

Chaperons pharmacologiques : un espoir thérapeutique pour les pathologies conformationnelles

Christiane Mendre, Bernard Mouillac

Institut de Génomique Fonctionnelle, CNRS UMR5203, INSERM U661, Universités Montpellier 1 et 2, 141 rue de la cardonille, 34094 Montpellier cedex 05

Christiane.Mendre@igf.cnrs.fr, Bernard.Mouillac@igf.cnrs.fr

Aperçu du sujet :

De nombreuses maladies génétiques ou neurodégénératives sont consécutives à un repliement défectueux de protéines entraînant leur dégradation ou leur accumulation sous forme d'agrégats. Ces maladies sont regroupées sous le terme de "pathologies conformationnelles". Les protéines impliquées n'étant pas correctement repliées, elles sont disqualifiées par le système "contrôle-qualité" cellulaire. En conséquence, elles ne peuvent plus exercer leur rôle physiologique. Des composés spécifiques (ligands, substrats, inhibiteurs) appelés chaperons pharmacologiques, sont capables de se lier à ces protéines défectueuses, de les stabiliser afin de leur permettre d'acquérir une conformation quasi-native, d'échapper au système "contrôle-qualité" et par conséquent de récupérer une fonctionnalité. Ces molécules ont une activité intrinsèque variable : elles peuvent être agonistes (activatrices), antagonistes (inhibitrices) ou modulateurs allostériques de leurs récepteurs, canaux ioniques ou enzymes cibles. Les chaperons pharmacologiques représentent donc un espoir thérapeutique pour des maladies rares comme la mucoviscidose, certaines rétinites pigmentaires, le diabète insipide néphrogénique, la maladie de Fabry ou de Gaucher, mais aussi pour certains cancers et des pathologies du système nerveux plus fréquentes et très invalidantes comme la maladie d'Alzheimer ou de Parkinson.

Mots-clefs: chaperons pharmacologiques, maladies conformationnelles, repliement des protéines, agonistes, antagonistes, modulateurs allostériques.

Pharmacological chaperones : a potential therapeutic treatment for conformational diseases

Summary:

Many genetic and neurodegenerative diseases in humans result from protein misfolding and/or aggregation. These diseases are named conformational diseases. As a result, the misfolded non functional proteins are rejected and misrouted by the cellular quality control system, and cannot play their endogenous physiological roles. Specific compounds (ligands, substrates or inhibitors) known as pharmacological chaperones are able to bind and stabilize these misfolded proteins. Their interaction allows the target proteins to escape the quality control system and to be functionally rescued. These pharmacochaperones may possess different intrinsic activity : they can be antagonists (inhibitors), agonists (activators) or allosteric modulators of the target receptors, ionic channels or enzymes. Pharmacological chaperones have obviously a therapeutic potential to treat rare diseases like cystic fibrosis, retinitis pigmentosa, nephrogenic diabetes insipidus, Fabry disease, Gaucher disease, but also for cancers and more frequent and highly invalidant neurodegenerative disorders such as Alzheimer's disease or Parkinson's disease.

Keywords: pharmacological chaperones, conformational diseases, protein folding, agonists, antagonists, allosteric modulators

Repliement défectueux des protéines et pathologies associées

Pour qu'une protéine soit active, elle doit acquérir une structure tridimensionnelle unique dite "native" qui correspond à l'état énergétique le plus stable. Cette étape de repliement qui dépend de la séquence en acides aminés de la protéine elle-même et de l'environnement cellulaire local est cruciale et peut s'effectuer de façon coordonnée à la synthèse de la protéine considérée. Le repliement des protéines prend place dans trois compartiments cellulaires, le cytoplasme, le réticulum endoplasmique (RE) et les mitochondries. Nous nous limiterons dans cette revue au cas des protéines repliées dans le RE, point de départ de la voie de sécrétion des protéines vers le milieu extracellulaire, de l'export des protéines vers la membrane plasmique ou du ciblage vers d'autres compartiments membranaires impliqués dans la sécrétion ou l'endocytose [1,2]. Le RE est le siège d'un système "contrôle-qualité" des protéines constitué de nombreux chaperons moléculaires et d'enzymes. Le rôle de ceux-ci est de reconnaître les protéines incomplètement ou mal repliées, de catalyser leur repliement efficace à travers plusieurs étapes, par exemple l'établissement de ponts disulfures ou l'accrochage de chaînes glycosylées, et de les assembler si nécessaire [1,2]. Ces chaperons moléculaires sont endogènes à la cellule [3], par opposition aux chaperons chimiques ou pharmacologiques que nous définirons plus loin. Une fois les protéines synthétisées et correctement repliées, elles rejoignent le compartiment cellulaire dans lequel elles jouent leur rôle physiologique, par exemple la membrane pour des récepteurs ou des canaux ioniques, le lysosome pour de nombreuses enzymes du métabolisme, le milieu extracellulaire pour des protéines sécrétées (anticorps par exemple). Si une protéine n'acquiert pas sa structure native malgré l'action du système contrôle-qualité, elle est dirigée vers le cytoplasme à travers le translocon et dégradée par le protéasome [4]. Dans ce cas, la protéine ne pouvant pas exercer son rôle physiologique, on parle de "perte de fonction". D'autres molécules, mal repliées, s'accumulent dans les cellules ou dans les compartiments extracellulaires, forment des agrégats tels que ceux du peptide β -amyloïde responsable de la maladie d'Alzheimer. On parle alors de "gain de fonction", ce qui peut paraître paradoxal puisqu'en général cette accumulation de protéines inactives a des conséquences cellulaires toxiques. Dans certains cas, une perte de fonction et un gain de fonction peuvent agir de concert pour provoquer un état pathologique (la rétinite pigmentaire par exemple, voir plus loin).

Les maladies qui nous intéressent dans cette revue sont associées à un repliement déficient de certaines protéines consécutif à la présence de mutations sur les gènes correspondants de ces protéines. Ces mutations sont transmissibles de génération en génération ou acquises spontanément. Ces maladies sont nommées pathologies "conformationnelles" [5,6]. Nous exposerons dans une première partie quelques exemples représentatifs (voir le Tableau 1 pour une liste plus exhaustive) qui mettent en cause des protéines majeures de la signalisation ou du métabolisme, comme des canaux ioniques, des enzymes et des récepteurs membranaires. Le traitement potentiel de ces pathologies conformationnelles par des chaperons pharmacologiques est abordé dans une deuxième partie.

Canaux ioniques

La *mucoviscidose* est une maladie génétique affectant les épithéliums glandulaires de nombreux organes [7]. C'est la maladie génétique létale à transmission autosomique récessive la plus fréquente dans les populations de type européen (pour une recherche sur les maladies rares, se connecter sur <http://www.orpha.net>). Elle est liée à des mutations du gène CFTR (pour *cystic fibrosis transmembrane conductance regulator*) sur le chromosome 7, entraînant une altération de la protéine CFTR. Cette protéine est un canal ionique perméable au chlore dont la fonction est de réguler le transport du chlore à travers les membranes cellulaires. La

mutation la plus fréquente de CFTR est une délétion du résidu amino-acide phénylalanine 508 (mutant $\Delta F508$) [8]. Ce mutant retenu dans le RE, n'est pas exporté à la surface cellulaire et est finalement dégradé par le protéasome. Le dysfonctionnement de CFTR par perte de fonction provoque une augmentation de la viscosité du mucus et son accumulation dans les voies respiratoires et digestives.

Enzymes

Des pathologies conformationnelles se développent suite à la mutation d'enzymes impliquées à différentes étapes du métabolisme cellulaire. C'est le cas des maladies de Fabry et de Gaucher, toutes deux relatives à une déficience en enzymes lysosomiales.

La *maladie de Fabry* est une pathologie héréditaire du métabolisme des glycosphingolipides, de transmission récessive liée au chromosome X, dont la caractéristique est un déficit en α -galactosidase A [9]. Le défaut enzymatique conduit à l'accumulation du substrat non dégradé dans les tissus et le plasma. Plusieurs mutations ponctuelles du gène de l' α -galactosidase A ont été décrites (R301Q ou Q279E par exemple) ainsi que des délétions [10]. Toutes conduisent à une dégradation précoce de la protéine qui n'est pas ciblée vers le compartiment lysosomal. Dans sa forme classique, l'affection touche plus sévèrement les hommes hémizygotés, chez qui les signes cliniques débutent dans l'enfance par des douleurs des extrémités et des signes dermatologiques (angiokératomes). Par la suite, se développe une maladie de surcharge multiviscérale avec des symptômes cardiaques (hypertrophie ventriculaire gauche), neurologiques (accidents vasculaires cérébraux), ORL (hypoacousie) et rénaux (protéinurie, insuffisance rénale).

La *maladie de Gaucher* est une maladie de surcharge lysosomiale due à un déficit enzymatique en glucocérébrosidase (aussi appelée glucosylcéramidase ou β -glucosidase acide) [11]. C'est une maladie génétique à transmission autosomique récessive, due à une mutation du gène de la glucocérébrosidase sur le chromosome 1. La mutation la plus fréquente est N370S [12]. La maladie est caractérisée par des dépôts de glucosylcéramide (ou glucocérébroside) dans les cellules du système réticulo-endothélial du foie, de la rate et de la moelle osseuse. La manifestation la plus classique, le type 1, chronique, non neurologique, concerne 95% des cas. Il s'agit d'une forme hétérogène associant organomégalie (rate, foie), atteinte osseuse (douleurs, infarctus osseux, ostéonécrose) et cytopénies (thrombopénie, anémie et plus rarement neutropénie).

Récepteurs

Beaucoup de maladies conformationnelles sont liées à une perte de fonction de récepteurs membranaires de la famille des récepteurs couplés aux protéines G (RCPGs) [13]. Ils constituent le groupe de cibles thérapeutiques le plus important, ce qui n'est pas surprenant puisque leurs gènes représentent 2 à 3 % des gènes totaux d'une cellule. Leur rôle est de convertir un signal extracellulaire (hormones, neurotransmetteurs, molécules sensorielles, etc...) en message intracellulaire (phénomène de transduction du signal), et sont impliqués dans la plupart des fonctions physiologiques. Comme les autres familles de protéines membranaires intégrales (canaux, transporteurs), ils sont soumis de façon très stricte au système contrôle-qualité du RE, afin d'être repliés correctement avant de s'engager dans la voie de sécrétion et rejoindre la membrane plasmique, compartiment dans lequel ils jouent leur rôle. Des mutations naturelles de ces récepteurs, reconnues par le système contrôle-qualité du RE, provoquent le rejet de ces protéines vers le protéasome ou leur accumulation sous forme d'agrégats. Plusieurs RCPGs mutés sont donc responsables de maladies génétiques bien définies (voir Tableau 1).

Nous illustrerons ici trois exemples, la forme autosomale dominante de la rétinite pigmentaire (RP), le diabète insipide néphrogénique congénital (DINc) et l'hypogonadisme hypogonadotrope (HH).

La **rétinite pigmentaire** est la cause la plus commune de cécité, elle se caractérise d'abord par une perte de vision périphérique et de vision de nuit pour ensuite évoluer vers une perte de vision globale [14]. Plus de 150 mutations différentes du gène de la rhodopsine ont été identifiées et représentent à peu près 15% des dégénérescences rétiniennes génétiquement transmissibles. La mutation la plus fréquente est P23H. Dans ce cas précis, la RP semble liée à une perte de fonction et conjointement à un phénomène de saturation de la maturation, du transport et de la dégradation de la rhodopsine qui s'accumule dans la cellule (exemple de synergie entre perte et gain de fonction). Dans des systèmes cellulaires hétérologues de laboratoire, les mutants de la rhodopsine n'atteignent pas la membrane plasmique et s'accumulent dans le RE et l'appareil de Golgi.

Le **diabète insipide néphrogénique congénital** est une maladie génétique rénale rare causée dans 90% des cas par des mutations du récepteur V2 (V2R) de la vasopressine (forme liée au chromosome X, les 10% des cas restants étant liés à des mutations du canal à eau, l'aquaporine-2) [15]. Pour information, plus de 200 mutations différentes du V2R ont été décrites. La plupart provoquent la séquestration du V2R dans le RE qui n'est donc pas ciblé à la membrane plasmique. Les patients atteints de cette pathologie ne sont pas capables de concentrer leurs urines en réponse à la vasopressine, et sont caractérisés par une polyurie (jusqu'à 15 litres d'urine par jour). Une hypernatrémie et une polydipsie sont également des signes caractéristiques. Les malades sont donc soumis à des épisodes répétés de déshydratation, ce qui peut entraîner chez les jeunes enfants un retard de croissance et un retard mental. Le DINc est un exemple caractéristique de maladie conformationnelle "perte de fonction". Il évolue vers une insuffisance rénale si les épisodes de déshydratation sont trop fréquents ou suite à une néphropathie de reflux due au débit urinaire considérable.

Enfin, **l'hypogonadisme hypogonadotrope** est caractérisé par l'impossibilité des cellules gonadotropes de l'hypophyse antérieure de répondre à une stimulation par l'hormone GnRH (Gonadotropin-Releasing Hormone) libérée par les neurones de l'hypothalamus [16]. Le HH est lié à des mutations du récepteur de la GnRH. Plus de 20 ont été identifiées. La majorité des mutations entraîne une rétention du récepteur GnRH dans le RE. En conditions physiologiques, les cellules gonadotropes répondent à cette stimulation par une libération d'hormones LH et FSH qui régulent la stéroïdogénèse au niveau des organes génitaux. Si cette régulation n'est pas efficace, il en résulte une défaillance du système de reproduction. Le HH n'étant pas incompatible avec la vie, il est probable que beaucoup de patients atteints de cette maladie (en particulier ceux présentant un phénotype partiel) ne soient pas diagnostiqués.

Chaperons chimiques et pharmacologiques

Extrêmement efficace dans la plupart des cas, le système contrôle-qualité du RE peut se révéler "trop" parfait. Des mutations qualifiées de mineures ne compromettant pas la fonctionnalité des protéines impliquées provoquent cependant leur déroutage, leur dégradation et conduisent à l'établissement d'une maladie conformationnelle de type "perte de fonction". Elles peuvent aussi mener à l'accumulation de la protéine cible et dans ce cas à une pathologie conformationnelle "gain de fonction". La compréhension de ce phénomène est cruciale car elle entrouvre immédiatement une opportunité thérapeutique de corriger le défaut de ciblage de la protéine mutante et de proposer un "sauvetage" ou une récupération de fonction, et donc *in fine* d'anticiper un traitement potentiel de la maladie en question. La première évidence suggérant que le système contrôle-qualité du RE pouvait être "manipulé"

vient d'études effectuées sur le canal chlore CFTR impliqué dans la mucoviscidose. Une baisse de la température de croissance des cellules exprimant le mutant CFTR le plus fréquent, $\Delta F508$, augmente le nombre de canaux fonctionnels à la membrane plasmique. Ce résultat fut interprété comme un effet cinétique, en l'occurrence un ralentissement du procédé de repliement de la protéine, favorisant le sauvetage du mutant $\Delta F508$. A partir de cette observation, les effets de petits composés chimiques, tels que le diméthylsulfoxyde (DMSO, solvant organique), le glycérol ou le triéthylamine N-oxyde (TMAO, tous deux définis comme osmolytes cellulaires), connus pour stabiliser la conformation native de plusieurs protéines contre la dénaturation thermique ou chimique, furent testés. Les effets sur le mutant $\Delta F508$ ont été très probants, puisque la maturation de la protéine et son "échappement" du système contrôle-qualité furent très efficaces [17]. Le mécanisme d'action de ces molécules n'est pas complètement compris: on pense qu'elles stabilisent une conformation protéique quasi-native, et donc favorisent le ciblage des mutants vers le compartiment cellulaire dans lequel ils exercent leur fonction. Le glycérol par exemple, augmente la stabilité des protéines en diminuant la surface accessible de celles-ci vis-à-vis du milieu aqueux. Ces molécules sont collectivement appelées **chaperons chimiques**. Aujourd'hui, l'action bénéfique de ces chaperons chimiques a été démontrée *in vitro* non seulement vis-à-vis du CFTR mais aussi d'autres protéines telles que l' $\alpha 1$ -antitrypsine, l'ATPase MNK, l' α -galactosidase, la p53, le récepteur SUR1, l'aquaporine-2, des RCPGs. Cependant, dans toutes ces études, des concentrations très élevées de ces chaperons chimiques, en général micromolaires, sont nécessaires pour entraîner un effet, et leur manque de spécificité empêche toute utilisation thérapeutique dans le cadre d'essais cliniques. Par analogie, des peptides cationiques tels que la pénétratine, qui entrent dans les cellules par un phénomène d'endocytose, possèdent la capacité de cibler vers la membrane plasmique des mutants du récepteur V2 responsables d'un DINC retenus dans des compartiments post-ER (Ergic par exemple) [18]. Là-aussi, des concentrations micromolaires sont nécessaires et la notion de spécificité d'action vis-à-vis de la protéine cible n'est pas présente. Comme pour les chaperons chimiques, le mécanisme d'action précis n'est pas connu. Cependant, ces peptides cationiques entraînent une augmentation cytosolique de calcium et donc modulent l'activité dépendante du calcium de certains chaperons moléculaires du système contrôle-qualité cellulaire [18].

L'utilisation de chaperons chimiques a conduit naturellement les scientifiques à rechercher des molécules spécifiques pour mettre au point des traitements thérapeutiques des maladies conformationnelles chez l'homme. L'idée vient tout d'abord d'une étude réalisée à l'aide de mutations artificielles du gène de résistance multidrogues codant pour un transporteur membranaire appelé P-glycoprotéine 1 (MDR1) qui interagit avec une panoplie d'agents cytotoxiques [19]. Les mutants de MDR1 sont retenus dans le RE, mais un traitement à l'aide de substrats (vinblastine et capsaïcine) ou d'inhibiteurs (cyclosporine et verapamil) du transporteur permet une maturation et un ciblage de MDR1 à la membrane plasmique ainsi qu'une récupération de fonction. Les auteurs de ce travail proposèrent que l'occupation du site actif par des composés spécifiques pourrait stabiliser un état conformationnel quasi-natif accepté par le système contrôle-qualité du RE. Le mécanisme qui implique une liaison de composés pharmacologiques (substrats, inhibiteurs) à des mutants mal repliés de protéines pour les stabiliser est similaire à celui des chaperons chimiques mais fait intervenir un paramètre crucial, celui de la spécificité d'action. La notion de **chaperons pharmacologiques** apparaît réellement à ce moment-là. Cette notion est basée sur l'idée que des ligands de récepteurs connus pour stabiliser une conformation spécifique (active, inactive) pourraient être utilisés comme chaperons pharmacologiques vis-à-vis de mutants de RCPGs séquestrés dans le RE et responsables de maladies génétiques. Cette hypothèse fut couronnée de succès par l'utilisation d'antagonistes non-peptidiques du récepteur V2 de la vasopressine dans le cadre de l'étude de mutations responsables du DINC, par exemple le mutant V2R $\Delta 62$ -

64 (délétion des résidus amino-acides 62 à 64) [20]. Ces antagonistes (ou agonistes inverses, voir définition plus bas), tels que le SR121463, le SR49059, ou le VPA985, capables de traverser les membranes cellulaires du fait de leur nature chimique hydrophobe, ont permis une maturation des mutants testés, leur ciblage à la membrane plasmique et une récupération de fonction, en l'occurrence leur activation par la vasopressine et leur capacité à se coupler à la protéine Gs et à produire de l'AMPc (adénosine monophosphate, signal intracellulaire). Ces effets ne peuvent pas être reproduits à l'aide d'antagonistes peptidiques incapables de traverser les membranes cellulaires. La stratégie des pharmacochaperons a été appliquée depuis à de nombreuses protéines responsables de plusieurs maladies conformationnelles, mais il s'agit pour l'instant d'études cellulaires *in vitro* (voir Tableau 2 et Figure 1). De par leur spécificité d'action, les pharmacochaperons exercent leur activité à des concentrations nanomolaires [21-23], ce qui est un avantage supplémentaire par rapport aux chaperons chimiques utilisés à des concentrations cent à mille fois plus élevées. L'utilisation de chaperons pharmacologiques *in vivo* chez l'homme est très récente. Une étude a été réalisée chez des patients humains atteints de DINC et a montré que l'administration d'un antagoniste des récepteurs de la vasopressine (SR49059) permettait de diminuer fortement le volume urinaire et la prise d'eau [21]. C'est à ce jour le seul exemple publié d'application de chaperons pharmacologiques chez l'homme, mais il est extrêmement prometteur. La stratégie est reproduite aujourd'hui pour d'autres maladies conformationnelles, en particulier pour le traitement des maladies de Fabry et de Gaucher.

Caractéristiques des chaperons pharmacologiques

Antagonistes (et agonistes inverses)

La grande majorité des chaperons pharmacologiques de RCPGs décrits aujourd'hui sont des antagonistes (inhibiteurs de récepteurs) et des agonistes inverses (classés tout d'abord comme des antagonistes, ces composés sont capables de diminuer le niveau basal d'activité de leurs récepteurs spécifiques). Pour l'hypogonadisme hypogonadotrope décrit dans la première partie, il existe par exemple au moins quatre classes chimiques d'antagonistes pharmacochaperons du récepteur de l'hormone GnRH (voir Tableau 2); indoles, quinolones, macrolides dérivés de l'érythromycine, thieno[2,3-b]pyrimidine-2,4-diones [16]. Dans le cas de la rétinite pigmentaire, plusieurs antagonistes (agonistes inverses) pharmacochaperons ont été testés; 9-*cis*-retinal, 11-*cis*-retinal et 11-*cis*-7-ring retinal [24]. Aujourd'hui, peu d'agonistes pharmacochaperons (activateurs des récepteurs) sont décrits, même si de nombreuses molécules possèdent intrinsèquement cette propriété [25]. D'un point de vue général, ces différentes catégories de chaperons pharmacologiques possèdent la capacité de traverser les membranes cellulaires pour atteindre leurs protéines cibles bloquées dans le RE ou dans un autre compartiment intracellulaire (Figure 1). Ces molécules sont donc plutôt de nature lipophile, et leur activité de pharmacochaperon ne peut pas être reproduite par des ligands non-perméants. La récupération de fonction d'une protéine mutante dépend bien sûr de la mutation elle-même et de l'effet général qu'elle provoque sur la conformation globale. Mais de façon intéressante, il existe une corrélation entre affinité (force d'interaction) du chaperon pharmacologique pour le récepteur et la récupération de fonction. Plus l'affinité est forte, plus l'effet est important. Ce n'est pourtant pas un critère avantageux pour les antagonistes et les agonistes inverses. En effet, en ce qui concerne un chaperon pharmacologique antagoniste ou agoniste inverse, la récupération de fonction est un équilibre subtil entre la force du caractère chaperon et la possibilité d'être déplacé par le ligand endogène naturel activateur du récepteur. C'est tout le paradoxe de ces ligands qui permettent un ciblage des récepteurs mutants à la surface cellulaire mais qui sont dans l'impossibilité de stimuler directement la protéine dont ils sont inhibiteurs. Il semblerait donc que les chaperons

pharmacologiques antagonistes et agonistes inverses possédant une affinité modérée pour leur cible soient plus appropriés pour envisager un traitement thérapeutique. Un exemple qui illustre bien ce concept est celui de l'antagoniste SR49059 non spécifique du récepteur V2 (mais spécifique du récepteur V1a de la vasopressine) et pour lequel il a une affinité très moyenne. Cependant, ce ligand est capable de cibler des mutants du V2R à la surface cellulaire et d'induire un effet antidiurétique chez des malades atteints du DINc [21].

Agonistes

Dans cette logique, les chaperons pharmacologiques agonistes seraient donc plus prometteurs puisqu'ils combinent la capacité de cibler les récepteurs mal repliés à la surface et celle de les stimuler directement (Figure 1). Dans ce cas, une forte affinité est un avantage, et ils peuvent remplacer avantageusement le ligand naturel activateur. Mais les agonistes présentent aussi des inconvénients. Au cours de leur liaison avec le récepteur cible, ils provoquent son activation mais également son internalisation *via* une interaction avec une protéine régulatrice, l'arrestine. L'internalisation est un phénomène d'endocytose qui régule le nombre de récepteurs à la surface cellulaire et donc le niveau du signal intracellulaire. Une fois le récepteur internalisé, il n'est plus accessible au ligand activateur. Ce phénomène conduit à l'arrêt progressif de la réponse cellulaire (appelé aussi processus de désensibilisation). Des agonistes du récepteur δ -opioïde (δ OR) et d'un mutant artificiel de cette protéine (D95A) possédant une activité de pharmacochaperon ont été décrits, mais ils ont également la capacité à induire l'internalisation du δ OR *via* l'arrestine [25].

Agonistes biaisés

La découverte très récente d'agonistes biaisés du V2R (MCF14, MCF18, MCF57) offre une nouvelle opportunité thérapeutique du DINc [22]. Un agoniste biaisé est une molécule qui ne possède qu'une partie des propriétés pharmacologiques du ligand activateur endogène. En l'occurrence, les chaperons pharmacologiques MCF14, MCF18 et MCF57 de plusieurs mutants du V2R sont des activateurs du récepteur parce qu'ils provoquent l'activation de la protéine Gs, mais n'entraînent pas son internalisation du fait de leur propriété antagoniste vis-à-vis du recrutement de l'arrestine (Figure 1). Ils offrent donc un avantage certain par rapport aux agonistes classiques et aux antagonistes, tout en ayant une affinité forte vis-à-vis du V2R. La combinaison de ces caractéristiques semble idéale pour traiter les patients du DINc puisque ces molécules induisent effectivement le ciblage de mutants du V2R à la surface cellulaire [22]. Ces composés devraient permettre *a priori* une activation soutenue et durable dans le temps des V2R mutés puisque ceux-ci ne sont pas internalisés. On peut imaginer, même si cela reste à démontrer, un traitement par voie orale peu contraignant pour les malades et espérer une régulation efficace de la diurèse.

Modulateurs allostériques

Enfin, il nous faut citer une dernière catégorie de molécules, les modulateurs allostériques, qui pourraient également se révéler des chaperons pharmacologiques tout aussi prometteurs. Un modulateur allostérique se fixe sur sa protéine cible de façon spécifique, mais dans un site d'interaction différent de celui du substrat naturel (pour les enzymes) ou du ligand endogène (pour les récepteurs ou les canaux ioniques). Par sa liaison à la protéine, il entraîne un changement de conformation qui peut avoir une influence positive ou négative sur la liaison de celle de l'activateur (ligand, substrat), sur la capacité de la protéine à produire un effet biologique, ou sur les deux (Figure 1). Il n'y a qu'un exemple aujourd'hui de modulateur allostérique combinant également l'activité de chaperon pharmacologique. Cette molécule est spécifique du récepteur de l'hormone FSH [26]. Celle-ci en se fixant sur son récepteur participe à la régulation de la maturation des follicules ovariens chez la femme et contrôle la

spermatogénèse chez l'homme. Plusieurs mutations du récepteur FSH ont été découvertes et provoquent des troubles endocriniens. La mutation A189V bloque le récepteur dans le RE et empêche son ciblage à la membrane plasmique. Un composé activateur spécifique du récepteur a été découvert, mais n'est pas un ligand compétiteur de l'hormone naturelle. Ce composé (Org41841, famille des thienopyr(im)idines) permet l'acheminement du récepteur mutant à la surface cellulaire où il peut être activé et mener à une réponse de la cellule. Dans ce cas, Org41841 et FSH agissent de concert, Org41841 favorisant l'activité de l'hormone FSH. Ce type de molécule possède donc des caractéristiques tout à fait particulières, c'est un modulateur allostérique positif avec une activité de chaperon pharmacologique.

Perspectives

Le concept de chaperon pharmacologique découle directement de l'idée que toute mutation dans une protéine n'entraîne pas obligatoirement une perte de fonction à condition que le défaut mineur puisse être "sélectivement compensé". En effet, beaucoup de protéines mutées sont potentiellement actives, mais sont tout simplement rejetées par le système contrôle-qualité du RE et ne sont pas exportées dans leur compartiment cellulaire final. Le nombre croissant d'exemples qui démontrent que les chaperons pharmacologiques facilitent le repliement et la maturation de leurs protéines cibles, dans des systèmes cellulaires, dans des souris ou chez des patients, suggère fortement que cette stratégie thérapeutique puisse se généraliser à une majorité de maladies conformationnelles. Il faut ajouter que les chaperons pharmacologiques sont des outils thérapeutiques prometteurs vis-à-vis des pathologies conformationnelles "perte de fonction" mais aussi "gain de fonction" en prévenant l'agrégation des protéines mal repliées. De plus, le fait qu'un chaperon pharmacologique permette une récupération de fonction de plusieurs mutants d'une même protéine spécifique devrait simplifier le développement de médicaments ou drogues utiles pour traiter les maladies conformationnelles. En d'autres termes, il n'est pas nécessaire de développer un médicament chaperon pharmacologique pour chaque mutation (chaque patient). Cette perspective est importante et devrait inciter les industriels à s'investir plus dans la mise au point de ces molécules.

De façon intéressante, les chaperons pharmacologiques agissent sur des protéines qui sont pour nombre d'entre elles des cibles thérapeutiques majeures (récepteurs, canaux, transporteurs, enzymes). De multiples ligands avec une forte affinité et sélectivité sont déjà identifiés ou en développement. Ces ligands sont des pharmacochaperons en devenir, à la condition qu'ils soient capables de traverser les membranes cellulaires pour atteindre leurs cibles bloquées dans le RE ou dans d'autres compartiments (Ergic, Golgi). Les futures campagnes de criblage de chaperons pharmacologiques devront donc se baser sur des chimiothèques déjà disponibles et dont les cibles sont bien définies. La recherche d'agonistes biaisés et de modulateurs allostériques positifs sera particulièrement attractive. Le fait que de très nombreuses molécules soient déjà en développement, même si leur caractère pharmacochaperon n'est pas pour l'instant la propriété thérapeutique mise en avant, est vraiment un avantage. Malgré la réticence des compagnies pharmaceutiques à mettre sur le marché des médicaments pour les maladies orphelines, ces médicaments à caractère pharmacochaperon potentiel seront de toute façon développés pour des pathologies majeures bien définies. Ils pourraient alors être testés en parallèle sur des patients volontaires atteints de maladies orphelines, lorsque leur processus de développement clinique sera suffisamment avancé (phase III).

Remerciements

Les auteurs remercient Muriel Asari-Gien pour la réalisation iconographique de cet article.

Conflit d'intérêt

Les auteurs déclarent n'avoir aucun conflit d'intérêt concernant les données publiées dans cet article.

Références

1. Ellgaard L, Helenius A. Quality control in the endoplasmic reticulum. *Nature Rev Mol Cell Biol* 2003; 4: 181-91.
2. Anelli T, Sitia R. Protein quality control in the early secretory pathway. *EMBO J* 2008; 27: 315-27.
3. Arrigo AP. Chaperons moléculaires et repliement des protéines. *Med Sci* 2005; 21: 619-25.
4. Tsai B, Ye Y, Rapoport TA. Retro-translocation of proteins from the endoplasmic reticulum into the cytosol. *Nature Rev Mol Cell Biol* 2002; 3: 246-55.
5. Cohen FE, Kelly JW. Therapeutic approaches to protein-misfolding diseases. *Nature* 2003 ; 426 : 905-9.
6. Chaudhuri TK, Paul S. Protein-misfolding diseases and chaperone-based therapeutic approaches. *FEBS J* 2006; 273: 1331-49.
7. Riordan JR. The cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *Annu Rev Physiol* 1993; 55: 609-30.
8. Kerem B, Rommens JM, Buchanan JA, Markiewicz D *et al.* Identification of the cystic fibrosis gene : genetic analysis. *Science* 1989; 245: 1073-1080.
9. Germain DP. La maladie de Fabry : de la découverte des lysosomes à l'avènement de la thérapeutique. *Med Sci* 2005; 21: 5-7.
10. Fan JQ, Ishii S, Asano N, Suzuki Y. Accelerated transport and maturation of lysosomal alpha-galactosidase A in Fabry lymphoblasts by an enzyme inhibitor. *Nature Med* 1999; 5: 112-15.
11. Grabowski GA. Gaucher disease : enzymology, genetics and treatment. *Adv Hum Genet* 1993; 21: 377-441.
12. Sawkar AR, Cheng WC, Beutler E, Wong CH *et al.* Chemical chaperones increase the cellular activity of N370S beta-glucosidase: a therapeutic strategy for Gaucher disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; 99: 15428-33.
13. Conn PM, Ulloa-Aguirre, Ito J, Janovick JA. G protein-coupled receptors trafficking in health and disease : lessons learned to prepare for therapeutic mutant rescue *in vivo*. *Pharmacol Rev* 2007; 59: 225-50.
14. Mendes HF, Van der Spuy J, Chapple JP, Cheetham ME. Mechanisms of cell death in rhodopsin retinitis pigmentosa : implications for therapy. *Trends Mol Med* 2005; 11:177-85.
15. Morello JP, Bichet DG. Nephrogenic diabetes insipidus. *Annu Rev Physiol* 2001; 63: 607-30.
16. Conn PM, Janovick JA. Drug development and the cellular quality control system. *Trends Pharmacol. Sci.* 2009; 30: 228-33.
17. Sato S, Ward CL, Krouse ME, Wine JJ *et al.* Glycerol reverses the misfolding phenotype of the most common cystic fibrosis mutation. *J Biol Chem* 1996; 271: 635-38.
18. Oueslati M, Hermosilla R, Schönenberger E, Oorschot V *et al.* Rescue of a nephrogenic diabetes insipidus-causing vasopressin V2 receptor mutant by cell-penetrating peptides. *J Biol Chem* 2007; 282: 20676-85.

19. Loo TW, Clarke DM. Correction of defective protein kinesis of human P-glycoprotein mutants by substrates and modulators. *J Biol Chem* 1997; 272: 709-12.
20. Morello JP, Salahpour A, Laperrière A, Bernier V et al. Pharmacological chaperones rescue cell-surface expression and function of misfolded V2 vasopressin receptor mutants. *J Clin Invest* 2000; 105: 887-95.
21. Bernier V, Morello JP, Zarruk A, Debrand N et al. Pharmacologic chaperones as a potential treatment for X-linked nephrogenic diabetes insipidus. *J Am Soc Nephrol* 2006; 17: 232-43.
22. Jean-Alphonse F, Perkowska S, Frantz MC, Durroux T et al. Biased agonist pharmacochaperones of the AVP V2 receptor may treat congenital nephrogenic diabetes insipidus. *J Am Soc Nephrol* 2009; 20: 2190-203.
23. Robben JH, Sze M, Knoers NV, Deen PM. Functional rescue of vasopressin V2 receptor mutants in MDCK cells by pharmacochaperones: relevance to therapy of nephrogenic diabetes insipidus. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 2007; 292: F253-F260.
24. Li T, Sandberg MA, Pawlyk BS, Rosner B et al. Effect of vitamine A supplementation on rhodopsin mutants T17M and P347S in transgenic mice and in cell cultures. 1998; 95: 11933-38.
25. Petäjä-Repo UE, Hogue M, Bhalla S, Laperrière A et al. Ligands act as pharmacological chaperones and increase the efficiency of δ opioid receptor maturation. *EMBO J* 2002; 21: 1628-37.
26. Janovick JA, Maya-Nunez G, Ulloa-Aguirre A, Huhtaniemi IT et al. Increased plasma membrane expression of human follicle-stimulating hormone receptor by a small molecule thienopyr(im)idine. *Mol Cell Endocrinol* 2009; 298: 84-88.
27. Carrell RW, Lomas DA, Sidhar S, Foreman R. alpha1-antitrypsin deficiency : a conformational disease. *Chest* 1996; 110: 243S-47S.
28. Foster BA, Coffey HA, Morin MJ, Rastinejad F. Pharmacological rescue of mutant p53 conformation and function. *Science* 1999; 286: 2507-10.
29. Toledo F, Bluteau O, Simeonova I. Réactivation de p53 dans les tumeurs : une stratégie antitumorale prometteuse. *Med Sci* 2007; 23: 565-67.
30. Lam CW, Xie J, To KF, Ng HK et al. A frequent activated smoothed mutation in sporadic basal cell carcinomas. *Oncogene* 1999; 18: 833-36.
31. Partridge CJ, Beech DJ, Sivaprasadarao A. Identification and pharmacological correction of a membrane trafficking defect associated with a mutation in the sulfonylurea receptor causing familial hyperinsulinism. *J Biol Chem* 2001; 276: 35947-52.
32. Pratt EB, Yan FF, Gay JW, Stanley CA et al. Sulfonylurea receptor 1 mutations that cause opposite insulin secretion defects with chemical chaperone exposure. *J Biol Chem* 2009; 284: 7951-59.
33. Kim BE, Smith K, Meagher CK, Petrisd MJ. A conditional mutation affecting localization of the Menkes disease copper ATPase ; suppression by copper supplementation. *J Biol Chem* 2002; 277: 44079-84.
34. Liu X, Garriga P, Khorana HG. Structure and function in rhodopsin : correct folding and misfolding in two point mutants in the intradiscal domain of rhodopsin identified in retinitis pigmentosa. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93: 4554-59.
35. Fuchs S, Amiel J, Claudel S, Lyonnet S et al. Functional characterization of three mutations of the endothelin B receptor gene in patients with Hirshsprung's disease : evidence for selective loss of Gi coupling. *Mol Med* 2001; 7: 115-24.
36. Lubrano-Berthelie C, Dubern B, Lacorte JM, Picard F et al. Melanocortin 4 receptor mutations in a large cohort of severely obese adults : prevalence, functional

- classification, genotype-phenotype relationship, and lack of association with binge eating. *J Clin Endocrinol Metab* 2006; 91: 1811-18.
37. Clark AJL, Metherell LA, Cheetham ME, Huebner A. Inherited ACTH insensitivity illuminates the mechanisms of ACTH action. *Trends Endocrinol. Metab.* 2005; 16: 451-57.
 38. Samson M, Libert F, Doranz BJ, Rucker J *et al.* Resistance to HIV-1 infection in caucasian individuals bearing mutant alleles of the CCR-5 chemokine receptor gene. *Nature* 1996; 382: 722-25.
 39. Tfelt-Hansen J, Brown EM. The calcium-sensing receptor in normal physiology and athophysiology : a review. *Crit. Rev. Clin. Lab. Sci.* 2007; 42: 35-70.
 40. Biebermann H, Schoneberg T, Krude H, Schultz G *et al.* Mutations of the human thyrotropin receptor gene causing thyroid hypoplasia and persistent congenital hypothyroidism. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 1997; 82: 3471-80.
 41. Themmen APN, Martens JWM, Brunner HG. Activating and inactivating mutations in LH receptors. *Mol. Cell. Endocrinol.* 1998; 145: 137-42.
 42. Aittomäki KJ, Lucena LD, Pakarinen P, Sistonen P *et al.* Mutation in the follicle-stimulating hormone receptor gene causes hereditary hypergonadotropic ovarian failure. *Cell* 1995; 82: 959-68.
 43. Beaumont KA, Newton RA, Smit DJ, Leonard JH *et al.* Altered cell surface expression of human MCR1 variant receptor alleles associated with red hair and skin cancer risk. *Hum. Mol. Genet.* 2005; 14: 2145-54.
 44. Noorwez SM, Malhotra R, McDowell JH, Smith KA *et al.* Retinoids assist the cellular folding of the autosomal dominant retinitis pigmentosa opsin mutant P23H. *J Biol Chem* 2004; 279: 16278-84.
 45. Lees AJ, Hardy J, Revesz T. Parkinson's disease. *Lancet* 2009; 373: 2055-66.
 46. Sacchetini JC, Kelly JW. Therapeutic strategies for human amyloid diseases. *Nature Rev Drug Discov* 2002; 1: 267-75.
 47. Kobayashi H, Ogawa K, Yao R, Lichtarge O *et al.* Functional rescue of beta-adrenoceptor dimerization and trafficking by pharmacological chaperones. *Traffic* 2009; 10: 1019-33.
 48. Stanton BZ, Peng LF. Small molecule modulators of the Sonic Hedgehog signalling pathway. *Mol. Biosyst.* 2010; 6: 44-54.
 49. Pey AL, Ying M, Cremades N, Velazquez-Campoy A *et al.* Identification of pharmacological chaperones as potential therapeutic agents to treat phenylketonuria. *J. Clin. Invest.* 2008; 118: 2858-67.
 50. Asano N, Ishii S, Kizu H, Ikeda K *et al.* In vitro inhibition and intracellular enhancement of lysosomal alpha-galactosidase A activity in Fabry lymphoblasts by 1-deoxygalactonojirimycin and its derivatives. *Eur. J. Biochem.* 2000; 267: 4179-86.
 51. Loo TW, Bartlett MC, Wang Y, Clarke DM. Rescue of deltaF508 and other misprocessed CFTR mutants by a novel quinazoline compound. *Mol. Pharmacol.* 2005; 2: 407-13.
 52. Korth C, May BC, Cohen FE, Prusiner SB. Acridine and phenothiazine derivatives as pharmacotherapeutics for prion disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2001; 98: 9836-41.
 53. Sigurdsson EM, Permanne B, Soto C, Wisniewski T *et al.* In vivo reversal of amyloid-beta lesions in rat brain. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 2000; 59: 11-17.
 54. Heiser V, Scherzinger E, Boeddrich A, Nordhoff E *et al.* Inhibition of huntingtin fibrillogenesis by specific antibodies and small molecules : implications for huntington's disease therapy. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2000; 97: 6739-44.

Tableau 1: Quelques exemples de pathologies conformationnelles, protéines et mutations impliquées. *La colonne de ce tableau indique le nombre de mutations différentes responsables de la maladie considérée, ainsi que la ou les mutations les plus fréquentes.

Maladie / Anomalie	Protéine déficiente	Mutation*	Référence
<u>Repliement inefficace et dégradation</u>			
mucoviscidose	canal CFTR	>1500, Δ F508	[8]
Gaucher	β -glucosidase acide	>200, N370S	[11,12]
Fabry	α -galactosidase A	>200, R301Q, Q279E	[9,10]
Déficience en α 1-antitrypsine	α 1-antitrypsine	>90, E342K, E264V	[27]
cancer	p53	>1500, V143A, G245S, R249S	[28,29]
	Smo	>20, W535L	[30]
Hyperinsulinémie	récepteur sulfonylurée SUR1	>150, R1394H, R74W, E128K	[31,32]
Menkes	ATPase MNK	>12, G1019D	[33]
Diabète insipide néphrogénique	récepteur V2 de la vasopressine	>200, L44P, Y128S, A294P, R337X	[20,22]
Diabète insipide néphrogénique	aquaporine-2	>30, T126M, A147T, R187C	[15]
Hypogonadisme hypogonadotrope	récepteur du GnRH	>20, R139H, C200Y, Y284C	[16]
Rétinite pigmentaire	rhodopsine	>150, G188R	[34]
Hirschsprung	récepteur endothéline ETB	>20, C109R, W276C, S390R, P383L	[35]
Obésité	récepteur mélanocortine MC4	>80, C84R, W174C	[36]

Déficit en glucocorticoïdes	récepteur corticotropine MC2 ou ACTHR	>35, G166V, R137W, R146H, Y254C	[37]
Résistance à l'infection VIH	récepteur chimiokines CCR5	>20, CCR5Δ32, C178R	[38]
Hypercalcémie hypocalciurique Hyperparathyroïdisme	récepteur sensible au calcium (CaSR)	>60, L13P, E297K	[39]
Hypothyroïdisme congénital	récepteur de l'hormone de stimulation de la thyroïde (TSHR)	>30, I167N, L252P, T477I	[40]
Pseudohermaphroditisme masculin Hypogonadisme hypergonadotrope	récepteur de l'hormone lutéinisante (LHR)	>25, V144F, A593P	[41]
Arrêt de la maturation des follicules ovariens chez la femme, arrêt de la spermatogénèse chez l'homme	récepteur de l'hormone folliculaire (FSHR)	>10, A189V, P519T	[42]
Anomalies de la peau et des cheveux	récepteur mélanocortine MC1	>60, R151C, R160W	[43]
<u>Repliement inefficace et agrégation</u>			
Rétinite pigmentaire	rhodopsine	>150, P23H	[44]
Parkinson	α-synucléine	3, A30P, A53T E46K	[45]
Alzheimer	β-amyloïde, préséniline 1 et 2 α2-macroglobuline	mutations ponctuelles et délétions	[46]

Tableau 2 : Chaperons pharmacologiques et protéines cibles

protéines cibles	chaperons pharmacologiques spécifiques	référence
<u>RCPGs</u>		
Rhodopsine	<u>Antagonistes</u> : 9- <i>cis</i> -retinal, 11- <i>cis</i> -retinal, 11- <i>cis</i> -7-ring retinal	[24]
V2	<u>Antagonistes</u> : SR121463, SR9059, VPA985, YM087, OPC41061, OPC31260 <u>Agonistes biaisés</u> : MCF14, MCF18, MCF57	[20-23]
GnRHR	<u>Antagonistes</u> : indoles, quinolones, macrolides dérivé de l'érythromycine, thieno[2,3- <i>b</i>]pyrimidine-2,4-diones	[16]
Récepteur δ -opioïde (δ OR)*	<u>Antagonistes</u> : naltrexone, naltriben, naltrindole, naltrindole, naloxone <u>Agonistes</u> : buprenorphine, TAN-67, SNC-80, bremazocine, tonazocine, nalbuphine	[25]
Récepteur β 1-adrénergique**	<u>Antagonistes</u> : alprenolol, carvedilol, labetolol, propranolol	[47]
FSHR	<u>Modulateur allostérique</u> : dérivé thienopyr(im)idine (Org41841)	[26]
<u>Autres protéines</u>		
p53	ellipticine, CP-321398, PRIMA-1	[28]
Smo	cyclopamine, GDC-0449	[48]
MDR1	vinblastine, capsaïcine, cyclosporine, verapamil	[19]
Phenylalanine hydroxylase	3-amino-2-benzyl-7-nitro-4-(2-quinolyl)-1,2-dihydroisoquinolin-1-one	[49]
β -glucosidase acide	N-(n-nonyl)deoxynojirimycine	[12]
α -galactosidase A	galactonojirimycine	[50]
CFTR	VRT-325 (quinazoline), Corr-2b et Corr-4a (thiazoles)	[51]
Prion PrP	quinacrine, chlorpromazine	[52]

Récepteur sulfonylurée SUR1	diazoxide, glibenclamide, tolbutamide	[31]
β -amyloïde	iA β 5 (" β -sheet breaker" spécifique)	[53]
huntingtine	Direct fast yellow, chrysamine G	[54]
α -synucléine	peptide RGGAVVTGRRRRRR-amide ("β-sheet breaker" spécifique)	[45,46]

*des mutants naturels du récepteur δ -opioïde n'ont pas été décrits, mais le récepteur est une cible majeure dans le traitement de la douleur. Le δ OR est naturellement mal maturé et 40% uniquement des récepteurs synthétisés sont ciblés à la surface cellulaire (membrane plasmique). Il y a donc un intérêt thérapeutique réel de développer des chaperons pharmacologiques de ce récepteur [25]. **Le récepteur β 1-adrénergique n'est pas impliqué dans des maladies conformationnelles, mais les chaperons pharmacologiques spécifiques sont capables de cibler des mutants artificiels de ce récepteur à la surface cellulaire [47].

Figure 1: Mode d'action des chaperons pharmacologiques : cas des récepteurs membranaires. Les chaperons pharmacologiques traversent les membranes cellulaires pour interagir avec leurs récepteurs cibles mal repliés et séquestrés au niveau du RE. Le changement de conformation induit par le pharmacochaperon permet au récepteur de reprendre son trafic cellulaire classique (à travers l'ER et le Golgi) pour subir une maturation complète et être exporté vers son compartiment de fonction (en l'occurrence la membrane plasmique). Les chaperons pharmacologiques peuvent être de nature différente. Différentes classes sont décrites : agonistes (activateurs des voies de signalisation, protéines G et arrestines par exemple pour les RCPGs), antagonistes (ou agonistes inverses dans certains cas, inhibiteurs des voies de signalisation), agonistes biaisés (activateurs ou inhibiteurs d'une partie des voies de signalisation naturellement engagées par le ligand endogène), modulateurs allostériques positifs (permettent de potentialiser les effets du ligand endogène).

1 ACTIVITE DE PHARMACOCCHAPERON

2 ACTIVITE DE SIGNALISATION

