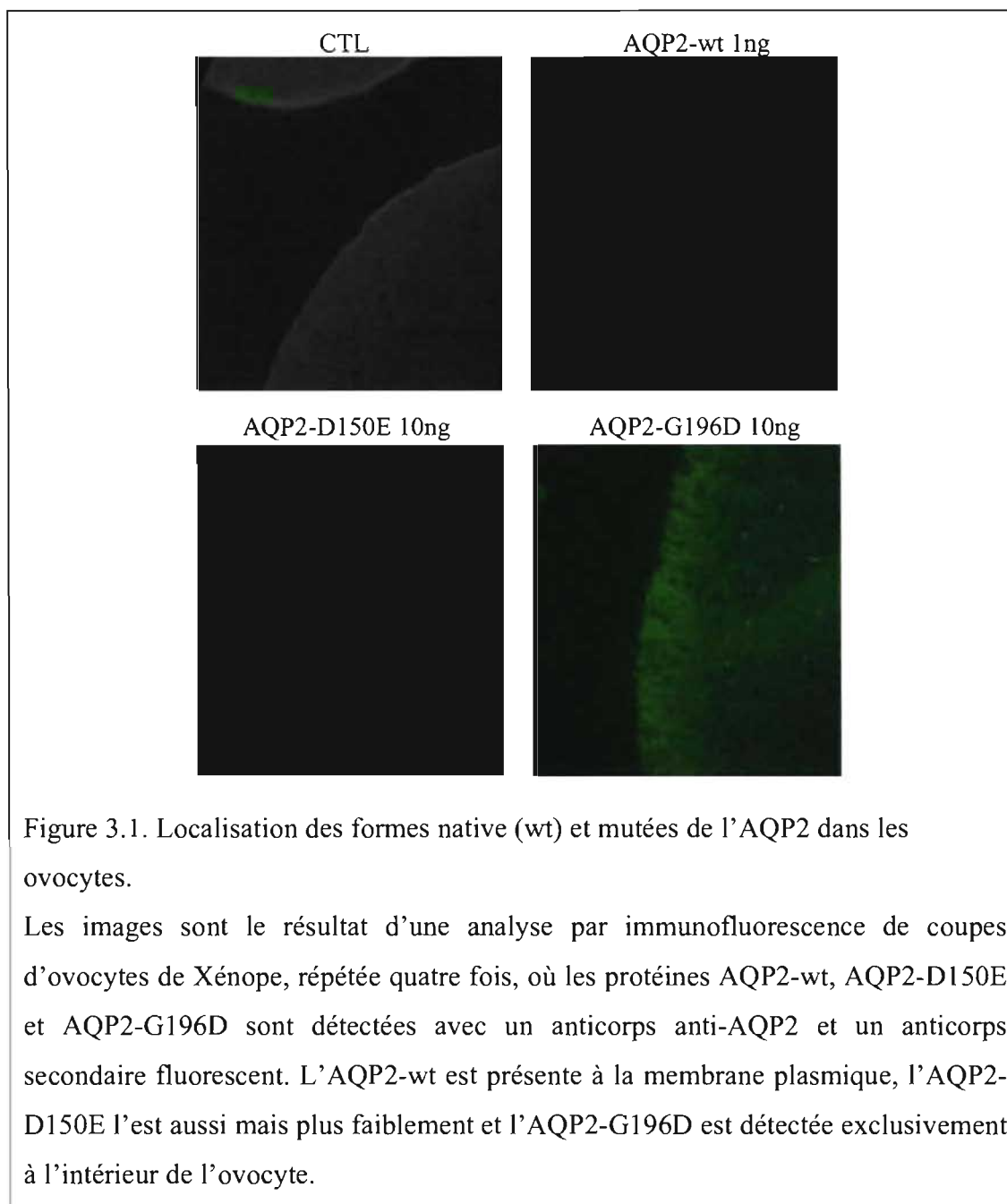
## 3. Résultats

### 3.1. Expression des formes native et mutées de l'AQP2

#### 3.1.1. Immunofluorescence

Comme préalablement établi dans d'autres laboratoires comme celui de Peter Agre en 1993, les ovocytes de *Xenopus laevis* peuvent être employés pour évaluer la capacité de transport d'eau des aquaporines (Agre et al., 1993). C'est ce même modèle que nous utilisons au cours de nos études pour évaluer l'expression des formes native et mutées de l'AQP2. À prime abord, il est important de savoir si les mutants analysés sont exprimés à la membrane et à quel degré par rapport au type sauvage.

En analyse par immunofluorescence, les formes mutées D150E et G196D de l'AQP2 sont exprimées dans les ovocytes, différemment de la forme native (wt) (figure 3.1). Les ARNc d'AQP2 mutées doivent être injectés à une concentration 10 fois plus grande afin que l'expression protéique dans les ovocytes résulte en une quantité équivalente de protéines synthétisées. Malgré cette injection 10 fois plus importante, l'AQP2-D150E n'est présente que partiellement à la membrane plasmique des ovocytes, membrane moins lumineuse que la figure présentant l'AQP2 native, tandis que l'AQP2-G196D reste dans des vésicules intracellulaires, visible par des taches fluorescentes aux abords de la membrane plasmique.



### 3.1.2. Perméabilités membranaires

Les formes native et mutées de l'AQP2 ont été évaluées pour leur fonction physiologique par volumétrie des ovocytes. À la figure 3.2 sont présentés des ovocytes subissant un choc hypotonique de 20 mOsmol, ce qui provoque une augmentation de leur volume (exprimée en pourcentage). Le taux d'augmentation de

volume de l'AQP2 native est le plus grand de toutes les conditions expérimentales. La forme mutée D150E présente une réponse moins prononcée, alors que pour la forme G196D, qui a la pente la plus faible pour un ovocyte exprimant une forme de l'AQP2, il n'y a pas de différence significative de pente avec un ovocyte non-injecté. Les valeurs de  $P_f$  associées aux courbes de la figure 3.2 sont respectivement de l'ordre de  $3,4 \pm 0,2 \times 10^{-4} \text{ cm}\cdot\text{s}^{-1}$ ,  $3,1 \pm 0,1 \times 10^{-4} \text{ cm}\cdot\text{s}^{-1}$ ,  $11,4 \pm 0,4 \times 10^{-4} \text{ cm}\cdot\text{s}^{-1}$  et  $25,3 \pm 0,5 \times 10^{-4} \text{ cm}\cdot\text{s}^{-1}$  pour les ovocytes non-injectés, injectés avec le mutant G196D, D150E et la forme native.

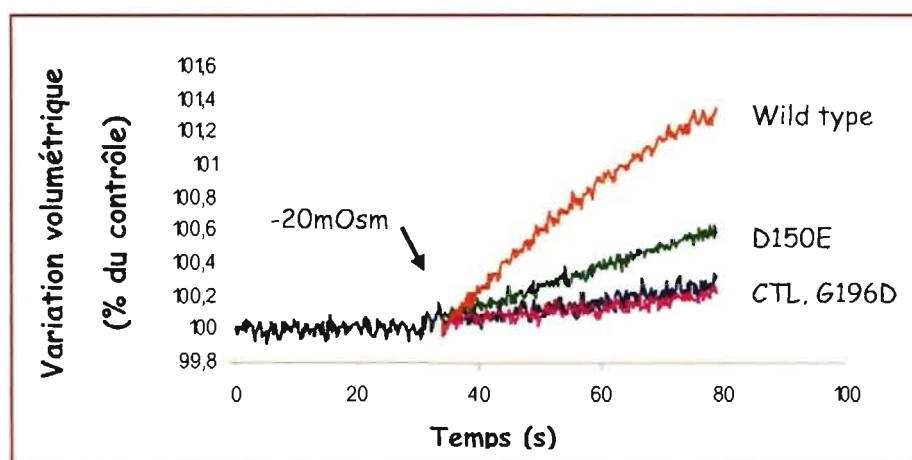


Figure 3.2. Réponse des ovocytes exprimant les AQP2 native et mutées à un choc hypotonique de 20 mOsmol.

L'expérience présente la réponse des ovocytes exprimant les formes native et mutées de l'AQP2 lorsque soumis à un choc hypotonique de 20 mOsmol. Puisqu'il y a une grande variabilité du volume d'un ovocyte au repos, les valeurs de variation volumétrique ont été reportées à 100 % au lieu d'être présentées en  $\mu\text{l}$ . La figure montre un résultat, obtenu à partir de 4 ovocytes, qui représente fidèlement les moyennes de perméabilité à l'eau mesurées sur un grand nombre d'ovocytes dans chaque condition.

En résumé, les résultats d'immunofluorescence et de perméabilité à l'eau ( $P_f$ ) montrent que le mutant AQP2-D150E conserve une activité significative tandis que le mutant G196D présente une perte de fonction totale.

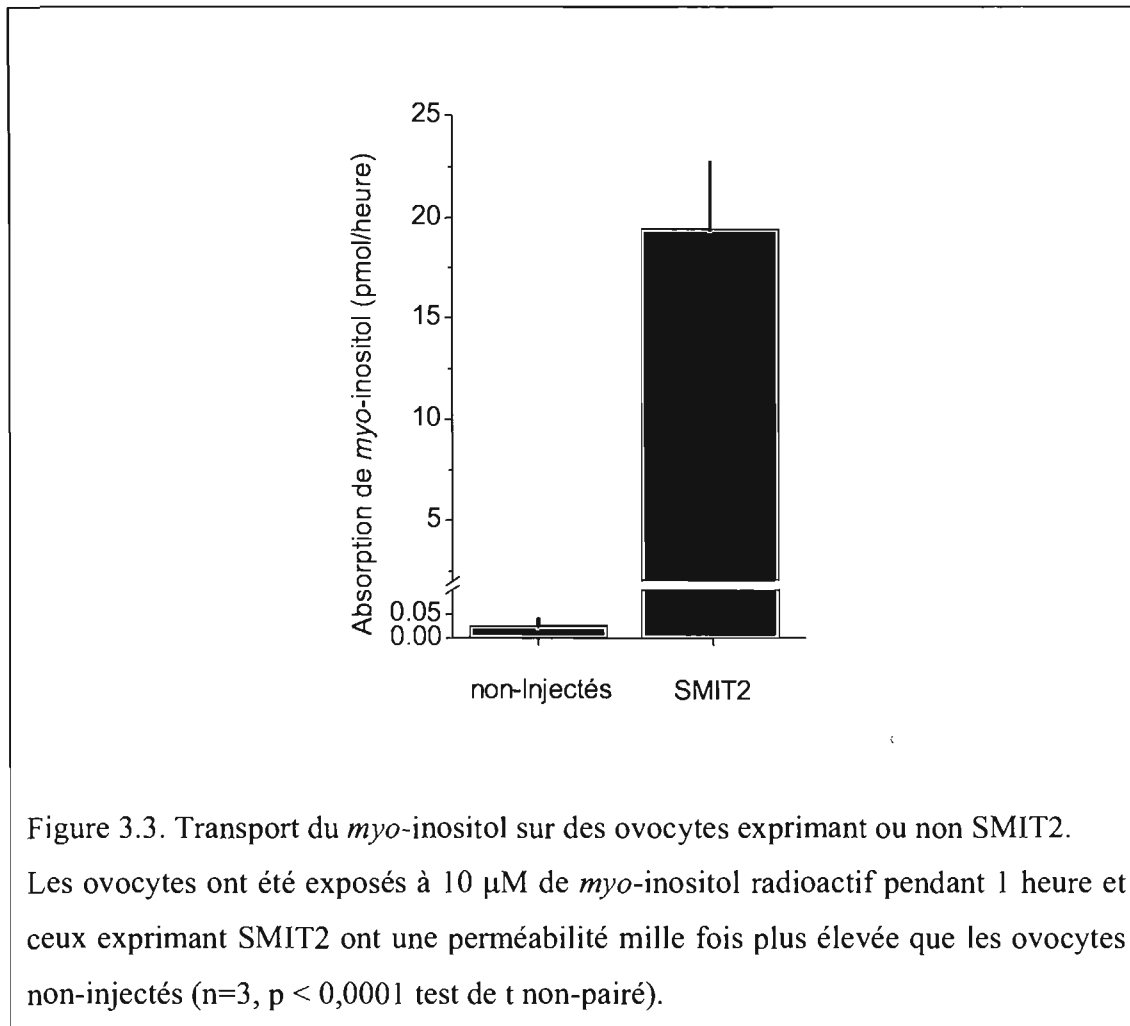
## **3.2. Effet du *myo*-inositol sur l'expression des formes native et mutées de l'AQP2**

### **3.2.1. En présence de SMIT2**

Les résultats des figures 3.1 et 3.2 laissent présumer que les mutants se rendent peu ou pas à la membrane plasmique et qu'ils ont une activité affaiblie face à la forme native. Dans le but d'obtenir une augmentation de l'expression ou de la fonctionnalité des protéines mutantes, nous avons pensé à incuber les ovocytes avec des osmolytes compatibles qui, en agissant tels des chaperonnes chimiques, permettraient éventuellement une récupération des formes mutées de l'AQP2. Au départ, nous avons opté pour l'utilisation du *myo*-inositol puisqu'il a déjà été décrit comme osmolyte compatible dans la récupération du CFTR- $\Delta$ F508 par les équipes de Howard et al. (2003) et Zhang et al. (2003).

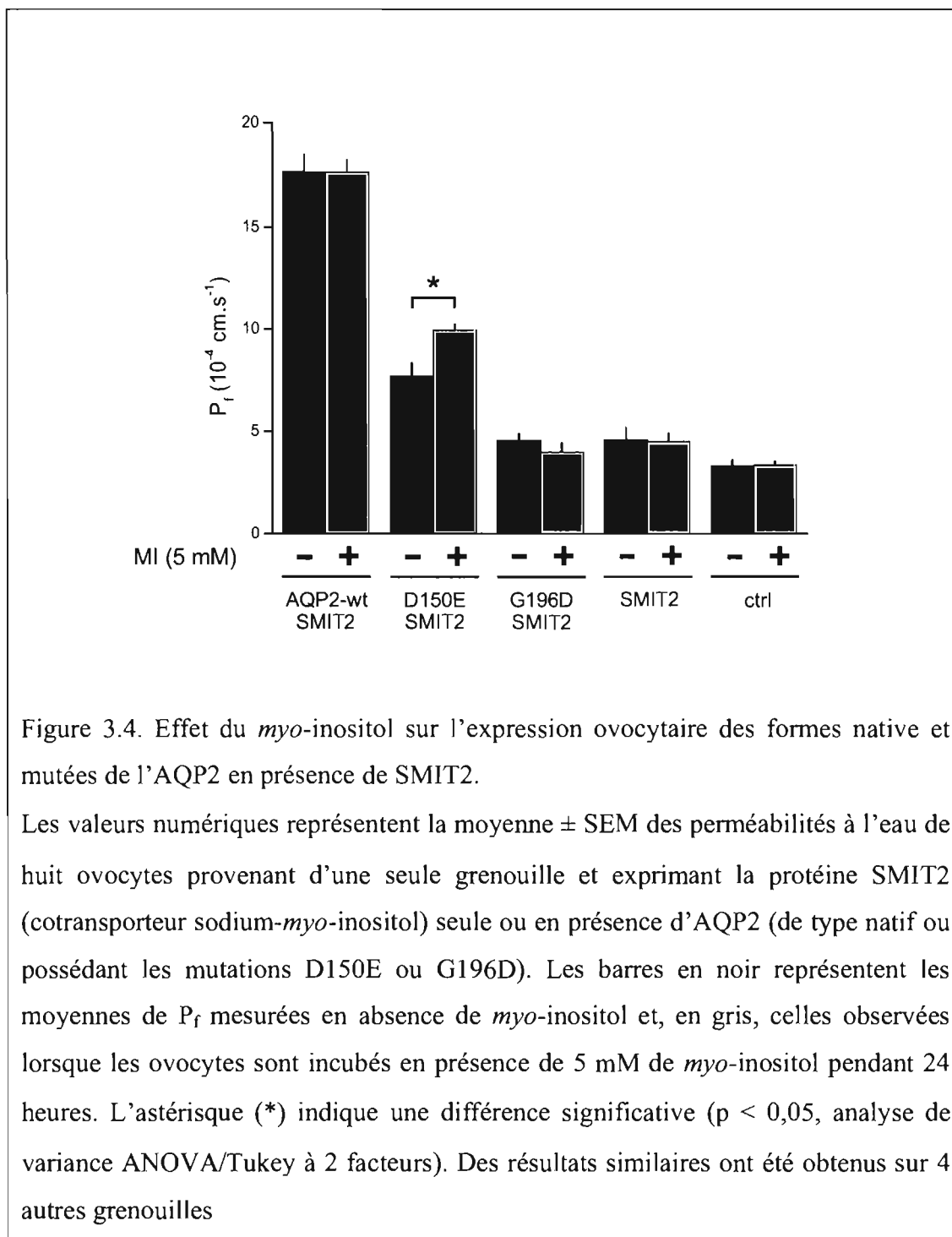
*A priori*, on croit qu'il est nécessaire pour le *myo*-inositol de traverser la membrane plasmique pour agir sur le repliement protéique. Puisque l'ovocyte est imperméable aux sucres, la présence d'un transporteur de *myo*-inositol comme SMIT2 devrait permettre de faire entrer le *myo*-inositol et, même, de l'accumuler à une concentration supérieure à la concentration extracellulaire utilisée. Afin de permettre au *myo*-inositol d'exercer son effet de l'intérieur de la cellule, nous avons observé la capacité des ovocytes exprimant SMIT2 à absorber le *myo*-inositol (figure 3.3). Dans cette figure sont comparés des ovocytes non-injectés à d'autres exprimant SMIT2 pendant trois jours quant à leur capacité d'accumuler du *myo*-inositol radioactif présent à une concentration extracellulaire de 10  $\mu$ M. Elle montre que la présence de SMIT2 dans les ovocytes permet l'entrée de *myo*-inositol à une vitesse de 19,4 pmol/heure comparativement à 0,02 pmol/heure pour les ovocytes contrôles. La valeur contrôle mesurée avec 10  $\mu$ M de traceur radioactif permet d'évaluer que,

en 24 heures, il y aurait donc environ 1  $\mu\text{M}$  de *myo*-inositol à l'intérieur des ovocytes.



La figure 3.4 montre les  $P_f$  mesurées pour différents groupes d'ovocytes non-injectés ou exprimant différentes combinaisons d'AQP2 et de SMIT2. Les ovocytes sont tout d'abord injectés avec SMIT2 à raison de 10 ng d'ARNc et conservés pendant 3 jours avant l'injection de l'AQP2 à raison de 1 ou 10 ng d'ARNc pour les formes respectivement native ou mutées. Les ovocytes non-injectés ont une  $P_f$  de  $3,3 \pm 0,3 \times 10^{-4} \text{ cm}\cdot\text{s}^{-1}$  et l'expression du cotransporteur Na/MI produit une augmentation légère mais significative de  $P_f$  de 40 %. Pour 5 groupes d'ovocytes différents (provenant de 5 donneurs différents), la coexpression de SMIT2 et de l'AQP2-G196D n'a jamais fait changer la  $P_f$  obtenue avec SMIT2 seul. La coexpression avec

l'AQP2-wt augmente grandement la  $P_f$  sans effet de la présence de 5 mM de *myo*-inositol extracellulaire. La présence de la protéine mutée AQP2-D150E produit une petite augmentation de la  $P_f$  de  $3,1 \pm 0,9 \times 10^{-4} \text{ cm}\cdot\text{s}^{-1}$  par rapport à la  $P_f$  mesurée pour les ovocytes qui n'expriment que SMIT2. De façon très intéressante, la perméabilité associée à l'expression de l'AQP2-D150E mentionnée ci-dessus est stimulée de 73 % ( $p < 0,05$  %,  $n=8$ ) quand les ovocytes sont incubés 24 heures en présence de *myo*-inositol. La  $P_f$  de l'AQP2-G196D exprimée dans un ovocyte n'étant pas différente de celle d'ovocytes non-injectés, elle n'est pas non plus stimulée par la présence de *myo*-inositol.



La présence de SMIT2 permet l'entrée du *myo*-inositol dans les ovocytes et l'atteinte d'une concentration de l'ordre de 45 mM. Nous avons tenté de reproduire

l'effet attribuable au *myo*-inositol intracellulaire sur des ovocytes exprimant l'AQP2-D150E en injectant 46  $\mu$ l d'une solution de 500 mM de *myo*-inositol dans un ovocyte dont le volume accessible se situe aux alentours de 500 nl. Tel que montré à la figure 3.5, l'augmentation de  $P_f$  attribuable à l'expression de la forme mutée D150E n'est pas stimulée par la présence de *myo*-inositol intracellulaire. En fait, dans l'expérience présentée, la présence de *myo*-inositol produit en fait une diminution de  $P_f$  de  $0,81 \times 10^{-4} \text{ cm}\cdot\text{s}^{-1}$ . Toutefois, cet effet apparent du *myo*-inositol n'a pas été systématiquement observé les 3 fois où l'expérience de la figure 3.5 a été reproduite.

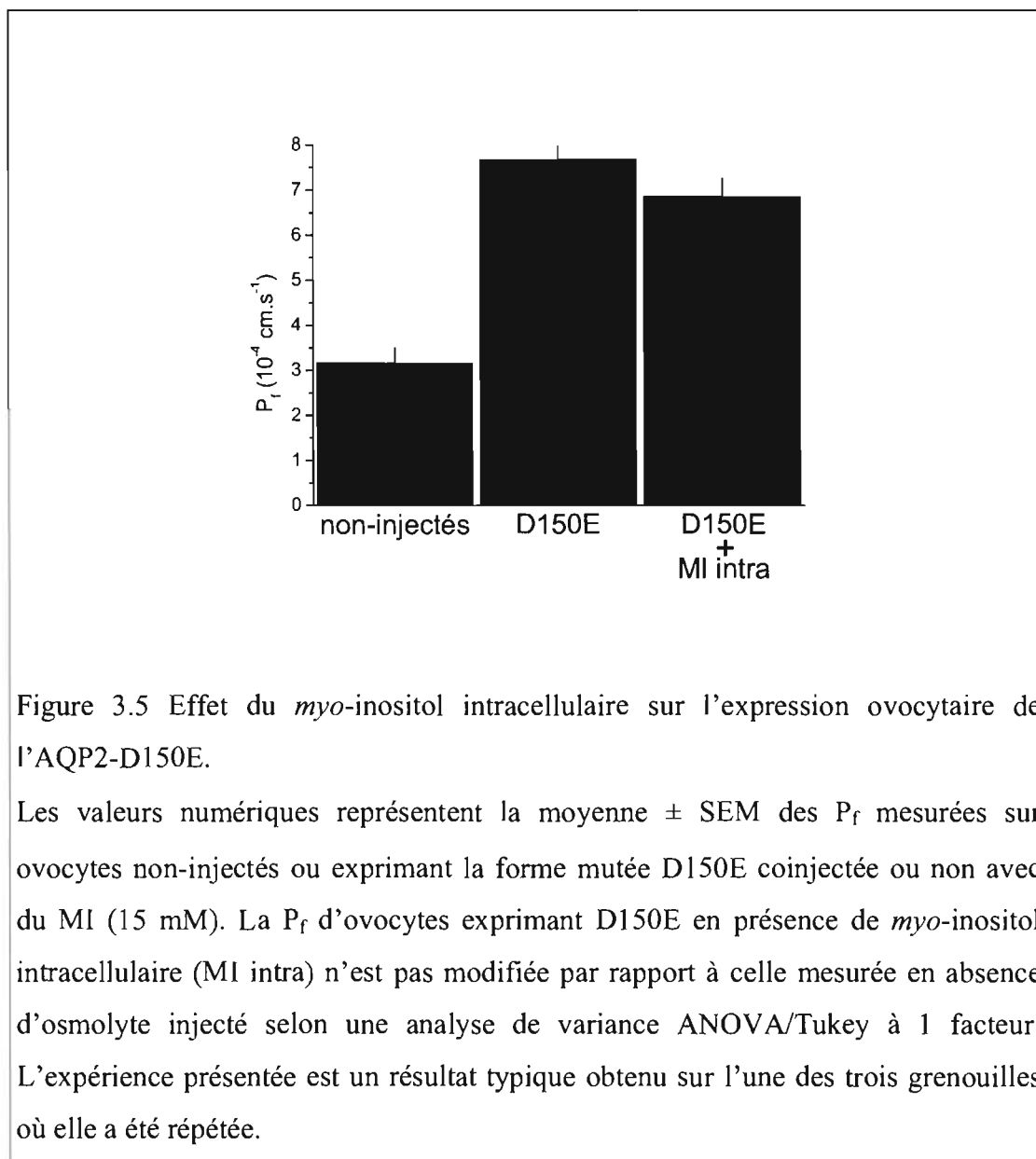


Figure 3.5 Effet du *myo*-inositol intracellulaire sur l'expression ovocytaire de l'AQP2-D150E.

Les valeurs numériques représentent la moyenne  $\pm$  SEM des  $P_f$  mesurées sur ovocytes non-injectés ou exprimant la forme mutée D150E coinjectée ou non avec du MI (15 mM). La  $P_f$  d'ovocytes exprimant D150E en présence de *myo*-inositol intracellulaire (MI intra) n'est pas modifiée par rapport à celle mesurée en absence d'osmolyte injecté selon une analyse de variance ANOVA/Tukey à 1 facteur. L'expérience présentée est un résultat typique obtenu sur l'une des trois grenouilles où elle a été répétée.



Ces résultats indiquent que l'effet positif du *myo*-inositol en présence de SMIT2 sur la fonctionnalité du mutant D150E n'est pas dû à la simple présence du *myo*-inositol dans l'ovocyte.

### **3.2.2. Reproductibilité et spécificité de la fonction de l'AQP2-D150E**

Dans la figure 3.6, la  $P_f$  présentée a été mesurée en absence de transporteur de *myo*-inositol SMIT2, c'est-à-dire dans des ovocytes qui n'étaient pas incubés 3 jours au préalable pour permettre au transporteur Na/MI de s'exprimer puisque cet ARNc n'a pas été injecté. Ces ovocytes ont seulement été injectés avec l'ARNc de l'AQP2 dans ses formes native et mutées. Dans ces conditions, la présence de 5 mM de *myo*-inositol dans la solution de Barth a augmenté la  $P_f$  attribuable au mutant AQP2-D150E. Quantitativement, dans l'expérience montrée à la figure 3.6, l'expression du mutant AQP2-D150E est associée avec une augmentation de  $P_f$  de 50 % par rapport à la perméabilité de base d'un ovocyte non-injecté provenant du même donneur. En présence de 5 mM de *myo*-inositol, la  $P_f$  attribuable au mutant AQP2-D150E est passée de  $3,20 \pm 0,33 \times 10^{-4} \text{ cm}\cdot\text{s}^{-1}$  à  $5,45 \pm 0,75 \times 10^{-4} \text{ cm}\cdot\text{s}^{-1}$ , soit une augmentation de 70,1 %. Cet effet du *myo*-inositol est statistiquement significatif ( $p < 0,01$ ,  $n=8$  ovocytes par catégorie). Tout comme dans le cas de la coinjection avec SMIT2 (figure 3.4), les ovocytes injectés avec la forme D150E de l'AQP2 sont stimulés par la présence de *myo*-inositol (5 mM) tandis que les formes sauvage et G196D de l'AQP2 ne sont pas atteintes par cet osmolyte présent extracellulairement.

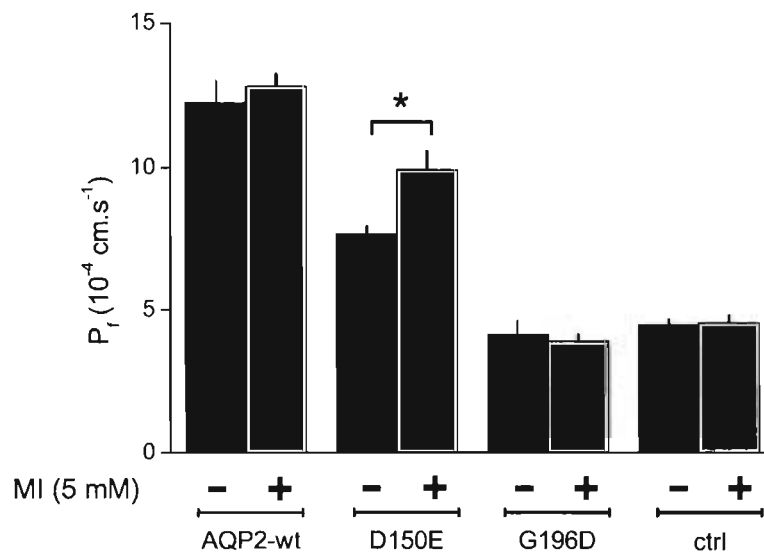
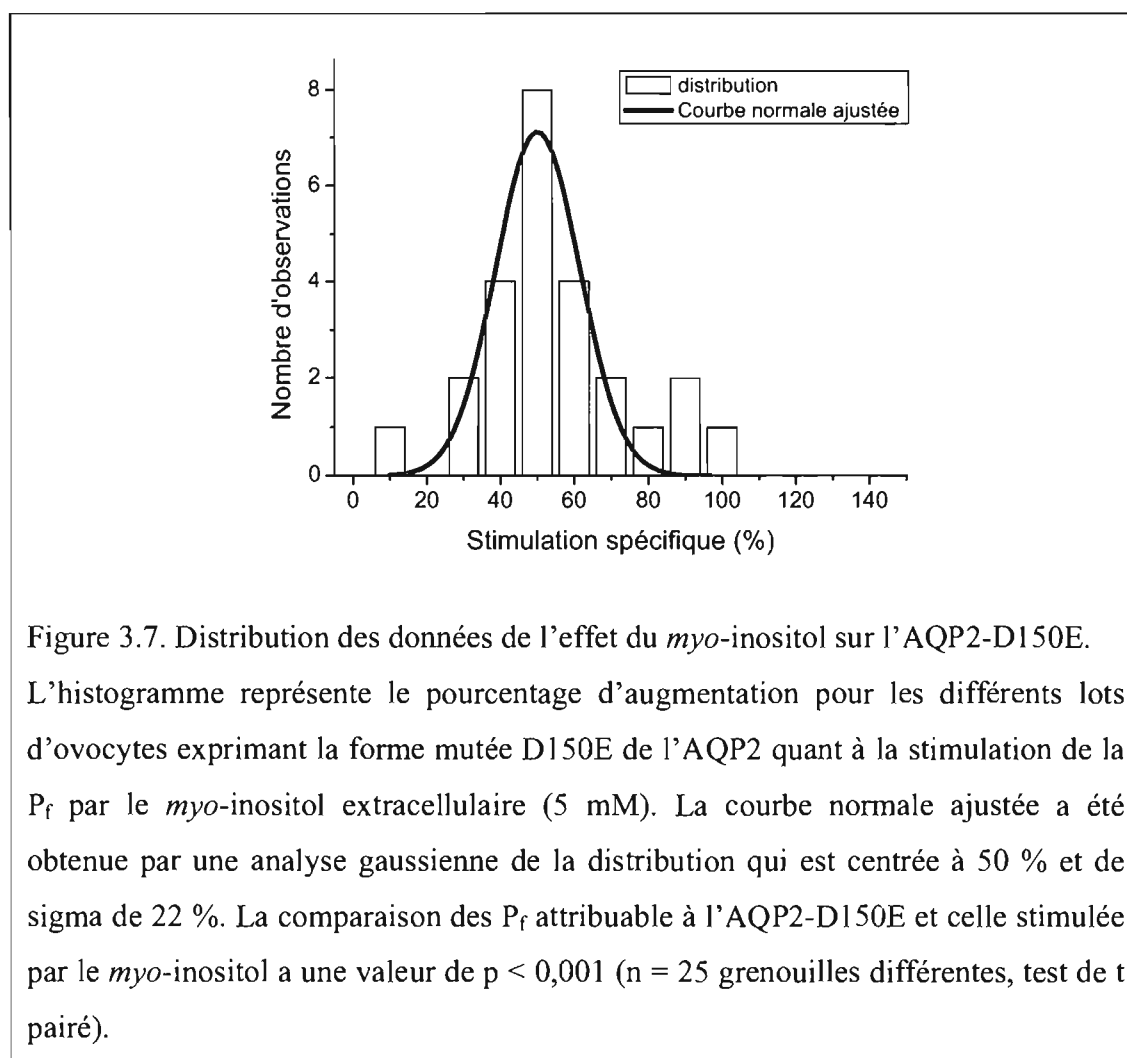


Figure 3.6. Effet du *myo*-inositol sur les AQP2 mutées et native exprimées dans des ovocytes.

Cette expérience est similaire à celle présentée à la figure 3.4 à l'exception que SMIT2 n'est pas co-exprimé avec l'AQP2-wt, -D150E et -G196D. Les barres en noir représentent les moyennes de  $P_f$  en présence de saline et, celles en gris, les moyennes de  $P_f$  lorsque l'ovocyte est incubé en présence de saline additionnée de 5 mM de *myo*-inositol pendant 24 h. La  $P_f$  des ovocytes exprimant le mutant AQP2-D150E est significativement augmentée en présence de *myo*-inositol ( $p < 0,01$ , analyse de variance ANOVA/Tukey à 2 facteurs). Le résultat présenté est une expérience typique contenant 8 données par colonne. Cette expérience a été répétée 3 fois avec des résultats similaires.

Au fil des mois et, dans le but de confirmer la reproductibilité de mes résultats, l'effet de l'exposition au *myo*-inositol externe pendant 24 heures a été observé sur 25 groupes différents d'ovocytes. Puisque la  $P_f$  des ovocytes exprimant l'AQP2-D150E varie grandement d'une série d'ovocytes à une autre, la seule possibilité de comparer les effets du *myo*-inositol est de rapporter les augmentations de  $P_f$  en fonction de la

valeur attribuable au mutant AQP2-D150E en absence de *myo*-inositol (i.e. en pourcentage de stimulation). Malgré la grande variabilité de la stimulation observée, c'est-à-dire de 4 % jusqu'à 104 %, la perméabilité due à l'expression de l'aquaporine mutante est augmentée par la présence de *myo*-inositol de 45 % en moyenne tandis que la médiane de la distribution se situe à 47 % (figure 3.7). Dû au grand nombre de mesures, la significativité de l'effet que 24 h de *myo*-inositol (5 mM) produit sur la  $P_f$  attribuable à l'AQP2-D150E est très élevée ( $p < 0,001$ ,  $n=25$  mesures) lorsqu'évaluée par un test t païré de Student. De plus, confirmant les données présentées aux figures 3.4 et 3.6, l'effet observé est spécifique pour le mutant AQP2-D150E vu que la stimulation causée par le *myo*-inositol n'est pas observable sur l'AQP2 de type sauvage (AQP2-wt), le mutant AQP2-G196D ou l'ovocyte contrôle pour une même addition de *myo*-inositol.



En somme, l'effet du *myo*-inositol sur l'AQP2-D150E est extracellulaire, spécifique et reproductible.

### **3.3. Caractérisation de l'effet du *myo*-inositol sur la perméabilité à l'eau d'ovocytes exprimant le mutant D150E de l'AQP2**

#### **3.3.1. Influence de la concentration en *myo*-inositol**

Après avoir déterminé que le *myo*-inositol exerce son effet sur l'expression de l'AQP2-D150E en restant à l'extérieur de l'ovocyte, nous avons testé si l'effet dépendait de la concentration de *myo*-inositol de façon Michaelienne et si la valeur de la constante d'affinité s'approchait des concentrations physiologiques de *myo*-inositol. Dû à une certaine variabilité dans les pourcentages de stimulation de la  $P_r$  attribuable à l'expression du mutant D150E, il est difficile de déterminer la sensibilité à la quantité de *myo*-inositol présente dans le milieu d'incubation. Pour déterminer la concentration effective avec laquelle la moitié de l'effet est atteint, le  $ED_{50}$ , nous avons réussi dans un seul cas à tester l'effet de 5 concentrations différentes de *myo*-inositol sur des groupes d'ovocytes provenant du même donneur. Dans les autres essais, la variabilité de l'effet nous empêchait d'obtenir un ajustement de courbe convainquant. Dans ce cas précis, nous avons déterminé que le  $ED_{50}$  de l'action du *myo*-inositol sur la  $P_r$  des ovocytes exprimant AQP2-D150E est de  $131 \pm 13 \mu\text{M}$  (figure 3.8A). Cette valeur a été confirmée dans trois expériences subséquentes où seulement 3 concentrations de *myo*-inositol étaient utilisées avec un plus grand nombre d'ovocytes dans chaque cas. Les résultats obtenus confirment le  $ED_{50}$  de l'effet du *myo*-inositol car il est compris entre 120 et 150  $\mu\text{M}$  (figure 3.8B).

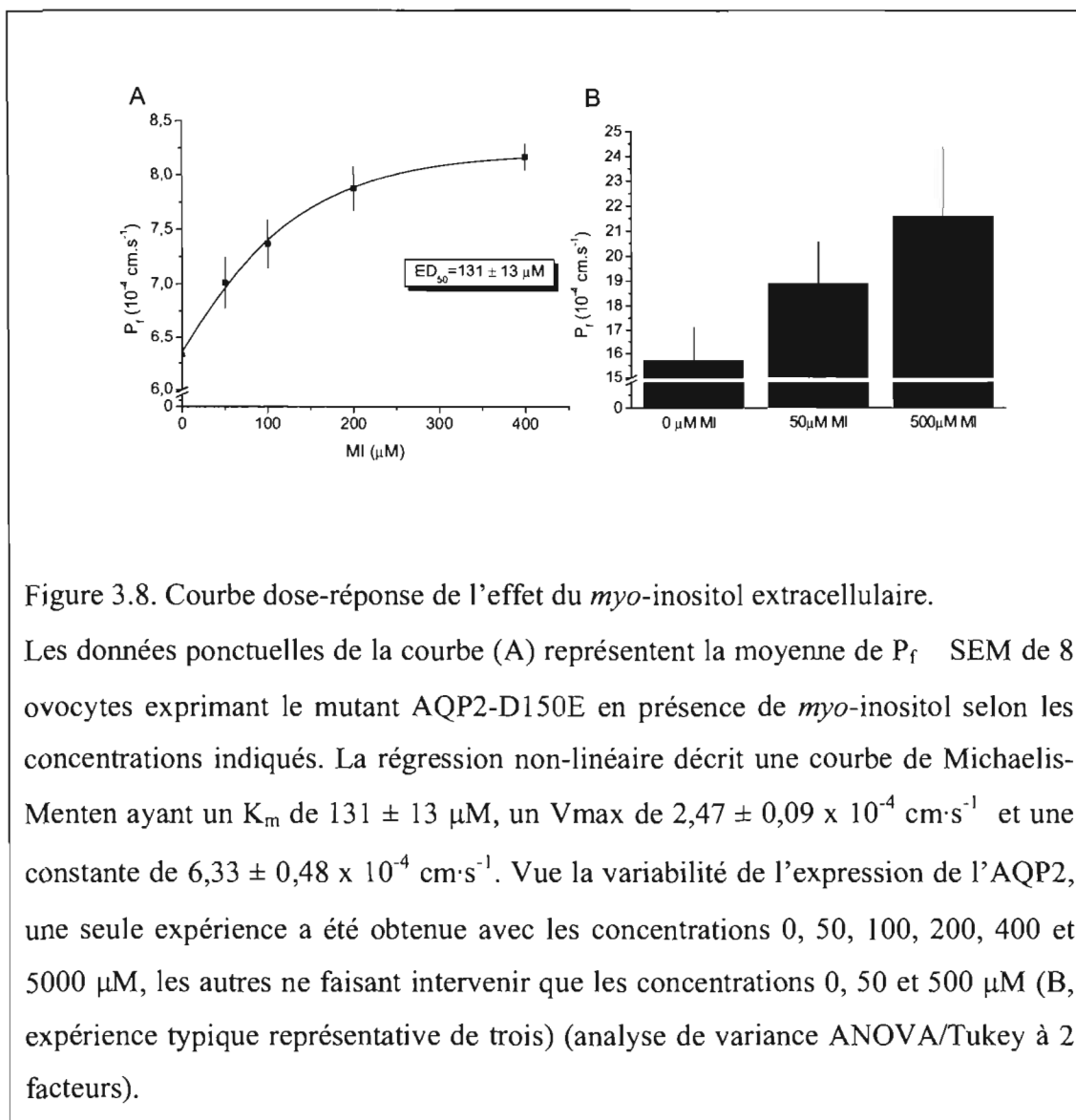


Figure 3.8. Courbe dose-réponse de l'effet du *myo*-inositol extracellulaire.

Les données ponctuelles de la courbe (A) représentent la moyenne de  $P_f$   $\pm$  SEM de 8 ovocytes exprimant le mutant AQP2-D150E en présence de *myo*-inositol selon les concentrations indiqués. La régression non-linéaire décrit une courbe de Michaelis-Menten ayant un  $K_m$  de  $131 \pm 13 \mu\text{M}$ , un  $V_{max}$  de  $2,47 \pm 0,09 \times 10^{-4} \text{ cm}\cdot\text{s}^{-1}$  et une constante de  $6,33 \pm 0,48 \times 10^{-4} \text{ cm}\cdot\text{s}^{-1}$ . Vue la variabilité de l'expression de l'AQP2, une seule expérience a été obtenue avec les concentrations 0, 50, 100, 200, 400 et 5000  $\mu\text{M}$ , les autres ne faisant intervenir que les concentrations 0, 50 et 500  $\mu\text{M}$  (B, expérience typique représentative de trois) (analyse de variance ANOVA/Tukey à 2 facteurs).

### 3.3.2. Spécificité du *myo*-inositol comparativement à d'autres osmolytes compatibles

Puisque beaucoup d'autres composés peuvent servir d'osmolytes compatibles chez divers types d'organismes, il était primordial de déterminer si seul le *myo*-inositol, un des osmolytes compatibles présents dans le rein, avait la propriété de stimuler l'activité de l'AQP2-D150E et d'augmenter la  $P_f$  des ovocytes exprimant ce mutant. À cette fin, nous avons comparé l'effet d'autres osmolytes sur les ovocytes exprimant AQP2-D150E en employant le mannitol comme osmolyte contrôle vu son

inaction habituelle sur la  $P_f$  de ces mêmes ovocytes. Pour ce faire, des osmolytes de chaque catégorie (dérivés d'acides aminés, polyols, méthylamines) ont été choisis pour comparer les effets, en volumétrie, sur la perméabilité à l'eau du mutant AQP2-D150E. Dans une première série d'expériences, nous avons comparé les effets du *myo*-inositol aux effets du *L-chiro*- et du *D-chiro*-inositol. Les 3 composés ont été testés en parallèle sur 5 séries d'ovocytes (5 donneurs différents) et les résultats sont montrés à la figure 3.9. Bien que les effets du *myo*-inositol présentent une certaine variabilité (une stimulation statistiquement significative a été observée 4 fois sur 5), l'effet global sur les 5 séries d'ovocytes est significatif avec un  $p < 0,05$  (test de t non-pairé) (figure 3.9A). Dans le cas du *L-chiro*-inositol, une seule expérience sur 5 a donné une stimulation statistiquement significative mais l'ensemble de 5 expériences n'a démontré aucune stimulation systématique (figure 3.9B). La même situation se retrouve dans le cas du *D-chiro*-inositol pour lequel aucune augmentation systématique de  $P_f$  n'a été observée (figure 3.9C). Dans une deuxième série d'expériences, les effets du *myo*-inositol (figure 3.9D), de la taurine (figure 3.9E), de la bétaine (figure 3.9F) et du glycérol (figure 3.9G) ont été testés sur 3 groupes d'ovocytes (3 donneurs différents). Dans ce cas-ci, les résultats sont plus difficiles à interpréter. Alors que, pour un groupe d'ovocytes, tous les osmolytes testés ont démontré une stimulation significative, les deux autres groupes d'ovocytes n'ont donné aucun effet significatif sauf pour le *myo*-inositol dans un seul cas. La variabilité des résultats suggère qu'il faudrait considérablement augmenter le nombre d'expériences avant d'atteindre une conclusion claire quant aux effets attendus des différents osmolytes compatibles.

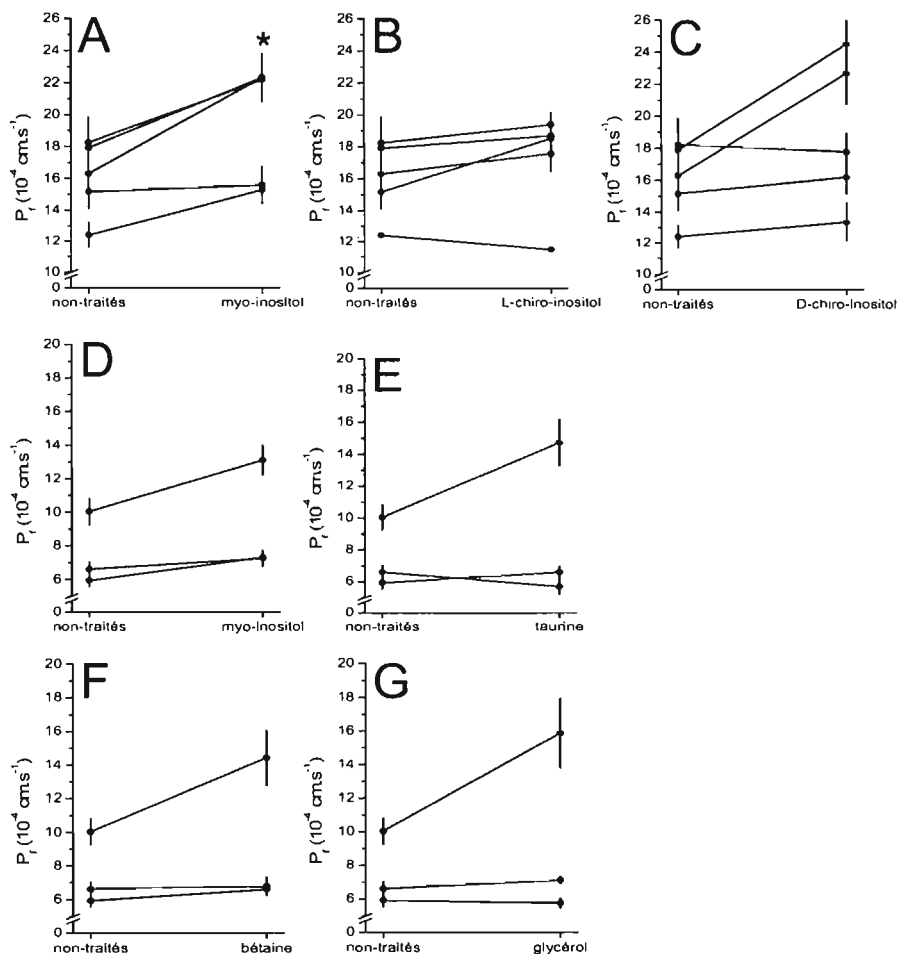


Figure 3.9. Effet de divers osmolytes sur l'expression d'AQP2-D150E dans les ovocytes.

Les  $P_f$  des ovocytes exprimant le mutant AQP2-D150E représentent 3 ou 5 semaines d'expérimentation où chaque semaine comporte l'étude d'au moins 8 ovocytes exprimant l'AQP2-D150E qui sont incubés pendant 24 h en présence de mannitol (non-traités) ou de 500  $\mu$ M de *myo*-inositol (A et D), de *L-chiro*-inositol (B), de *D-chiro*-inositol (C), de taurine (E), de bétaine (F), de glycérol (G). L'astérisque (\*) représente une différence significative effectuée sur les moyennes entre groupes traités et non traités ( $p < 0,05$ , test de t non-pairé).

### 3.3.3. Spécificité pour le mutant D150E de l'AQP2 comparativement au mutant CFTR- $\Delta$ F508

Une expérience a tenté de faire un rapprochement entre les données obtenues avec les ovocytes exprimant l'AQP2-D150E et les données décrites dans la littérature (Howard et al., 2003, Zhang et al., 2003) concernant l'action du *myo*-inositol sur le mutant  $\Delta$ F508 du CFTR. L'analyse des courants chlore a été effectuée par double électrode sur 37 données recueillies en six semaines consécutives. Pour activer les courants chlore, la forskoline (10  $\mu$ M) est utilisée pour stimuler la production d'AMPc par l'AC et l'IBMX (500  $\mu$ M) pour inhiber sa dégradation par les phosphodiesterases. Les analyses des données ne sont pas présentées puisqu'elles n'ont pas été concluantes. En effet, les résultats ont démontré une grande variabilité des courants dans les ovocytes non-injectés, de même que dans ceux exprimant le mutant CFTR-  $\Delta$ F508, et ce en présence ou en absence de *myo*-inositol. Il n'est donc pas possible de tirer de ces expériences une conclusion quant à la récupération possible du CFTR- $\Delta$ F508 par le *myo*-inositol.

### 3.3.4. Effet de l'AMPc

Dans le tubule collecteur, l'expression de l'AQP2 est sous le contrôle de l'hormone antidiurétique par l'intermédiaire des récepteurs V2, de l'AMPc et de la PKA. Il est possible que le D150E soit aussi sous le contrôle du même système de signalisation lorsqu'exprimé dans un ovocyte et nous avons voulu voir si une modulation de la régulation de D150E pouvait être à l'origine de l'effet du *myo*-inositol sur son expression. Nous avons stimulé la voie de l'AMPc en utilisant la forskoline (10  $\mu$ M). La  $P_f$  des ovocytes exprimant l'AQP2-D150E (8 ovocytes), lorsque comparée à des ovocytes non-injectés, n'est pas modifiée lorsque la forskoline est présente dans le milieu d'incubation durant le 24 heure (figure 3.10). La présence de forskoline n'a donc pas changé significativement la perméabilité attribuable au mutant AQP2-D150E exprimé dans les ovocytes. Par contre, lorsque



l'ovocyte exprime le type sauvage, il y a augmentation du changement de perméabilité à l'eau des ovocytes lui étant attribuable, ce qui confirme les travaux de Kuwahara et al. (1995). C'est au travers de la cascade d'AMPc, qui active la PKA et permet l'attachement et l'incorporation des agrégophores avec la membrane plasmique, que la forskoline exercerait son action dans ce cas-là (Lande et al., 1996).

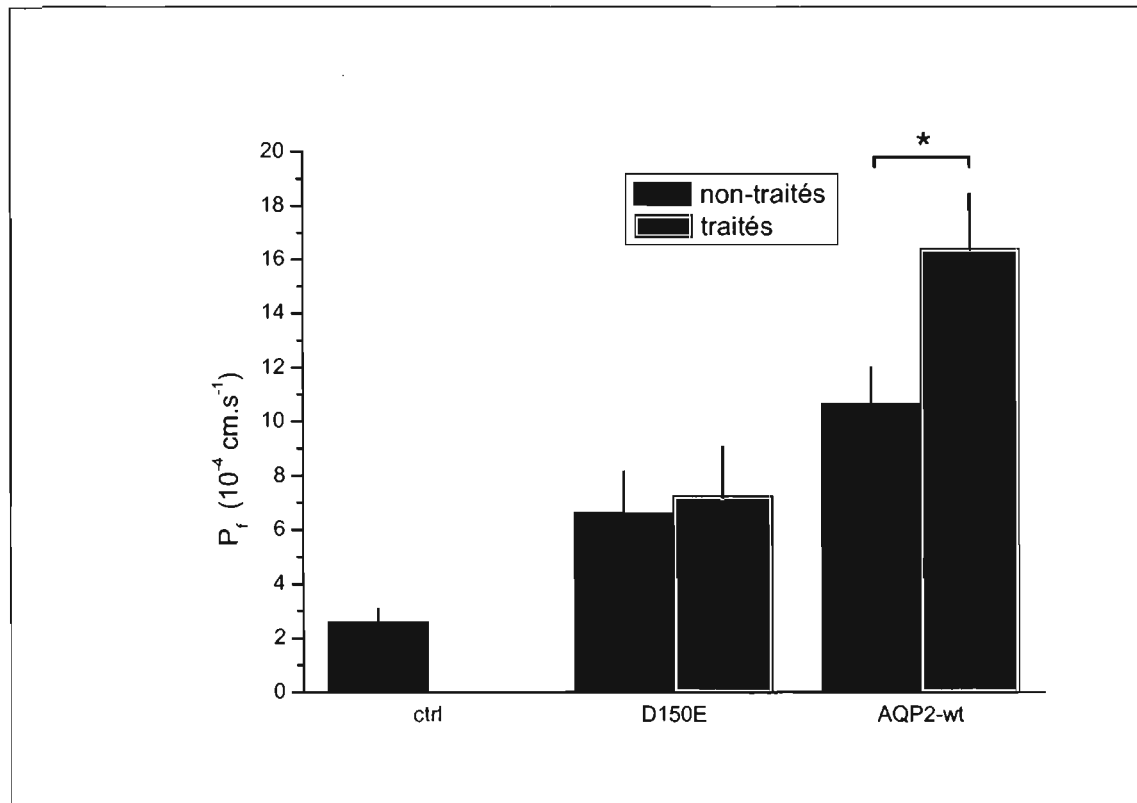


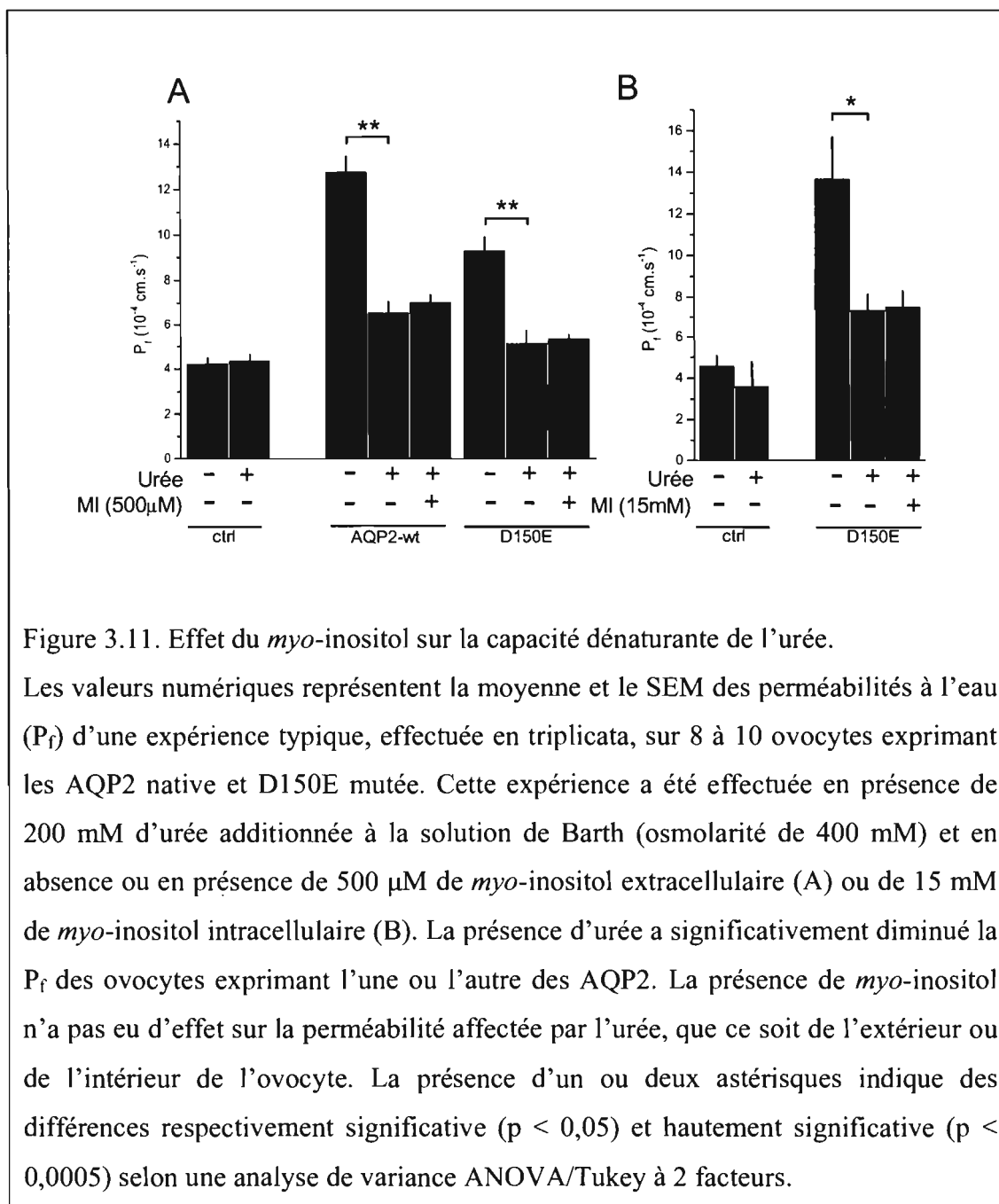
Figure 3.10. Effet de la forskoline sur l'expression de l'AQP2-D150E.

Huit à dix ovocytes injectés avec la forme native (wt), la forme D150E mutée ou non-injectés ont été traités ou non à la forskoline (10  $\mu$ M) pendant 24 heures puis incubés dans un milieu saline pour la mesure de  $P_f$ . Les données représentent les moyennes et SEM d'une expérience typique qui a été reproduite en triplicata. Il n'y a pas de différence significative entre les deux moyennes d'ovocytes pour les ovocytes exprimant la forme mutante de l'AQP2 tandis qu'il y a augmentation significative de  $P_f$  pour la forme native de la protéine. L'astérisque (\*) indique une différence significative ( $p < 0,05$ , analyse de variance ANOVA/Tukey à 2 facteurs).

### 3.3.5. Effet de l'urée

Nous avons voulu savoir si, dans des conditions aussi dénaturantes qu'en présence d'urée, le *myo*-inositol pouvait jouer un rôle protecteur plus important que dans les conditions que nous avons étudiées jusqu'à maintenant. En effet, dans la médullaire rénale, le milieu interstitiel en période antidiurétique peut présenter des concentrations d'urée et de NaCl excédant respectivement 1 M et 500 mM (Burg, 2002). L'effet dénaturant de l'urée est déjà bien décrit dans la littérature comme par exemple le fait qu'il force les protéines à adopter des structures non-natives et dépliées (Robinson et Jencks, 1963). C'est justement suite à des changements de concentrations d'urée et de NaCl qu'il y a une augmentation parallèle du transport d'osmolytes compatibles afin d'éviter une trop grande accumulation ionique intracellulaire.

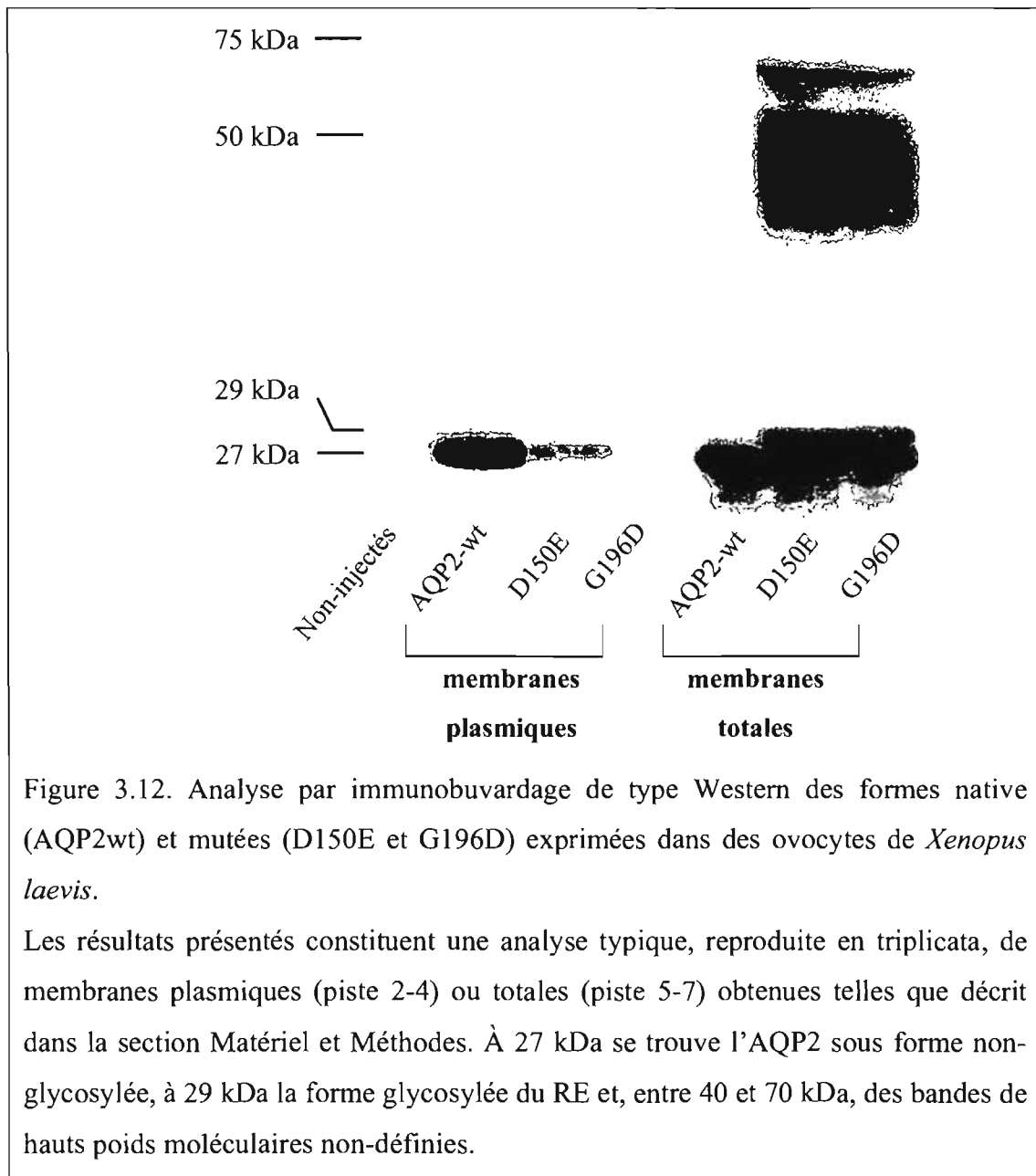
Tout d'abord, il fallait déterminer si la présence d'urée sur les ovocytes avait une action néfaste sur l'AQP2. Après incubation des ovocytes dans un milieu saline-urée, il y a diminution significative de la  $P_f$  de l'AQP2 de type sauvage de  $73 \pm 8 \%$  et du mutant AQP2-D150E de  $82 \pm 13 \%$  lorsque la concentration d'urée est de 200 mM (figure 3.11A). Toutefois, l'injection du *myo*-inositol dans l'ovocyte (concentration intracellulaire de 15 mM) n'a pas modifié la diminution de  $P_f$  provoquée par l'urée sur le mutant AQP2-D150E (figure 3.11B). Dans la figure 3.11A, l'action de l'urée sur la  $P_f$  d'un ovocyte n'a pas été contrecarrée par l'ajout de 500  $\mu$ M de *myo*-inositol dans le milieu d'incubation contenant de l'urée, que ce soit pour le type sauvage ou le mutant D150E de l'aquaporine-2. Il est à noter que la  $P_f$  d'un ovocyte non-injecté (ctrl) n'est pas influencée par la présence de 200 mM d'urée extracellulaire.



### 3.3.6. Modification du profil de migration électrophorétique

Les aquaporines membranaires migrent dans une zone de poids moléculaire correspondant à 27 kDa lorsqu'elles sont analysées par électrophorèse sur gels de polyacrylamide en présence de SDS suite à leur expression dans des ovocytes. À la

figure 3.12, seules la forme mutée D150E et la forme sauvage de l'AQP2 s'affichent à la membrane plasmique, tel que visualisé par la présence de la bande de 27 kDa mentionnée préalablement. La forme mutée D150E est très faiblement présente à la membrane bien que 10 fois plus d'ARN ait été injectée par rapport au wt. Toutefois, lors de l'évaluation des membranes totales d'ovocytes exprimant l'AQP2, l'AQP2-wt se voit dédoublée, où la 2<sup>ème</sup> forme pourrait représenter un état de dégradation de la protéine native. Ce dédoublement est aussi visible pour les formes mutées. Pour ces dernières sont aussi présentes des bandes correspondant à des formes glycosylées avec un sucre à haute teneur en mannose (29 kDa) et des bandes de hauts poids moléculaires (50 kDa à 75 kDa) représentant vraisemblablement différents états d'agrégations des protéines ou des protéines liées à l'ubiquitine.



## 4. Discussion

### 4.1. Mise en contexte

Les mutations D150E et G196D viennent d'un même patient ayant les 2 allèles codant pour le gène de l'AQP2 atteinte. Puisque ce patient souffre de DIN menant à une polyurie sévère, un moyen d'améliorer sa condition serait de diminuer cette déshydratation progressive pour augmenter ses chances de survie. La littérature ayant déjà rapporté des moyens de sauver des protéines mutantes grâce à l'utilisation de chaperonnes chimiques, nous avons donc entrepris l'étude de ces mutations de l'AQP2 afin d'évaluer la récupération éventuelle des protéines mutantes en utilisant des ovocytes de *Xenopus laevis* comme modèle d'expression en absence ou en présence de telles chaperonnes chimiques.

### 4.2. Profil de l'expression et de la fonction de l'AQP2

Par comparaison à la forme native, les formes mutées doivent être injectées en quantité 10 fois plus grande que le type sauvage afin d'obtenir une expression protéique du même ordre de grandeur (figure 3.12). En analyse sur ovocytes, les formes mutantes de l'AQP2 ne se rendent pas à la membrane plasmique au même titre que la forme sauvage, avec la forme mutée G196D qui ne quitte pas les vésicules intracellulaires.

Les conclusions tirées de l'immunofluorescence corrélient avec la présence à la membrane plasmique du mutant D150E qui y est en très faible concentration. La  $P_f$  des ovocytes exprimant l'AQP2 sous ses formes native et mutées est proportionnelle à l'expression membranaire, à savoir que le mutant D150E a une faible  $P_f$  et que le mutant G196D présente une  $P_f$  identique à celle d'ovocytes non-injectés. La forme mutée D150E confère un DIN minime tandis que la forme G196D démontre un phénotype complet. Ainsi, nos données de perméabilité à l'eau obtenues

*in vitro* sont en accord avec l'augmentation de l'excrétion de l'eau observable chez le patient atteint des deux mutations.

### 4.3. Effet du MI sur l'expression de l'AQP2

#### 4.3.1. Effet intracellulaire

Les analyses de Howard et al. (2003) et Zhang et al. (2003) ont attribué au *myo*-inositol une capacité de chaperonne chimique. Cette propriété a été utilisée pour essayer d'amoindrir la sévérité du phénotype associé aux formes mutées D150E et G196D de l'AQP2 lorsqu'exprimées dans des ovocytes. Le cotransporteur SMIT2 injecté dans les ovocytes permet au *myo*-inositol d'entrer dans la cellule à une vitesse de 19,4 pmol/h comparativement à une entrée de 0,02 pmol/h en son absence (figure 3.3). Ce cotransporteur a été ajouté pour reproduire les conditions décrites par Howard et al. (2003), c'est-à-dire permettre l'entrée de *myo*-inositol dans la cellule pour qu'il y joue son rôle de chaperonne chimique.

Les résultats montrent que seuls les ovocytes injectés avec la forme mutée D150E ont vu leur perméabilité à l'eau augmenter en présence de *myo*-inositol (figure 3.4). En accord avec la littérature, le *myo*-inositol pourrait donc jouer un rôle de l'intérieur de la cellule. Cependant, cette stimulation est spécifique pour le mutant D150E puisque ni la  $P_f$  de la forme sauvage (wt), ni celle de la forme mutée G196D ou des contrôles n'ont été modifiées par l'ajout de *myo*-inositol au bain durant l'expression protéique (figure 3.4).

La forme native de l'AQP2, qui se présente en grande quantité à la membrane plasmique, ne sera possiblement pas affectée par la présence de l'osmolyte *myo*-inositol. Pour ce qui est des formes mutées, le D150E a la capacité de se rendre à la membrane plasmique alors que le G196D n'y est pas affiché (figure 3.1 et 3.12). Ce fait pourrait expliquer la capacité du *myo*-inositol à agir sur la forme D150E plutôt que la G196D pour la récupération protéique. Ceci signifierait alors que le *myo*-inositol ne pourrait exercer son effet récupérateur que sur une forme mutée d'AQP2 ayant au moins une faible capacité de se rendre à la membrane plasmique. Seule

l'analyse d'autres mutations tombant dans l'une ou l'autre des catégories de mutants, ceux se rendant à la membrane et ceux ne s'y rendant pas, permettrait de vérifier la validité ou non de la présente supposition.

À la suite de ces expériences, il semble possible que le *myo*-inositol exerce son effet de l'intérieur de la cellule car, en présence de SMIT2, la concentration de 5 mM extracellulaire se traduit par une concentration similaire ou plus grande à l'intérieur de la cellule. Pour valider ou infirmer cette présomption, nous avons injecté le *myo*-inositol directement dans la cellule pour obtenir une concentration intracellulaire de 15 mM puisqu'une concentration de l'ordre du millimolaire est nécessaire pour obtenir un effet chaperonique (Powell et Zeitlin, 2002). De façon surprenante, les résultats de ces expériences montrent que la présence de *myo*-inositol intracellulaire n'a pas modifié significativement la perméabilité à l'eau du mutant D150E (figure 3.5). Cette observation permet donc d'écarter l'hypothèse que le *myo*-inositol joue un rôle de chaperonne chimique dans le sauvetage partiel de ce mutant.

### **4.3.2. Effet extracellulaire**

La stimulation par le *myo*-inositol de la perméabilité à l'eau des ovocytes exprimant la protéine mutante AQP2-D150E, a aussi été testée en absence de SMIT2 pour s'assurer qu'il s'agissait bien d'un effet extracellulaire et non d'un artefact dû à la présence de SMIT2 dans les ovocytes. En absence de ce cotransporteur, nos résultats montrent que la stimulation du mutant AQP2-D150E par le *myo*-inositol était à peu près identique qu'en sa présence (figure 3.6). Ceci vient donc confirmer l'action extracellulaire de l'osmolyte.

Cette action qu'exerce le *myo*-inositol a été reproduite 25 fois. Cependant, la comparaison des données recueillies pour toutes les expériences montre une grande variabilité de la stimulation engendrée par le *myo*-inositol même si, dans 90 % des cas, l'augmentation que procurait le *myo*-inositol extracellulaire était significative. Malgré la variabilité observée, l'effet stimulateur du *myo*-inositol suit une distribution normale compatible avec un effet hautement significatif dont la moyenne se situe à 45 % (figure 3.7).



Grâce à l'utilisation comme modèle d'étude des ovocytes de *Xenopus laevis* dont le rapport surface/volume est petit lorsque comparé à des cellules en culture, nous avons pu déterminer que le *myo*-inositol avait un effet positif sur l'expression de l'AQP2-D150E uniquement à partir du domaine extracellulaire. La dépendance en concentration et la stéréospécificité de la réponse au *myo*-inositol appuient l'hypothèse d'une action récupératrice induite par cet osmolyte.

#### 4.4. Spécificité de l'effet du *myo*-inositol

La figure 3.8 permet d'établir le ED<sub>50</sub> du *myo*-inositol produisant une stimulation de l'AQP2-D150E à  $131 \pm 13 \mu\text{M}$ . Cette valeur est proche des concentrations physiologiques rapportées dans la littérature (Fisher et al., 2002) puisque, dans le système sanguin, elle est de 30  $\mu\text{M}$  alors que, dans le liquide céphalorachidien, elle se situe aux alentours de 300  $\mu\text{M}$ . Il faut souligner le fait que, même si l'effet du *myo*-inositol extracellulaire peut facilement être mis en évidence par volumétrie sur ovocytes, nos travaux ne permettent pas de conclure à une augmentation du nombre de molécules d'AQP2-D150E affichées à la membrane plasmique plutôt qu'à une stimulation de la perméabilité à l'eau unitaire des transporteurs exprimés. Pour trancher entre ces 2 hypothèses de façon rigoureuse, il nous faudrait déterminer la quantité de protéine exprimée à la membrane plasmique suite à leur purification (Leduc-Nadeau et al., 2006) et effectuer des analyses de type « pulse-chase » pour y déterminer les niveaux de protéines avant et après stimulation par le *myo*-inositol.

Malgré cette incertitude, nos études ont toutefois cherché à déterminer si la présence de composés autre que le *myo*-inositol à l'extérieur de l'ovocyte pouvait également modifier la  $P_f$  d'ovocytes exprimant le mutant AQP2-D150E. Les données présentées à la figure 3.9 semblent indiquer que seul le *myo*-inositol serait actif puisque son effet n'est pas systématiquement reproduit par des osmolytes tels le glycérol, la bétaine ou la taurine. Il faudrait cependant augmenter le nombre d'expériences pour rendre cette conclusion plus rigoureuse. Il est important de souligner que l'effet du *myo*-inositol serait en plus stéréospécifique puisque son

action ne peut être reproduite par le *L-chiro*-inositol ou le *D-chiro*-inositol. Toutefois, ces études ont été conduites à des concentrations d'osmolytes de 500  $\mu\text{M}$  et ne permettent pas d'écarter la possibilité que l'un ou l'autre de ces différents osmolytes puisse nécessiter une plus forte concentration pour être actif.

Afin d'évaluer la spécificité du *myo*-inositol pour le mutant D150E de l'AQP2, nous avons revisité les données de la littérature (Howard et al., 2003, Zhang et al., 2003) pour savoir si le *myo*-inositol avait, dans nos conditions expérimentales, une action sur la forme mutée  $\Delta\text{F508}$  du CFTR. Il nous semblait en effet primordial d'évaluer si, dans les expériences de Zhang et al. (2003) avec le CFTR- $\Delta\text{F508}$ , le *myo*-inositol agissait de l'extérieur ou de l'intérieur dans la récupération. Suite à nos analyses, nous ne pouvons conclure si le CFTR- $\Delta\text{F508}$  est ou non affecté par la présence de *myo*-inositol dans le bain d'incubation des ovocytes durant le dernier 24 heures d'expression avant la prise de la mesure. Ce fait est attribuable à la grande variabilité des données recueillies autant pour les courbes d'activité des ovocytes non-injectés et non-traités que pour ceux en présence de *myo*-inositol ou exprimant le CFTR- $\Delta\text{F508}$ . Afin de minimiser la variabilité, il nous faudrait faire une plus grande quantité d'analyses.

Dans nos expériences comparativement à celles de Zhang et al. (2003), il faut noter la différence de modèle d'étude dans l'analyse de l'effet du *myo*-inositol. Les cellules en culture 3T3 ont peut-être la capacité de permettre l'entrée du *myo*-inositol, ce qui viendrait appuyer la conclusion qui a été tirée et ferait du *myo*-inositol une chaperonne chimique active au niveau du RE. Dans le modèle ovocytaire, la mesure des courants en double électrodes n'est pas une méthode d'analyse assez robuste pour mettre en évidence une différence entre les courbes courant-voltage résultant de l'expression des formes sauvage et mutée  $\Delta\text{F508}$ . Cet état de fait vient de la difficulté d'obtenir des échantillons comparables d'ovocytes de semaines en semaines car l'ovocyte lui-même a encore trop de composantes qui ne sont toujours pas connues avec précision. De plus, l'ovocyte de grenouille n'a peut être pas tous les systèmes de synthèse protéique d'une cellule en culture, auquel cas l'action du *myo*-inositol sur cellules en culture ne pourrait pas être reproduite dans les ovocytes.

## 4.5. Modes d'action possibles du *myo*-inositol sur le mutant D150E de l'AQP2

### 4.5.1. Action par l'intermédiaire d'un mécanisme de signalisation intracellulaire

Bien que les données recueillies donnent un aperçu de la spécificité du *myo*-inositol sur l'AQP2-D150E exprimée dans des ovocytes de *Xenopus laevis*, le mécanisme d'action du composé n'est pas encore déterminé. L'observation de l'AQP2-D150E par électrophorèse et immunofluorescence permet de déterminer que ce mutant peut se rendre à la membrane, contrairement au mutant AQP2-G196D. Cependant, une grande proportion des protéines synthétisées ne se retrouve pas à la membrane plasmique. Selon la littérature (Fujiwara et Bichet, 2005), ces protéines seraient prisonnières du RE et des chaperonnes protéiques avant d'être acheminées vers leur dégradation. La forme mutée D150E a un avantage face à la forme G196D en ce sens qu'elle peut se rendre à la membrane plasmique, ce qui pourrait être la raison qui sous-tend la stimulation de son activité en présence de *myo*-inositol.

Différentes possibilités pourraient être envisagées pour expliquer qu'une incubation en présence de *myo*-inositol mène à une augmentation spécifique de la  $P_f$  attribuable à la forme mutée D150E dans des ovocytes. Ainsi, il se pourrait que la récupération partielle induite par le *myo*-inositol soit spécifique aux ovocytes, une hypothèse qui pourrait être testée par des mesures de perméabilité à l'eau sur un autre modèle cellulaire. Par ailleurs, le mécanisme pourrait faire intervenir une cascade intracellulaire activée de l'extérieur de l'ovocyte suite à une captation du *myo*-inositol à faible dose dont il n'est pas tenu compte par le test d'absorption de la figure 3.3. Une cascade intracellulaire induite par le *myo*-inositol activant l'AQP2-D150E semblait la voie la plus probable de l'action du *myo*-inositol puisqu'une telle cascade est déjà connue pour agir sur l'acheminement à la membrane de l'AQP2-wt.

Selon cette cascade déjà établie, lorsque la concentration d'AMPc augmente suite à l'activation de l'AC, il y a phosphorylation (Ser<sub>256</sub>) et acheminement de

l'AQP2-wt à la membrane plasmique où elle induit une augmentation du transport d'eau (Kuwahara et al., 1995). Cette cascade est également activée par la forskoline, qui permet de reproduire l'effet de l'AVP dans l'activation de l'AC. Toutefois, des ovocytes exprimant l'AQP2-D150E ne changent pas de perméabilité à l'eau lorsque traités avec la forskoline (figure 3.10). Ceci signifie donc que l'acheminement à la membrane plasmique de l'AQP2-D150E n'est pas affecté par la cascade faisant intervenir l'AC, l'AMPc intracellulaire et la phosphorylation du tétramère formant le pore à eau, nécessaire pour son acheminement à la membrane plasmique (de Mattia et al., 2005). Pourtant, cette cascade de phosphorylation de l'AQP2 est bien présente dans l'ovocyte puisque nos résultats démontrent que des ovocytes exprimant la forme native ont une activité qui augmente lorsque la forskoline est ajouté au milieu d'incubation au moment de la prise de mesure. Bien que ce ne soit pas la cascade impliquant l'AC et la phosphorylation du canal à eau qui mène à une stimulation de l'activité du canal muté D150E dans des ovocytes, il demeure toutefois possible qu'une autre cascade, liée à la dégradation ou agissant sur le recyclage vésiculaire de l'AQP2-D150E membranaire, soit responsable de cette stimulation.

#### **4.5.2. Action protectrice face à la présence d'urée**

Bien qu'aucune analyse ne donne d'information sur l'effet de l'urée *in vivo*, nous savons que, en grande quantité, elle a un effet dénaturant sur les protéines en les forçant à se linéariser et à perdre leur capacité à s'agréger (Myers et al., 1995). De plus, dans des analyses d'expression *in vitro*, la présence d'urée est néfaste lors de l'expression et après l'expression. Cette molécule dénaturante peut être vue comme un substitut à l'eau qui, en trop grande quantité, empêche le repliement protéique adéquat.

Nous nous sommes basés sur la capacité des osmolytes à contrer l'effet dénaturant de l'urée dans la médullaire rénale pour tenter de déterminer si, dans les ovocytes, la présence de *myo*-inositol diminuait l'effet dénaturant de l'urée sur les protéines présentes. Puisque l'urée a la capacité d'entrer dans l'ovocyte à la vitesse de 4 pmol/90 s (Smith et al., 1995), il était intéressant de déterminer si les AQP2

présentes dans les ovocytes voyaient leur perméabilité affectée par l'urée ajoutée lors de l'expression de la protéine. Les expériences démontrent que l'urée (200mM) diminue respectivement de  $73 \pm 8 \%$  ou de  $82 \pm 13 \%$  la  $P_f$  des ovocytes exprimant l'AQP2-wt ou l'AQP2-D150E (figure 3.10). Il est connu que l'urée traverse par diffusion passive la membrane plasmique des ovocytes (Hill et al., 2005). L'urée pourrait donc pénétrer jusqu'au RE où son action osmodénaturante pourrait alors déstabiliser les protéines en les forçant à adopter des conformations linéaires.

Suite à l'observation de cet effet délétère de l'urée sur la  $P_f$  des ovocytes, il devenait concevable d'envisager la possibilité que le *myo*-inositol puisse renverser cet effet de par son action protectrice sur les protéines. Cependant, l'ajout de *myo*-inositol directement dans l'ovocyte ou dans leur milieu d'incubation n'a pas modifié l'action de l'urée sur la perméabilité à l'eau des ovocytes exprimant les AQP2-D150E mutante ou de type sauvage (figure 3.10). Bien qu'il soit toujours possible que le *myo*-inositol ait été utilisé en trop faible quantité pour pouvoir exercer son action protectrice face à l'effet dénaturant de l'urée, nous pouvons toutefois conclure que le *myo*-inositol à l'extérieur de la cellule, à une concentration qui normalement augmente la  $P_f$  des ovocytes exprimant l'AQP2-D150E, ne présente pas cet effet lorsque 200mM d'urée est également présent dans le milieu d'incubation. Ces observations suggèrent en plus que le *myo*-inositol n'a pas d'effet protecteur sur les protéines qui sont présentes à la membrane plasmique et ne semble pas modifier le niveau de recyclage protéique à la membrane plasmique, à moins que l'urée n'interfère avec le mécanisme d'action de *myo*-inositol habituellement observé en son absence.

#### **4.5.3. Mode d'action suggéré par les analyses en immunobuvardage**

Des analyses en immunobuvardage de type Western révèlent des bandes de hauts poids moléculaires qui seraient susceptibles d'être des protéines ubiquitinées (figure 3.12). Une des voies par laquelle le *myo*-inositol pourrait donc exercer son action ferait alors intervenir une cascade intracellulaire de réactions, activée de

l'extérieur de la cellule par l'intermédiaire de protéines G ou de récepteurs membranaires, qui aurait pour effet d'augmenter ou de diminuer les niveaux respectifs de protéines phosphorylantes ou ubiquitinantes. Le *myo*-inositol pourrait par ailleurs impliquer une membrane spécialisée, comme par exemple les cavéoles ou les radeaux lipidiques, qui à son tour affecterait l'ubiquitination des protéines mutantes (Arcangeli et Becchetti, 2006). En utilisant l'une ou l'autre de ces voies, le *myo*-inositol aurait la capacité de promouvoir des changements dans les niveaux d'ubiquitination de l'AQP2-D150E et, par conséquent, de conférer une plus longue durée de vie à cette protéine.

Il est connu que l'AQP2 est ubiquitinée avant d'être dégradée, mais les processus par lesquels son ubiquitination mène à sa dégradation ne sont pas encore connus (Hirano et al., 2003). Toutefois, il est clair que l'AQP2 peut être amenée à sa dégradation par le protéasome lorsqu'elle est mal repliée, et que cet adressage vers le protéasome nécessite souvent l'attachement d'ubiquitine (Smalle et Vierstra, 2004). Il serait donc possible d'envisager l'hypothèse que le *myo*-inositol pourrait agir de l'extérieur en empêchant l'adressage de l'AQP2 vers le protéasome (Kaufman, 2002, Mori et al., 2000).

## 5. Conclusions et perspectives

### 5.1. Conclusions

Notre travail a tout d'abord établi le niveau d'expression des mutants AQP2-D150E et -G196D par rapport au type sauvage, l'AQP2-wt. Nous avons démontré ensuite que l'AQP2-D150E, seul des 2 mutants présentant une faible expression membranaire, peut être partiellement récupérée par le *myo*-inositol. Contrairement aux études préalablement publiées (Howard et al., 2003, Zhang et al., 2003), nos résultats sont compatibles avec une action extracellulaire plutôt que intracellulaire du *myo*-inositol. Bien que nous n'ayons pas trouvé le mode d'action du *myo*-inositol, nous avons mis en évidence une certaine spécificité face à d'autres isomères d'inositol et d'autres osmolytes, de même que sa sensibilité en évaluant son ED<sub>50</sub> à  $131 \pm 13 \mu\text{M}$ . Il faudrait maintenant se pencher sur les différentes cascades d'expression protéique et d'adressage cellulaire pour déterminer quelles voies le *myo*-inositol empruntent pour stimuler la P<sub>f</sub> d'ovocytes exprimant l'AQP2-D150E.

L'élucidation du mécanisme d'action nécessitera sans doute plusieurs autres études mais nous apportera de précieux renseignements sur les mécanismes qui régissent le devenir de protéines mutantes qui ont gardé une partie de leurs fonctions intactes. La compréhension de ces mécanismes est susceptible d'avoir des impacts sur la vie de nombreux patients souffrant de maladies héréditaires puisque l'on pourra agir directement sur le bon mécanisme tel qu'établi par des études de récupération protéique comme celle entreprise avec le *myo*-inositol dans le présent travail.

### 5.2. Perspectives

Afin de pouvoir définir la façon dont le *myo*-inositol agit sur les ovocytes exprimant la forme mutée D150E, il faudrait entreprendre des études visant à déterminer si le *myo*-inositol est nécessaire pendant la synthèse protéique, durant l'acheminement membranaire ou au cours du « turn-over » de la protéine à la

membrane plasmique. Pour y parvenir, une première série d'expériences analyserait la dépendance temporelle de l'effet du *myo*-inositol et une autre établirait l'influence du blocage de la synthèse protéique sur cet effet.

En immunobuvardage de type Western, le mutant AQP2-D150E présente des bandes de hauts poids moléculaires lorsque l'analyse est effectuée sur un homogénat d'ovocyte tandis que, dans la membrane plasmique isolée, seule la bande à 25 kDa est présente sur le gel. Bien que nous sachions que les hauts poids moléculaires caractérisent la protéine lorsqu'elle est associée aux compartiments intracellulaires, nous ne savons toutefois pas sous quelle forme se trouve cette protéine. Il serait donc nécessaire d'évaluer à quoi est associé l'AQP2-D150E pour donner des bandes de poids moléculaires si élevées et de déterminer si ces bandes ne seraient pas des produits de la protéine mutante sous forme ubiquitinée. Parallèlement, nous pourrions évaluer si ces bandes de hauts poids moléculaires sont déplacées ou éliminées lorsque des ovocytes exprimant l'AQP2-D150E sont mis en présence de *myo*-inositol extracellulaire.

De nombreuses voies pourraient être empruntées par une molécule pour avoir un effet de l'extérieur de la cellule et aboutir soit à une augmentation du nombre de canaux affichés à la membrane plasmique ou de la perméabilité à l'eau intrinsèque des canaux qui y sont exprimés. Puisqu'il y a toujours ambiguïté à ce sujet quant au mode d'action du *myo*-inositol sur le mutant D150E de l'AQP2, il faudrait étudier plus finement l'expression de cette protéine. Il serait ainsi possible d'évaluer l'expression de l'AQP2-D150E par une technique de type « pulse-chase » qui consiste en un ajout d'acides aminés radiomarqués qui sont ensuite « chassés » par des acides aminés froids. Cette technique donne un aperçu du temps d'expression protéique et du temps de demi-vie des protéines nouvellement synthétisées. Afin d'évaluer la dégradation, il serait finalement possible de bloquer l'expression protéique par de la cycloheximide (Bruses et Pilar, 1995).



## Bibliographie

- Agarraberes FA and Dice JF.** A molecular chaperone complex at the lysosomal membrane is required for protein translocation. *J Cell Sci* 114: 2491-2499, 2001.
- Agre P.** Aquaporin water channels (Nobel Lecture). *Angew Chem Int Ed Engl* 43: 4278-4290, 2004.
- Agre P, Preston GM, Smith BL, Jung JS, Raina S, Moon C, Guggino WB, and Nielsen S.** Aquaporin CHIP: the archetypal molecular water channel. *Am J Physiol* 265: F463-476, 1993.
- Aleksandrov AA, Chang X, Aleksandrov L, and Riordan JR.** The non-hydrolytic pathway of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator ion channel gating. *J Physiol* 528 Pt 2: 259-265, 2000.
- Aleksandrov L, Aleksandrov AA, Chang XB, and Riordan JR.** The First Nucleotide Binding Domain of Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator Is a Site of Stable Nucleotide Interaction, whereas the Second Is a Site of Rapid Turnover. *J Biol Chem* 277: 15419-15425, 2002.
- Amaral MD.** Therapy through chaperones: sense or antisense? Cystic fibrosis as a model disease. *J Inherit Metab Dis* 29: 477-487, 2006.
- Antoniou AN, Ford S, Alphey M, Osborne A, Elliott T, and Powis SJ.** The oxidoreductase ERp57 efficiently reduces partially folded in preference to fully folded MHC class I molecules. *Embo J* 21: 2655-2663, 2002.
- Arakawa T, Bhat R, and Timasheff SN.** Why preferential hydration does not always stabilize the native structure of globular proteins. *Biochemistry* 29: 1924-1931, 1990.
- Arcangeli A and Becchetti A.** Complex functional interaction between integrin receptors and ion channels. *Trends Cell Biol* 16: 631-639, 2006.
- Aridor M and Balch WE.** Integration of endoplasmic reticulum signaling in health and disease. *Nat Med* 5: 745-751, 1999.
- Back JF, Oakenfull D, and Smith MB.** Increased thermal stability of proteins in the presence of sugars and polyols. *Biochemistry* 18: 5191-5196, 1979.
- Bai L, Fushimi K, Sasaki S, and Marumo F.** Structure of aquaporin-2 vasopressin water channel. *J Biol Chem* 271: 5171-5176, 1996.
- Balch WE, Glick BS, and Rothman JE.** Sequential intermediates in the pathway of intercompartmental transport in a cell-free system. *Cell* 39: 525-536, 1984.
- Baumgarten R, Van De Pol MH, Wetzels JF, Van Os CH, and Deen PM.** Glycosylation is not essential for vasopressin-dependent routing of aquaporin-2 in transfected Madin-Darby canine kidney cells. *J Am Soc Nephrol* 9: 1553-1559, 1998.
- Beck FX, Sone M, Dorge A, and Thurau K.** Effect of loop diuretics on organic osmolytes and cell electrolytes in the renal outer medulla. *Kidney Int* 42: 843-850, 1992.
- Béguin P, Hasler U, Staub O, and Geering K.** Endoplasmic reticulum quality control of oligomeric membrane proteins: topogenic determinants involved in the degradation of the unassembled Na,K-ATPase alpha subunit and in its stabilization by beta subunit assembly. *Mol Biol Cell* 11: 1657-1672, 2000.

- Bernier V, Morello JP, Zarruk A, Debrand N, Salahpour A, Lonergan M, Arthus MF, Laperriere A, Brouard R, Bouvier M, and Bichet DG.** Pharmacologic chaperones as a potential treatment for X-linked nephrogenic diabetes insipidus. *J Am Soc Nephrol* 17: 232-243, 2006.
- Berridge MJ.** Inositol trisphosphate and calcium signalling. *Nature* 361: 315-325, 1993.
- Bichet DG.** Lithium, cyclic AMP signaling, A-kinase anchoring proteins, and aquaporin-2. *J Am Soc Nephrol* 17: 920-922, 2006a.
- Bichet DG.** Nephrogenic diabetes insipidus. *Adv Chronic Kidney Dis* 13: 96-104, 2006b.
- Bichet DG.** [Nephrogenic diabetes insipidus]. *Nephrol Ther* 2: 387-404, 2006c.
- Bichet DG, Hendy GN, Lonergan M, Arthus MF, Ligier S, Pausova Z, Kluge R, Zingg H, Saenger P, Oppenheimer E, and et al.** X-linked nephrogenic diabetes insipidus: from the ship Hopewell to RFLP studies. *Am J Hum Genet* 51: 1089-1102, 1992.
- Bichet DG and Zellweger M.** Nephrogenic diabetes insipidus. In: *Oxford Textbook of Clinical Nephrology*, edited by Davison AM, Cameron, S., Grünfeld, J.-P., Ponticelli, C., Ritz, E., Winearls, C., Van Ypersele, C. Oxford: Oxford University Press, 2004.
- Birnbaumer M, Seibold A, Gilbert S, Ishido M, Barberis C, Antaramian A, Brabet P, and Rosenthal W.** Molecular cloning of the receptor for human antidiuretic hormone. *Nature* 357: 333-335, 1992.
- Bissonnette P, Coady MJ, and Lapointe JY.** Expression of the sodium-myoinositol cotransporter SMIT2 at the apical membrane of Madin-Darby canine kidney cells. *J Physiol* 558: 759-768, 2004.
- Bonifacino JS and Glick BS.** The mechanisms of vesicle budding and fusion. *Cell* 116: 153-166, 2004.
- Bonifacino JS and Weissman AM.** Ubiquitin and the control of protein fate in the secretory and endocytic pathways. *Annu Rev Cell Dev Biol* 14: 19-57, 1998.
- Bonnardeaux A and Bichet DG.** Inherited disorders of the renal tubule. In: *Brenner and Rector's The kidney.*, edited by Brenner BM. Philadelphia: Saunders, 2004, p. 1697-1674.
- Bouveault L.** De l'isométrie optique dans les corps à chaînes fermées. *Bull de la Société Chimique de Paris* 11: 44-147, 1894.
- Brand A, Richter-Landsberg C, and Leibfritz D.** Multinuclear NMR studies on the energy metabolism of glial and neuronal cells. *Dev Neurosci* 15: 289-298, 1993.
- Brodsky JL and McCracken AA.** ER protein quality control and proteasome-mediated protein degradation. *Semin Cell Dev Biol* 10: 507-513, 1999.
- Bron S, Bolhuis A, Tjalsma H, Holsappel S, Venema G, and van Dijk JM.** Protein secretion and possible roles for multiple signal peptidases for precursor processing in bacilli. *J Biotechnol* 64: 3-13, 1998.
- Brown D.** The ins and outs of aquaporin-2 trafficking. *Am J Physiol Renal Physiol* 284: F893-901, 2003.
- Brown DD.** A tribute to the *Xenopus laevis* oocyte and egg. *J Biol Chem* 279: 45291-45299, 2004.

- Bruses JL and Pilar GR.** Effect of cycloheximide and mRNA synthesis inhibition on death of trophically deprived ciliary ganglion neurons in culture. *J Neurophysiol* 74: 2487-2499, 1995.
- Burg MB.** Response of renal inner medullary epithelial cells to osmotic stress. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* 133: 661-666, 2002.
- Burg MB, Kwon ED, and Kultz D.** Regulation of gene expression by hypertonicity. *Annu Rev Physiol* 59: 437-455, 1997.
- Cheng SH, Gregory RJ, Marshall J, Paul S, Souza DW, White GA, O'Riordan CR, and Smith AE.** Defective intracellular transport and processing of CFTR is the molecular basis of most cystic fibrosis. *Cell* 63: 827-834, 1990.
- Ciechanover A and Schwartz AL.** The ubiquitin system: pathogenesis of human diseases and drug targeting. *Biochim Biophys Acta* 1695: 3-17, 2004.
- Cremona O and De Camilli P.** Phosphoinositides in membrane traffic at the synapse. *J Cell Sci* 114: 1041-1052, 2001.
- Cremona O, Di Paolo G, Wenk MR, Luthi A, Kim WT, Takei K, Daniell L, Nemoto Y, Shears SB, Flavell RA, McCormick DA, and De Camilli P.** Essential role of phosphoinositide metabolism in synaptic vesicle recycling. *Cell* 99: 179-188, 1999.
- Crowe JH, Crowe LM, Oliver AE, Tsvetkova N, Wolkers W, and Tablin F.** The trehalose myth revisited: introduction to a symposium on stabilization of cells in the dry state. *Cryobiology* 43: 89-105, 2001.
- Dalbey RE, Chen M, Jiang F, and Samuelson JC.** Understanding the insertion of transporters and other membrane proteins. *Curr Opin Cell Biol* 12: 435-442, 2000.
- de Graffenried CL and Bertozzi CR.** The roles of enzyme localisation and complex formation in glycan assembly within the Golgi apparatus. *Curr Opin Cell Biol* 16: 356-363, 2004.
- de Mattia F, Savelkoul PJ, Kamsteeg EJ, Konings IB, van der Sluijs P, Mallmann R, Oksche A, and Deen PM.** Lack of arginine vasopressin-induced phosphorylation of aquaporin-2 mutant AQP2-R254L explains dominant nephrogenic diabetes insipidus. *J Am Soc Nephrol* 16: 2872-2880, 2005.
- Deen PM, Croes H, van Aubel RA, Ginsel LA, and van Os CH.** Water channels encoded by mutant aquaporin-2 genes in nephrogenic diabetes insipidus are impaired in their cellular routing. *J Clin Invest* 95: 2291-2296, 1995.
- Di Sant'Agnesse PA.** Clinical findings and research in cystic fibrosis. *Bibl Paediatr* 86: 10-19, 1967.
- Drumm ML, Wilkinson DJ, Smit LS, Worrell RT, Strong TV, Frizzell RA, Dawson DC, and Collins FS.** Chloride conductance expressed by delta F508 and other mutant CFTRs in *Xenopus* oocytes. *Science* 254: 1797-1799, 1991.
- Dumont JN and Brummett AR.** Oogenesis in *Xenopus laevis* (Daudin). V. Relationships between developing oocytes and their investing follicular tissues. *J Morphol* 155: 73-97, 1978.
- Dupré T, Lavieu G, Moore S, and Seta N.** [Inherited disorders of protein glycosylation]. *Med Sci (Paris)* 20: 331-338, 2004.
- Eagle H, Agranoff BW, and Snell EE.** The biosynthesis of meso-inositol by cultured mammalian cells, and the parabiotic growth of inositol-dependent and inositol-independent strains. *J Biol Chem* 235: 1891-1893, 1960.

- Ecelbarger CA, Terris J, Frindt G, Echevarria M, Marples D, Nielsen S, and Knepper MA.** Aquaporin-3 water channel localization and regulation in rat kidney. *Am J Physiol* 269: F663-672, 1995.
- Edge AS.** Deglycosylation of glycoproteins with trifluoromethanesulphonic acid: elucidation of molecular structure and function. *Biochem J* 376: 339-350, 2003.
- Ellgaard L and Helenius A.** ER quality control: towards an understanding at the molecular level. *Curr Opin Cell Biol* 13: 431-437, 2001.
- Ellgaard L, Molinari M, and Helenius A.** Setting the standards: quality control in the secretory pathway. *Science* 286: 1882-1888, 1999.
- Empson KL, Labuza TP, and Graf E.** Phytic acid as a food anti-oxidant. *J Food Sci* 56: 560-563, 1991.
- Fagioli C, Mezghrani A, and Sitia R.** Reduction of interchain disulfide bonds precedes the dislocation of Ig-mu chains from the endoplasmic reticulum to the cytosol for proteasomal degradation. *J Biol Chem* 276: 40962-40967, 2001.
- Felitsky DJ, Cannon JG, Capp MW, Hong J, Van Wynsberghe AW, Anderson CF, and Record MT, Jr.** The exclusion of glycine betaine from anionic biopolymer surface: why glycine betaine is an effective osmoprotectant but also a compatible solute. *Biochemistry* 43: 14732-14743, 2004.
- Ferrier RJ and Middleton S.** The conversion of carbohydrate derivatives into functionalized cyclohexanes and cyclopentanes. *Chem Rev* 93: 2779-2831, 1993.
- Fiebiger E, Story C, Ploegh HL, and Tortorella D.** Visualization of the ER-to-cytosol dislocation reaction of a type I membrane protein. *Embo J* 21: 1041-1053, 2002.
- Finkelstein A.** *Water Movement Through Lipid Bilayers, Pores, and Plasma Membranes: Theory and Reality.* New York: John Wiley & Sons Inc., 1987.
- Fisher SK, Novak JE, and Agranoff BW.** Inositol and higher inositol phosphates in neural tissues: homeostasis, metabolism and functional significance. *J Neurochem* 82: 736-754, 2002.
- Flynn GC, Pohl J, Flocco MT, and Rothman JE.** Peptide-binding specificity of the molecular chaperone BiP. *Nature* 353: 726-730, 1991.
- Foresti O, Frigerio L, Holkeri H, de Virgilio M, Vavassori S, and Vitale A.** A phaseolin domain involved directly in trimer assembly is a determinant for binding by the chaperone BiP. *Plant Cell* 15: 2464-2475, 2003.
- Franchi-Gazzola R, Visigalli R, Dall'Asta V, Sala R, Woo SK, Kwon HM, Gazzola GC, and Bussolati O.** Amino acid depletion activates TonEBP and sodium-coupled inositol transport. *Am J Physiol Cell Physiol* 280: C1465-1474, 2001.
- Frickel EM, Jemth P, Widersten M, and Mannervik B.** Yeast glyoxalase 1 is a monomeric enzyme with two active sites. *J Biol Chem* 276: 1845-1849, 2001.
- Frigerio L and Lord JM.** Glycoprotein degradation: do sugars hold the key? *Curr Biol* 10: R674-677, 2000.
- Frizzell RA, Rechkemmer G, and Shoemaker RL.** Altered regulation of airway epithelial cell chloride channels in cystic fibrosis. *Science* 233: 558-560, 1986.

- Frokiaer J, Marples D, Knepper MA, and Nielsen S.** Bilateral ureteral obstruction downregulates expression of vasopressin-sensitive AQP-2 water channel in rat kidney. *Am J Physiol* 270: F657-668, 1996.
- Fujiwara TM and Bichet DG.** Molecular biology of hereditary diabetes insipidus. *J Am Soc Nephrol* 16: 2836-2846, 2005.
- Fushimi K, Sasaki S, and Marumo F.** Phosphorylation of serine 256 is required for cAMP-dependent regulatory exocytosis of the aquaporin-2 water channel. *J Biol Chem* 272: 14800-14804, 1997.
- Gadsby DC, Nagel G, and Hwang TC.** The CFTR chloride channel of mammalian heart. *Annu Rev Physiol* 57: 387-416, 1995.
- Gamba G.** Alternative splicing and diversity of renal transporters. *Am J Physiol Renal Physiol* 281: F781-794, 2001.
- Gekko K.** Mechanism of polyol-induced protein stabilization: solubility of amino acids and diglycine in aqueous polyol solutions. *J Biochem (Tokyo)* 90: 1633-1641, 1981.
- Gething MJ.** Role and regulation of the ER chaperone BiP. *Semin Cell Dev Biol* 10: 465-472, 1999.
- Gillece P, Luz JM, Lennarz WJ, de La Cruz FJ, and Romisch K.** Export of a cysteine-free misfolded secretory protein from the endoplasmic reticulum for degradation requires interaction with protein disulfide isomerase. *J Cell Biol* 147: 1443-1456, 1999.
- Glanville NT, Byers DM, Cook HW, Spence MW, and Palmer FB.** Differences in the metabolism of inositol and phosphoinositides by cultured cells of neuronal and glial origin. *Biochim Biophys Acta* 1004: 169-179, 1989.
- Godfrey DA, Hallcher LM, Laird MH, Matschinsky FM, and Sherman WR.** Distribution of myo-inositol in the cat cochlear nucleus. *J Neurochem* 38: 939-947, 1982.
- Goldberg AL.** Protein degradation and protection against misfolded or damaged proteins. *Nature* 426: 895-899, 2003.
- Gorelick FS and Shugrue C.** Exiting the endoplasmic reticulum. *Mol Cell Endocrinol* 177: 13-18, 2001.
- Guyon C.** *Analyse fonctionnelle de nouvelles mutations de l'aquaporine-2 responsables du diabète insipide néphrogénique.* Montréal: Université de Montréal, 2004.
- Hammond C and Helenius A.** A chaperone with a sweet tooth. *Curr Biol* 3: 884-886, 1993.
- Hammond C and Helenius A.** Quality control in the secretory pathway. *Curr Opin Cell Biol* 7: 523-529, 1995.
- Hampton RY.** ER-associated degradation in protein quality control and cellular regulation. *Curr Opin Cell Biol* 14: 476-482, 2002.
- Hansen SH.** The role of taurine in diabetes and the development of diabetic complications. *Diabetes Metab Res Rev* 17: 330-346, 2001.
- Hara-Chikuma M and Verkman AS.** Physiological roles of glycerol-transporting aquaporins: the aquaglyceroporins. *Cell Mol Life Sci* 63: 1386-1392, 2006.
- Hare PD, Cress WA, and van Staden J.** Dissecting the roles of osmolyte accumulation during stress. *Plant, Cell & Environment* 21: 535-553, 1998.

- Harris HW, Jr. and Zeidel ML.** Water channels. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2: 699-707, 1993.
- Hauri HP, Kappeler F, Andersson H, and Appenzeller C.** ERGIC-53 and traffic in the secretory pathway. *J Cell Sci* 113 ( Pt 4): 587-596, 2000.
- Hayer-Hartl MK, Ewbank JJ, Creighton TE, and Hartl FU.** Conformational specificity of the chaperonin GroEL for the compact folding intermediates of alpha-lactalbumin. *Embo J* 13: 3192-3202, 1994.
- Helenius A and Aebi M.** Intracellular functions of N-linked glycans. *Science* 291: 2364-2369, 2001.
- Hendriks G, Koudijs M, van Balkom BW, Oorschot V, Klumperman J, Deen PM, and van der Sluijs P.** Glycosylation is important for cell surface expression of the water channel aquaporin-2 but is not essential for tetramerization in the endoplasmic reticulum. *J Biol Chem* 279: 2975-2983, 2004.
- Hicke L.** Gettin' down with ubiquitin: turning off cell-surface receptors, transporters and channels. *Trends Cell Biol* 9: 107-112, 1999.
- Hicke L.** A new ticket for entry into budding vesicles-ubiquitin. *Cell* 106: 527-530, 2001.
- Higy M, Junne T, and Spiess M.** Topogenesis of membrane proteins at the endoplasmic reticulum. *Biochemistry* 43: 12716-12722, 2004.
- Hill WG, Southern NM, MacIver B, Potter E, Apodaca G, Smith CP, and Zeidel ML.** Isolation and characterization of the *Xenopus* oocyte plasma membrane: a new method for studying activity of water and solute transporters. *Am J Physiol Renal Physiol* 289: F217-224, 2005.
- Hirano K, Zuber C, Roth J, and Ziak M.** The proteasome is involved in the degradation of different aquaporin-2 mutants causing nephrogenic diabetes insipidus. *Am J Pathol* 163: 111-120, 2003.
- Hitomi K and Tsukagoshi N.** cDNA sequence for rkST1, a novel member of the sodium ion-dependent glucose cotransporter family. *Biochim Biophys Acta* 1190: 469-472, 1994.
- Ho SN.** Intracellular water homeostasis and the mammalian cellular osmotic stress response. *J Cell Physiol* 206: 9-15, 2006.
- Hofmann RM and Pickart CM.** Noncanonical MMS2-encoded ubiquitin-conjugating enzyme functions in assembly of novel polyubiquitin chains for DNA repair. *Cell* 96: 645-653, 1999.
- Holub BJ.** The nutritional significance, metabolism, and function of myo-inositol and phosphatidylinositol in health and disease. *Adv Nutr Res* 4: 107-141, 1982.
- Hotta N.** New concepts and insights on pathogenesis and treatment of diabetic complications: polyol pathway and its inhibition. *Nagoya J Med Sci* 60: 89-100, 1997.
- Hovagimyan KG and Gerig JT.** Interactions of trimethylamine N-oxide and water with cyclo-alanylglycine. *J Phys Chem B Condens Matter Mater Surf Interfaces Biophys* 109: 24142-24151, 2005.
- Howard M, Fischer H, Roux J, Santos BC, Gullans SR, Yancey PH, and Welch WJ.** Mammalian osmolytes and S-nitrosoglutathione promote Delta F508 cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) protein maturation and function. *J Biol Chem* 278: 35159-35167, 2003.

- Hunziker W and Geuze HJ.** Intracellular trafficking of lysosomal membrane proteins. *Bioessays* 18: 379-389, 1996.
- Iolascon A, Aglio V, Tamma G, D'Apolito M, Addabbo F, Procino G, Simonetti MC, Montini G, Gesualdo L, Debler EW, Svelto M, and Valenti G.** Characterization of two novel missense mutations in the AQP2 gene causing nephrogenic diabetes insipidus. *Nephron Physiol* 105: p33-41, 2007.
- Jensen MØ, Rothlisberger U, and Rovira C.** Hydroxide and proton migration in aquaporins. *Biophys J* 89: 1744-1759, 2005.
- Jensen TJ, Loo MA, Pind S, Williams DB, Goldberg AL, and Riordan JR.** Multiple proteolytic systems, including the proteasome, contribute to CFTR processing. *Cell* 83: 129-135, 1995.
- Jessop CE, Chakravarthi S, Watkins RH, and Bulleid NJ.** Oxidative protein folding in the mammalian endoplasmic reticulum. *Biochem Soc Trans* 32: 655-658, 2004.
- Johnson AE and van Waes MA.** The translocon: a dynamic gateway at the ER membrane. *Annu Rev Cell Dev Biol* 15: 799-842, 1999.
- Ju S, Shaltiel G, Shamir A, Agam G, and Greenberg ML.** Human 1-D-myo-inositol-3-phosphate synthase is functional in yeast. *J Biol Chem* 279: 21759-21765, 2004.
- Jung JS, Preston GM, Smith BL, Guggino WB, and Agre P.** Molecular structure of the water channel through aquaporin CHIP. The hourglass model. *J Biol Chem* 269: 14648-14654, 1994.
- Kabani M, Kelley SS, Morrow MW, Montgomery DL, Sivendran R, Rose MD, Gierasch LM, and Brodsky JL.** Dependence of endoplasmic reticulum-associated degradation on the peptide binding domain and concentration of BiP. *Mol Biol Cell* 14: 3437-3448, 2003.
- Kaler SG and Tumer Z.** Prenatal diagnosis of Menkes disease. *Prenat Diagn* 18: 287-289, 1998.
- Kamhi-Nesher S, Shenkman M, Tolchinsky S, Fromm SV, Ehrlich R, and Lederkremer GZ.** A novel quality control compartment derived from the endoplasmic reticulum. *Mol Biol Cell* 12: 1711-1723, 2001.
- Kamsteeg EJ, Bichet DG, Konings IB, Nivet H, Lonergan M, Arthus MF, van Os CH, and Deen PM.** Reversed polarized delivery of an aquaporin-2 mutant causes dominant nephrogenic diabetes insipidus. *J Cell Biol* 163: 1099-1109, 2003.
- Kamsteeg EJ, Hendriks G, Boone M, Konings IB, Oorschot V, van der Sluijs P, Klumperman J, and Deen PM.** Short-chain ubiquitination mediates the regulated endocytosis of the aquaporin-2 water channel. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103: 18344-18349, 2006.
- Kamsteeg EJ, Wormhoudt TA, Rijss JP, van Os CH, and Deen PM.** An impaired routing of wild-type aquaporin-2 after tetramerization with an aquaporin-2 mutant explains dominant nephrogenic diabetes insipidus. *Embo J* 18: 2394-2400, 1999.
- Katsura T, Gustafson CE, Ausiello DA, and Brown D.** Protein kinase A phosphorylation is involved in regulated exocytosis of aquaporin-2 in transfected LLC-PK1 cells. *Am J Physiol* 272: F817-822, 1997.
- Katzmann DJ, Odorizzi G, and Emr SD.** Receptor downregulation and multivesicular-body sorting. *Nat Rev Mol Cell Biol* 3: 893-905, 2002.

- Kaufman RJ.** Orchestrating the unfolded protein response in health and disease. *J Clin Invest* 110: 1389-1398, 2002.
- Kaushik JK and Bhat R.** Why is trehalose an exceptional protein stabilizer? An analysis of the thermal stability of proteins in the presence of the compatible osmolyte trehalose. *J Biol Chem* 278: 26458-26465, 2003.
- Kerem BS, Buchanan JA, Durie P, Corey ML, Levison H, Rommens JM, Buchwald M, and Tsui LC.** DNA marker haplotype association with pancreatic sufficiency in cystic fibrosis. *Am J Hum Genet* 44: 827-834, 1989.
- Kim BE, Smith K, Meagher CK, and Petris MJ.** A conditional mutation affecting localization of the Menkes disease copper ATPase. Suppression by copper supplementation. *J Biol Chem* 277: 44079-44084, 2002.
- Koch S, Chen G, Santalucia JJ, Manji HK, and Moore GJ.** Abundant levels of myo-inositol in cells of human neuronal origin. *Abstracts Soc Neurosci* 25: 2207, 1999.
- Kolter T and Sandhoff K.** Principles of lysosomal membrane digestion: stimulation of sphingolipid degradation by sphingolipid activator proteins and anionic lysosomal lipids. *Annu Rev Cell Dev Biol* 21: 81-103, 2005.
- Kopito RR.** Biosynthesis and degradation of CFTR. *Physiol Rev* 79: S167-173, 1999.
- Kozono D, Yasui M, King LS, and Agre P.** Aquaporin water channels: atomic structure molecular dynamics meet clinical medicine. *J Clin Invest* 109: 1395-1399, 2002.
- Kuwahara M, Fushimi K, Terada Y, Bai L, Marumo F, and Sasaki S.** cAMP-dependent phosphorylation stimulates water permeability of aquaporin-collecting duct water channel protein expressed in *Xenopus* oocytes. *J Biol Chem* 270: 10384-10387, 1995.
- Kuwahara M, Iwai K, Ooeda T, Igarashi T, Ogawa E, Katsushima Y, Shinbo I, Uchida S, Terada Y, Arthus MF, Lonergan M, Fujiwara TM, Bichet DG, Marumo F, and Sasaki S.** Three families with autosomal dominant nephrogenic diabetes insipidus caused by aquaporin-2 mutations in the C-terminus. *Am J Hum Genet* 69: 738-748, 2001.
- Kwon HM, Yamauchi A, Uchida S, Preston AS, Garcia-Perez A, Burg MB, and Handler JS.** Cloning of the cDNA for a Na<sup>+</sup>/myo-inositol cotransporter, a hypertonicity stress protein. *J Biol Chem* 267: 6297-6301, 1992.
- Lande MB, Jo I, Zeidel ML, Somers M, and Harris HW, Jr.** Phosphorylation of aquaporin-2 does not alter the membrane water permeability of rat papillary water channel-containing vesicles. *J Biol Chem* 271: 5552-5557, 1996.
- Lang F, Busch GL, Ritter M, Volkl H, Waldegger S, Gulbins E, and Haussinger D.** Functional significance of cell volume regulatory mechanisms. *Physiol Rev* 78: 247-306, 1998.
- Leduc-Nadeau A, Lahjouji K, Bissonnette P, Lapointe JY, and Bichet DG.** Elaboration of a novel technique for the purification of plasma membranes from *Xenopus laevis* oocytes. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2006.
- Li C, Roy K, Dandridge K, and Naren AP.** Molecular assembly of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator in plasma membrane. *J Biol Chem* 279: 24673-24684, 2004.



- Lin Z, Schwartz FP, and Eisenstein E.** The hydrophobic nature of GroEL-substrate binding. *J Biol Chem* 270: 1011-1014, 1995.
- Lindquist JA, Hammerling GJ, and Trowsdale J.** ER60/ERp57 forms disulfide-bonded intermediates with MHC class I heavy chain. *Faseb J* 15: 1448-1450, 2001.
- Loewus FA and Loewus MW.** Myo-Inositol: its biosynthesis and metabolism. *Annu Rev Plant Physiol* 34: 137-161, 1983.
- Lomas DA and Parfrey H.** Alpha1-antitrypsin deficiency. 4: Molecular pathophysiology. *Thorax* 59: 529-535, 2004.
- Loo MA, Jensen TJ, Cui L, Hou Y, Chang XB, and Riordan JR.** Perturbation of Hsp90 interaction with nascent CFTR prevents its maturation and accelerates its degradation by the proteasome. *Embo J* 17: 6879-6887, 1998.
- Loo TW, Bartlett MC, and Clarke DM.** Rescue of folding defects in ABC transporters using pharmacological chaperones. *J Bioenerg Biomembr* 37: 501-507, 2005.
- Loo TW and Clarke DM.** Correction of defective protein kinesis of human P-glycoprotein mutants by substrates and modulators. *J Biol Chem* 272: 709-712, 1997.
- Loo TW and Clarke DM.** Prolonged association of temperature-sensitive mutants of human P-glycoprotein with calnexin during biogenesis. *J Biol Chem* 269: 28683-28689, 1994.
- Marples D, Christensen S, Christensen EI, Ottosen PD, and Nielsen S.** Lithium-induced downregulation of aquaporin-2 water channel expression in rat kidney medulla. *J Clin Invest* 95: 1838-1845, 1995.
- Marques C, Pereira P, Taylor A, Liang JN, Reddy VN, Szweda LI, and Shang F.** Ubiquitin-dependent lysosomal degradation of the HNE-modified proteins in lens epithelial cells. *Faseb J* 18: 1424-1426, 2004.
- Marr N, Bichet DG, Hoefs S, Savelkoul PJ, Konings IB, De Mattia F, Graat MP, Arthus MF, Lonergan M, Fujiwara TM, Knoers NV, Landau D, Balfe WJ, Oksche A, Rosenthal W, Muller D, Van Os CH, and Deen PM.** Cell-biologic and functional analyses of five new Aquaporin-2 missense mutations that cause recessive nephrogenic diabetes insipidus. *J Am Soc Nephrol* 13: 2267-2277, 2002a.
- Marr N, Bichet DG, Lonergan M, Arthus MF, Jeck N, Seyberth HW, Rosenthal W, van Os CH, Oksche A, and Deen PM.** Heterooligomerization of an Aquaporin-2 mutant with wild-type Aquaporin-2 and their misrouting to late endosomes/lysosomes explains dominant nephrogenic diabetes insipidus. *Hum Mol Genet* 11: 779-789, 2002b.
- Masyuk AI and LaRusso NF.** Aquaporins in the hepatobiliary system. *Hepatology* 43: S75-81, 2006.
- McCarty NA.** Permeation through the CFTR chloride channel. *J Exp Biol* 203: 1947-1962, 2000.
- McManus ML, Churchwell KB, and Strange K.** Regulation of cell volume in health and disease. *N Engl J Med* 333: 1260-1266, 1995.
- Miyakawa H, Woo SK, Dahl SC, Handler JS, and Kwon HM.** Tonicity-responsive enhancer binding protein, a rel-like protein that stimulates transcription in response to hypertonicity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96: 2538-2542, 1999.
- Molinari M and Helenius A.** Glycoproteins form mixed disulphides with oxidoreductases during folding in living cells. *Nature* 402: 90-93, 1999.

- Moore SE.** Oligosaccharide transport: pumping waste from the ER into lysosomes. *Trends Cell Biol* 9: 441-446, 1999.
- Morello JP, Salahpour A, Laperriere A, Bernier V, Arthus MF, Lonergan M, Petaja-Repo U, Angers S, Morin D, Bichet DG, and Bouvier M.** Pharmacological chaperones rescue cell-surface expression and function of misfolded V2 vasopressin receptor mutants. *J Clin Invest* 105: 887-895, 2000.
- Mori K, Ogawa N, Kawahara T, Yanagi H, and Yura T.** mRNA splicing-mediated C-terminal replacement of transcription factor Hac1p is required for efficient activation of the unfolded protein response. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97: 4660-4665, 2000.
- Moris M-A.** *Synthèse d'analogues de phosphates d'inositol mimes de l'adénophostine.* Strasbourg: Université Strasbourg I - Louis Pasteur, 2006.
- Mukherjee S and Maxfield FR.** Cholesterol: stuck in traffic. *Nat Cell Biol* 1: E37-38, 1999.
- Myers JK, Pace CN, and Scholtz JM.** Denaturant m values and heat capacity changes: relation to changes in accessible surface areas of protein unfolding. *Protein Sci* 4: 2138-2148, 1995.
- Nandi D, Tahiliani P, Kumar A, and Chandu D.** The ubiquitin-proteasome system. *J Biosci* 31: 137-155, 2006.
- Naren AP, Cobb B, Li C, Roy K, Nelson D, Heda GD, Liao J, Kirk KL, Sorscher EJ, Hanrahan J, and Clancy JP.** A macromolecular complex of beta 2 adrenergic receptor, CFTR, and ezrin/radixin/moesin-binding phosphoprotein 50 is regulated by PKA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100: 342-346, 2003.
- Neuhof W and Beck FX.** Cell survival in the hostile environment of the renal medulla. *Annu Rev Physiol* 67: 531-555, 2005.
- Nicchitta CV.** A platform for compartmentalized protein synthesis: protein translation and translocation in the ER. *Curr Opin Cell Biol* 14: 412-416, 2002.
- Nielsen S, Chou CL, Marples D, Christensen EI, Kishore BK, and Knepper MA.** Vasopressin increases water permeability of kidney collecting duct by inducing translocation of aquaporin-CD water channels to plasma membrane. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92: 1013-1017, 1995.
- Nielsen S, Frokiaer J, Marples D, Kwon TH, Agre P, and Knepper MA.** Aquaporins in the kidney: from molecules to medicine. *Physiol Rev* 82: 205-244, 2002.
- Nielsen S, Smith BL, Christensen EI, and Agre P.** Distribution of the aquaporin CHIP in secretory and resorptive epithelia and capillary endothelia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90: 7275-7279, 1993a.
- Nielsen S, Smith BL, Christensen EI, Knepper MA, and Agre P.** CHIP28 water channels are localized in constitutively water-permeable segments of the nephron. *J Cell Biol* 120: 371-383, 1993b.
- Nishikawa S, Brodsky JL, and Nakatsukasa K.** Roles of molecular chaperones in endoplasmic reticulum (ER) quality control and ER-associated degradation (ERAD). *J Biochem (Tokyo)* 137: 551-555, 2005.
- Nishikawa SI, Fewell SW, Kato Y, Brodsky JL, and Endo T.** Molecular chaperones in the yeast endoplasmic reticulum maintain the solubility of proteins for retrotranslocation and degradation. *J Cell Biol* 153: 1061-1070, 2001.

- Novak JE, Turner RS, Agranoff BW, and Fisher SK.** Differentiated human NT2-N neurons possess a high intracellular content of myo-inositol. *J Neurochem* 72: 1431-1440, 1999.
- Novick P, Field C, and Schekman R.** Identification of 23 complementation groups required for post-translational events in the yeast secretory pathway. *Cell* 21: 205-215, 1980.
- O'Donnell T, Rotzinger S, Nakashima TT, Hanstock CC, Ulrich M, and Silverstone PH.** Chronic lithium and sodium valproate both decrease the concentration of myo-inositol and increase the concentration of inositol monophosphates in rat brain. *Brain Res* 880: 84-91, 2000.
- Odom AR, Stahlberg A, Wentz SR, and York JD.** A role for nuclear inositol 1,4,5-trisphosphate kinase in transcriptional control. *Science* 287: 2026-2029, 2000.
- Oliver JD, Roderick HL, Llewellyn DH, and High S.** ERp57 functions as a subunit of specific complexes formed with the ER lectins calreticulin and calnexin. *Mol Biol Cell* 10: 2573-2582, 1999.
- Osborne SL, Thomas CL, Gschmeissner S, and Schiavo G.** Nuclear PtdIns(4,5)P2 assembles in a mitotically regulated particle involved in pre-mRNA splicing. *J Cell Sci* 114: 2501-2511, 2001.
- Ou WJ, Cameron PH, Thomas DY, and Bergeron JJ.** Association of folding intermediates of glycoproteins with calnexin during protein maturation. *Nature* 364: 771-776, 1993.
- Parodi AJ.** Protein glucosylation and its role in protein folding. *Annu Rev Biochem* 69: 69-93, 2000.
- Partridge CJ, Beech DJ, and Sivaprasadarao A.** Identification and pharmacological correction of a membrane trafficking defect associated with a mutation in the sulfonyleurea receptor causing familial hyperinsulinism. *J Biol Chem* 276: 35947-35952, 2001.
- Pendaries C, Tronchere H, Plantavid M, and Payrastre B.** Phosphoinositide signaling disorders in human diseases. *FEBS Lett* 546: 25-31, 2003.
- Perlmutter DH.** The cellular response to aggregated proteins associated with human disease. *J Clin Invest* 110: 1219-1220, 2002.
- Pind S, Riordan JR, and Williams DB.** Participation of the endoplasmic reticulum chaperone calnexin (p88, 1P90) in the biogenesis of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *J Biol Chem* 269: 12784-12788, 1994.
- Plemper RK and Wolf DH.** Retrograde protein translocation: ERADication of secretory proteins in health and disease. *Trends Biochem Sci* 24: 266-270, 1999.
- Popot JL and Engelman DM.** Helical membrane protein folding, stability, and evolution. *Annu Rev Biochem* 69: 881-922, 2000.
- Powell K and Zeitlin PL.** Therapeutic approaches to repair defects in deltaF508 CFTR folding and cellular targeting. *Adv Drug Deliv Rev* 54: 1395-1408, 2002.
- Preston GM and Agre P.** Isolation of the cDNA for erythrocyte integral membrane protein of 28 kilodaltons: member of an ancient channel family. *Proc Natl Acad Sci USA* 88: 11110-11114, 1991.
- Qu D, Teckman JH, Omura S, and Perlmutter DH.** Degradation of a mutant secretory protein, alpha-1-antitrypsin Z, in the endoplasmic reticulum requires proteasome activity. *J Biol Chem* 271: 22791-22795, 1996.

- Qu Y, Bolen CL, and Bolen DW.** Osmolyte-driven contraction of a random coil protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95: 9268-9273, 1998.
- Ren G, Reddy VS, Cheng A, Melnyk P, and Mitra AK.** Visualization of a water-selective pore by electron crystallography in vitreous ice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98: 1398-1403, 2001.
- Ribeiro CM.** The role of intracellular calcium signals in inflammatory responses of polarised cystic fibrosis human airway epithelia. *Drugs R D* 7: 17-31, 2006.
- Riordan JR.** Assembly of functional CFTR chloride channels. *Annu Rev Physiol* 67: 701-718, 2005.
- Riordan JR, Rommens JM, Kerem B, Alon N, Rozmahel R, Grzelczak Z, Zielenski J, Lok S, Plavsic N, Chou JL, and et al.** Identification of the cystic fibrosis gene: cloning and characterization of complementary DNA. *Science* 245: 1066-1073, 1989.
- Robben JH, Knoers NV, and 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* 291: F257-270, 2006.
- Robinson DR and Jencks WP.** Effect of denaturing agents of the urea-guanidinium class on the solubility of acetyltetraglycine ethyl ester and related compounds. *J Biol Chem* 238: 1558-1560, 1963.
- Rojek A, Fuchtbauer EM, Kwon TH, Frokiaer J, and Nielsen S.** Severe urinary concentrating defect in renal collecting duct-selective AQP2 conditional-knockout mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103: 6037-6042, 2006.
- Roll P, Massacrier A, Pereira S, Robaglia-Schlupp A, Cau P, and Szeppetowski P.** New human sodium/glucose cotransporter gene (KST1): identification, characterization, and mutation analysis in ICCA (infantile convulsions and choreoathetosis) and BFIC (benign familial infantile convulsions) families. *Gene* 285: 141-148, 2002.
- Römisch K.** Endoplasmic reticulum-associated degradation. *Annu Rev Cell Dev Biol* 21: 435-456, 2005.
- Rommens JM, Iannuzzi MC, Kerem B, Drumm ML, Melmer G, Dean M, Rozmahel R, Cole JL, Kennedy D, Hidaka N, and et al.** Identification of the cystic fibrosis gene: chromosome walking and jumping. *Science* 245: 1059-1065, 1989.
- Rosenbach T, Liesegang C, Binting S, and Czarnetzki BM.** Inositol phosphate formation and release of intracellular free calcium by bradykinin in HaCaT keratinocytes. *Arch Dermatol Res* 285: 393-396, 1993.
- Rosenberg MF, Kamis AB, Aleksandrov LA, Ford RC, and Riordan JR.** Purification and crystallization of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR). *J Biol Chem* 279: 39051-39057, 2004.
- Rothman JE.** The protein machinery of vesicle budding and fusion. *Protein Sci* 5: 185-194, 1996.
- Rowe SM, Miller S, and Sorscher EJ.** Cystic fibrosis. *N Engl J Med* 352: 1992-2001, 2005.
- Saiardi A, Caffrey JJ, Snyder SH, and Shears SB.** Inositol polyphosphate multikinase (ArgRIII) determines nuclear mRNA export in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett* 468: 28-32, 2000.

- Saiardi A, Resnick AC, Snowman AM, Wendland B, and Snyder SH.** Inositol pyrophosphates regulate cell death and telomere length through phosphoinositide 3-kinase-related protein kinases. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102: 1911-1914, 2005.
- Sasakawa N, Sharif M, and Hanley MR.** Metabolism and biological activities of inositol pentakisphosphate and inositol hexakisphosphate. *Biochem Pharmacol* 50: 137-146, 1995.
- Schafer JA.** Transepithelial osmolality differences, hydraulic conductivities, and volume absorption in the proximal tubule. *Annu Rev Physiol* 52: 709-726, 1990.
- Schenk AD, Werten PJ, Scheuring S, de Groot BL, Muller SA, Stahlberg H, Philippsen A, and Engel A.** The 4.5 Å structure of human AQP2. *J Mol Biol* 350: 278-289, 2005.
- Schmolke M, Bornemann A, and Guder WG.** Site-specific regulation of organic osmolytes along the rat nephron. *Am J Physiol* 271: F645-652, 1996.
- Schrag JD, Procopio DO, Cygler M, Thomas DY, and Bergeron JJ.** Lectin control of protein folding and sorting in the secretory pathway. *Trends Biochem Sci* 28: 49-57, 2003.
- Schrier RW and Cadnapaphornchai MA.** Renal aquaporin water channels: from molecules to human disease. *Prog Biophys Mol Biol* 81: 117-131, 2003.
- Schubert U, Anton LC, Gibbs J, Norbury CC, Yewdell JW, and Bennink JR.** Rapid degradation of a large fraction of newly synthesized proteins by proteasomes. *Nature* 404: 770-774, 2000.
- Schulein R.** The early stages of the intracellular transport of membrane proteins: clinical and pharmacological implications. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 151: 45-91, 2004.
- Schultz BD, Singh AK, Devor DC, and Bridges RJ.** Pharmacology of CFTR chloride channel activity. *Physiol Rev* 79: S109-144, 1999.
- Sevilla LM, Comstock SS, Swier K, and Miller J.** Endoplasmic reticulum-associated degradation-induced dissociation of class II invariant chain complexes containing a glycosylation-deficient form of p41. *J Immunol* 173: 2586-2593, 2004.
- Shears SB.** The versatility of inositol phosphates as cellular signals. *Biochim Biophys Acta* 1436: 49-67, 1998.
- Sherman WR, Rasheed A, Mauck LA, and Wiecko J.** Incubations of testis myo-inositol-1-phosphate synthase with D-(5-18O)glucose 6-phosphate and with H<sub>2</sub><sup>18</sup>O show no evidence of Schiff base formation. *J Biol Chem* 252: 5672-5676, 1977.
- Shetty HU, Schapiro MB, Holloway HW, and Rapoport SI.** Polyol profiles in Down syndrome. myo-Inositol, specifically, is elevated in the cerebrospinal fluid. *J Clin Invest* 95: 542-546, 1995.
- Shi P, Cao X, Qu J, Volk KA, Kirby PA, Williamson RA, Stokes JB, and Yang B.** Nephrogenic Diabetes Insipidus in Mice Caused by Deleting C-terminal Tail of Aquaporin-2. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2007.
- Smalle J and Vierstra RD.** The ubiquitin 26S proteasome proteolytic pathway. *Annu Rev Plant Biol* 55: 555-590, 2004.
- Smith CP, Lee WS, Martial S, Knepper MA, You G, Sands JM, and Hediger MA.** Cloning and regulation of expression of the rat kidney urea transporter (rUT2). *J Clin Invest* 96: 1556-1563, 1995.

- Spector R.** Myo-inositol transport through the blood-brain barrier. *Neurochem Res* 13: 785-787, 1988.
- Spence J, Sadis S, Haas AL, and Finley D.** A ubiquitin mutant with specific defects in DNA repair and multiubiquitination. *Mol Cell Biol* 15: 1265-1273, 1995.
- Steger DJ, Haswell ES, Miller AL, Wentz SR, and O'Shea EK.** Regulation of chromatin remodeling by inositol polyphosphates. *Science* 299: 114-116, 2003.
- Stevens MJ, Lattimer SA, Kamijo M, Van Huysen C, Sima AA, and Greene DA.** Osmotically-induced nerve taurine depletion and the compatible osmolyte hypothesis in experimental diabetic neuropathy in the rat. *Diabetologia* 36: 608-614, 1993.
- Stork C and Renshaw PF.** Mitochondrial dysfunction in bipolar disorder: evidence from magnetic resonance spectroscopy research. *Mol Psychiatry* 10: 900-919, 2005.
- Strous GJ and Govers R.** The ubiquitin-proteasome system and endocytosis. *J Cell Sci* 112 ( Pt 10): 1417-1423, 1999.
- Suzuki T, Kitajima K, Inoue S, and Inoue Y.** N-glycosylation/deglycosylation as a mechanism for the post-translational modification/remodification of proteins. *Glycoconj J* 12: 183-193, 1995.
- Tamarappoo BK and Verkman AS.** Defective aquaporin-2 trafficking in nephrogenic diabetes insipidus and correction by chemical chaperones. *J Clin Invest* 101: 2257-2267, 1998.
- Taxis C, Hitt R, Park SH, Deak PM, Kostova Z, and Wolf DH.** Use of modular substrates demonstrates mechanistic diversity and reveals differences in chaperone requirement of ERAD. *J Biol Chem* 278: 35903-35913, 2003.
- Terlecky SR and Dice JF.** Polypeptide import and degradation by isolated lysosomes. *J Biol Chem* 268: 23490-23495, 1993.
- Terris J, Ecelbarger CA, Marples D, Knepper MA, and Nielsen S.** Distribution of aquaporin-4 water channel expression within rat kidney. *Am J Physiol* 269: F775-785, 1995.
- Thiagarajah JR and Verkman AS.** CFTR pharmacology and its role in intestinal fluid secretion. *Curr Opin Pharmacol* 3: 594-599, 2003.
- Thomas PM, Cote GJ, Wohlk N, Haddad B, Mathew PM, Rabl W, Aguilar-Bryan L, Gagel RF, and Bryan J.** Mutations in the sulfonyleurea receptor gene in familial persistent hyperinsulinemic hypoglycemia of infancy. *Science* 268: 426-429, 1995.
- Timmer RT and Sands JM.** Lithium intoxication. *J Am Soc Nephrol* 10: 666-674, 1999.
- Toker A and Cantley LC.** Signalling through the lipid products of phosphoinositide-3-OH kinase. *Nature* 387: 673-676, 1997.
- Tortorella D, Story CM, Huppa JB, Wiertz EJ, Jones TR, Bacik I, Bennink JR, Yewdell JW, and Ploegh HL.** Dislocation of type I membrane proteins from the ER to the cytosol is sensitive to changes in redox potential. *J Cell Biol* 142: 365-376, 1998.
- Tritsaris K, Looms DK, Nauntofte B, and Dissing S.** Nitric oxide synthesis causes inositol phosphate production and Ca<sup>2+</sup> release in rat parotid acinar cells. *Pflugers Arch* 440: 223-228, 2000.
- Trombetta ES and Parodi AJ.** Quality control and protein folding in the secretory pathway. *Annu Rev Cell Dev Biol* 19: 649-676, 2003.

- Tsai B, Rodighiero C, Lencer WI, and Rapoport TA.** Protein disulfide isomerase acts as a redox-dependent chaperone to unfold cholera toxin. *Cell* 104: 937-948, 2001.
- Tsai B, Ye Y, and Rapoport TA.** Retro-translocation of proteins from the endoplasmic reticulum into the cytosol. *Nat Rev Mol Cell Biol* 3: 246-255, 2002.
- Uldry M, Ibberson M, Horisberger JD, Chatton JY, Riederer BM, and Thorens B.** Identification of a mammalian H(+)-myo-inositol symporter expressed predominantly in the brain. *Embo J* 20: 4467-4477, 2001.
- Uldry M, Steiner P, Zurich MG, Beguin P, Hirling H, Dolci W, and Thorens B.** Regulated exocytosis of an H+/myo-inositol symporter at synapses and growth cones. *Embo J* 23: 531-540, 2004.
- Vaden DL, Ding D, Peterson B, and Greenberg ML.** Lithium and valproate decrease inositol mass and increase expression of the yeast INO1 and INO2 genes for inositol biosynthesis. *J Biol Chem* 276: 15466-15471, 2001.
- van Kerkhof P and Strous GJ.** The ubiquitin-proteasome pathway regulates lysosomal degradation of the growth hormone receptor and its ligand. *Biochem Soc Trans* 29: 488-493, 2001.
- Vashist S and Ng DT.** Misfolded proteins are sorted by a sequential checkpoint mechanism of ER quality control. *J Cell Biol* 165: 41-52, 2004.
- Velloso LM, Svensson K, Schneider G, Pettersson RF, and Lindqvist Y.** Crystal structure of the carbohydrate recognition domain of p58/ERGIC-53, a protein involved in glycoprotein export from the endoplasmic reticulum. *J Biol Chem* 277: 15979-15984, 2002.
- Wagner CA, Friedrich B, Setiawan I, Lang F, and Broer S.** The use of *Xenopus laevis* oocytes for the functional characterization of heterologously expressed membrane proteins. *Cell Physiol Biochem* 10: 1-12, 2000.
- Walmsley RN and Koay ESC.** *A Primer of Chemical Pathology*. London: World Scientific, 1996.
- Wang Q and Chang A.** Substrate recognition in ER-associated degradation mediated by Eps1, a member of the protein disulfide isomerase family. *Embo J* 22: 3792-3802, 2003.
- Ward CL and Kopito RR.** Intracellular turnover of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. Inefficient processing and rapid degradation of wild-type and mutant proteins. *J Biol Chem* 269: 25710-25718, 1994.
- Ward CL, Omura S, and Kopito RR.** Degradation of CFTR by the ubiquitin-proteasome pathway. *Cell* 83: 121-127, 1995.
- Welsh MJ, Denning GM, Ostedgaard LS, and Anderson MP.** Dysfunction of CFTR bearing the delta F508 mutation. *J Cell Sci Suppl* 17: 235-239, 1993.
- Wiese TJ, Dunlap JA, Conner CE, Grzybowski JA, Lowe WL, Jr., and Yorek MA.** Osmotic regulation of Na-myo-inositol cotransporter mRNA level and activity in endothelial and neural cells. *Am J Physiol* 270: C990-997, 1996.
- Williams RS and Harwood AJ.** Lithium therapy and signal transduction. *Trends Pharmacol Sci* 21: 61-64, 2000.
- Williamson JR.** Role of inositol lipid breakdown in the generation of intracellular signals. State of the art lecture. *Hypertension* 8: II140-156, 1986.

- Winchester BG.** Lysosomal membrane proteins. *Eur J Paediatr Neurol* 5 Suppl A: 11-19, 2001.
- Woo SK and Kwon HM.** Adaptation of kidney medulla to hypertonicity: role of the transcription factor TonEBP. *Int Rev Cytol* 215: 189-202, 2002.
- Woo SK, Lee SD, and Kwon HM.** TonEBP transcriptional activator in the cellular response to increased osmolality. *Pflugers Arch* 444: 579-585, 2002.
- Wright CE, Tallan HH, Lin YY, and Gaull GE.** Taurine: biological update. *Annu Rev Biochem* 55: 427-453, 1986.
- Xiong X, Bragin A, Widdicombe JH, Cohn J, and Skach WR.** Structural cues involved in endoplasmic reticulum degradation of G85E and G91R mutant cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *J Clin Invest* 100: 1079-1088, 1997.
- Yamauchi A, Sugiura T, Ito T, Miyai A, Horio M, Imai E, and Kamada T.** Na<sup>+</sup>/myo-inositol transport is regulated by basolateral tonicity in Madin-Darby canine kidney cells. *J Clin Invest* 97: 263-267, 1996.
- Yang B and Verkman AS.** Water and glycerol permeabilities of aquaporins 1-5 and MIP determined quantitatively by expression of epitope-tagged constructs in *Xenopus* oocytes. *J Biol Chem* 272: 16140-16146, 1997.
- Yang DS, Yip CM, Huang TH, Chakrabartty A, and Fraser PE.** Manipulating the amyloid-beta aggregation pathway with chemical chaperones. *J Biol Chem* 274: 32970-32974, 1999.
- Yang Y, Janich S, Cohn JA, and Wilson JM.** The common variant of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator is recognized by hsp70 and degraded in a pre-Golgi nonlysosomal compartment. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90: 9480-9484, 1993.
- Yorek MA, Dunlap JA, and Lowe WL, Jr.** Osmotic regulation of the Na<sup>+</sup>/myo-inositol cotransporter and postinduction normalization. *Kidney Int* 55: 215-224, 1999.
- York JD, Guo S, Odom AR, Spiegelberg BD, and Stolz LE.** An expanded view of inositol signaling. *Adv Enzyme Regul* 41: 57-71, 2001.
- York JD, Odom AR, Murphy R, Ives EB, and Wente SR.** A phospholipase C-dependent inositol polyphosphate kinase pathway required for efficient messenger RNA export. *Science* 285: 96-100, 1999.
- York SJ, Armbruster BN, Greenwell P, Petes TD, and York JD.** Inositol diphosphate signaling regulates telomere length. *J Biol Chem* 280: 4264-4269, 2005.
- Yue H, Devidas S, and Guggino WB.** The two halves of CFTR form a dual-pore ion channel. *J Biol Chem* 275: 10030-10034, 2000.
- Zampighi GA, Kreman M, Boorer KJ, Loo DD, Bezanilla F, Chandy G, Hall JE, and Wright EM.** A method for determining the unitary functional capacity of cloned channels and transporters expressed in *Xenopus laevis* oocytes. *J Membr Biol* 148: 65-78, 1995.
- Zerhusen B, Zhao J, Xie J, Davis PB, and Ma J.** A single conductance pore for chloride ions formed by two cystic fibrosis transmembrane conductance regulator molecules. *J Biol Chem* 274: 7627-7630, 1999.
- Zeuthen T, Meinild AK, Klaerke DA, Loo DD, Wright EM, Belhage B, and Litman T.** Water transport by the Na<sup>+</sup>/glucose cotransporter under isotonic conditions. *Biol Cell* 89: 307-312, 1997.



**Zhang K and Kaufman RJ.** Signaling the unfolded protein response from the endoplasmic reticulum. *J Biol Chem* 279: 25935-25938, 2004.

**Zhang X and Majerus PW.** Phosphatidylinositol signalling reactions. *Semin Cell Dev Biol* 9: 153-160, 1998.

**Zhang XM, Wang XT, Yue H, Leung SW, Thibodeau PH, Thomas PJ, and Guggino SE.** Organic solutes rescue the functional defect in delta F508 cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *J Biol Chem* 278: 51232-51242, 2003.

**Zhang Y, Nijbroek G, Sullivan ML, McCracken AA, Watkins SC, Michaelis S, and Brodsky JL.** Hsp70 molecular chaperone facilitates endoplasmic reticulum-associated protein degradation of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator in yeast. *Mol Biol Cell* 12: 1303-1314, 2001.

**Zietkiewicz S, Krzewska J, and Liberek K.** Successive and synergistic action of the Hsp70 and Hsp100 chaperones in protein disaggregation. *J Biol Chem* 279: 44376-44383, 2004.