



HAL
open science

Premières toxines Kunitz antagonistes du récepteur de type 2 à la vasopressine : étude pharmacodynamique et relations structure-activité

Laura Droctove

► **To cite this version:**

Laura Droctove. Premières toxines Kunitz antagonistes du récepteur de type 2 à la vasopressine : étude pharmacodynamique et relations structure-activité. Biochimie, Biologie Moléculaire. Université Paris-Saclay, 2018. Français. NNT : 2018SACLS009 . tel-01717788

HAL Id: tel-01717788

<https://theses.hal.science/tel-01717788>

Submitted on 26 Feb 2018

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Premières toxines Kunitz antagonistes du récepteur de type 2 à la vasopressine : étude pharmacodynamique et relations structure-activité

Thèse de doctorat de l'Université Paris-Saclay
préparée à l'Université Paris-Sud

École doctorale n°569
Innovation thérapeutique : du fondamental à l'appliqué

Spécialité de doctorat :
Ingénierie des protéines et cibles thérapeutiques

Thèse présentée et soutenue à Gif-sur-Yvette, le 12 janvier 2018, par

Laura Droctové

Composition du Jury :

M. Gilles Guillon Directeur de recherche émérite, CNRS (IGF)	Rapporteur
M. Denis Morin PUPH, CHU Montpellier	Rapporteur
M. Philippe Bulet Directeur opérationnel, Biopark d'Archamp	Examineur
Mme Catherine Llorens-Cortes Directrice de recherche, Collège de France (U1050, CIRB)	Examinatrice
M. Philippe Minard Professeur, Université Paris-Sud (I2BC)	Président du jury
M. Nicolas Gilles Chercheur, CEA Saclay (SIMOPRO)	Directeur de thèse

Remerciements

Je remercie tout d'abord les membres du jury pour avoir accepté d'évaluer mes travaux et me faire l'honneur de leur expertise dans les nombreux domaines auxquels touche cette thèse.

Un grand merci à Nicolas Gilles pour m'avoir fait confiance dès le début, avant même d'avoir trouvé les financements de thèse. Merci pour son accompagnement et sa disponibilité. Son optimisme à toute épreuve a été une grande source de motivation.

Je tiens à remercier Denis Servent pour m'avoir accueillie dans son équipe et avoir soutenu mon travail tout au long de ces trois années.

Lorsque je suis arrivée au laboratoire, beaucoup de personnes avaient déjà travaillé sur la mambaquarétine. Parmi elles, Justyna Ciolek et Chrystelle Carvalho ont été d'une aide précieuse pour m'aider à m'imprégner du sujet et me former sur plusieurs techniques. Je les en remercie grandement.

Un immense merci à Manon Lancien qui s'est beaucoup investie dans le sujet et grâce à qui les nombreux résultats d'expérimentation animale ont pu être obtenus.

Mes remerciements vont ensuite à nos collaborateurs de l'IGF à Montpellier, Christiane Mendre et Bernard Mouillac, qui m'ont accueillie à plusieurs reprises dans leur laboratoire. Leur expertise sur la partie récepteur vasopressine a été précieuse dans l'avancée de mes travaux. Un grand merci à Christiane qui m'a encadrée pour réaliser une partie des expériences de fonction.

Toujours à Montpellier, l'équipe de Nicolas Floquet, à l'IBMM, a réalisé un impressionnant travail de modélisation, qui a été un support précieux pour nos analyses d'interactions moléculaires. Je leur adresse mes sincères remerciements.

Enfin, de nombreuses personnes ont participé de plus ou moins loin à ce sujet : Pascal Kessler et Gilles Mourier pour la chimie des peptides, Loïc Quinton pour le séquençage et la spectrométrie de masse, Bernard Maillère pour l'immunogénicité, Ricardo de la Vega et Guillaume Blanchet pour la phylogénie, Jean-Charles Robillard pour l'animalerie. Je remercie également Philippe Robin pour toutes ces réponses à mes (très) nombreuses questions en biologie moléculaire et en culture cellulaire.

Mille mercis à Marion Houot, ma biostatisticienne préférée, pour avoir eu la patience de m'expliquer comment faire une analyse statistique correcte, pour avoir pris le temps de se pencher sur mes résultats et pour son amitié statistiquement très significative (modèle qui tend vers l'infini).

Sans les citer par peur d'en oublier, je pense aussi aux nombreux stagiaires, techniciens et ingénieurs qui ont travaillé ponctuellement sur le sujet et ainsi apporté leur contribution à son avancée.

Pour travailler dans de bonnes conditions, il est primordial d'être bien entouré. Je remercie chaleureusement tous mes collègues, actuels et anciens, statutaires, doctorants, post-docs, ingénieurs et techniciens, à l'étage et en-dessous, pour leur bonne humeur, leurs encouragements et leurs conseils. C'était un plaisir de venir vous retrouver tous les jours. Merci à mes collègues de « galère » : Cécile, Bakhos, Nassim, Livia, Aurélien, Marcela et Steve, avec lesquels nous pouvions partager nos expériences respectives de thèse. Une pensée particulière pour Tânia Gonçalves, ma très chouette « co-bureau ». Je lui souhaite le meilleur pour la fin de sa thèse et l'après.

S'il est important d'être bien entouré au travail, l'être en dehors l'est encore davantage. En premier lieu, je pense à mes colocs qui ont été absolument parfaits pour me changer les idées en fin de journée : Anaïz, Bertrand, Florent et Paul. Également mes amis rencontrés à l'orchestre : Dominique, Adé et tous les autres. Enfin, le petit groupe des ensaïens qui m'ont très bien accueillie. Et puis bien sûr, les amis de toujours, tout aussi présents malgré la distance. Merci à ceux qui ont accepté de relire ma thèse (bien que ça vous semblait assez incompréhensible...) : Carlotta, Sylvain, Anne et Claudie, Marinouch et mes parents.

Pour terminer, je remercie ma famille pour son soutien indéfectible tout au long de mes études (et ce fut long !!) et ma famille d'adoption pour leur présence à mes côtés dans ma vie parisienne.

*À tous les rats qui ont participé aux
travaux présentés dans cette thèse, bien malgré eux.*

Liste des abréviations

³ H-AVP	vasopressine tritiée
AC	adénylate cyclase
ACN	acétonitrile
ADA	anticorps anti-médicament (anti-drug antibody)
ALAT	alanine amino-transaminase
AMPc	adénosine monophosphate cyclique
AQP2	aquaporine de type 2
ARA	antagoniste du récepteur à l'angiotensine
ASAT	aspartate amino-transaminase
ASMR	amélioration du service médical rendu
ATP	adénosine triphosphate
AVP	arginine-vasopressine
BF	liaison sur les filtres (blank filter)
BLAST	outil de recherche basique d'alignement local (basic local alignment search tool)
BPTI	inhibiteur pancréatique bovin de la trypsine (bovine pancreatic trypsin inhibitor)
BS	liaison (binding) spécifique
BSA	albumine sérique bovine
BT	liaison (binding) totale
CBR	récepteur cannabinoïde
CD	dichroïsme circulaire
CFTR	régulateur de la conductance transmembranaire de la fibrose kystique (cystic fibrosis transmembrane conductance regulator)
CHO	cellules ovariennes de hamster chinois
CPM	coup par minute
CV	volume de la colonne
DFG	débit de filtration glomérulaire
DMEM	milieu Eagle modifié de Dulbecco
DPM	désintégration par minute
DO	densité optique
Dtx	dendrotoxine
DU	débit urinaire
EC80	concentration d'agoniste nécessaire pour obtenir 80 % de la réponse totale
ECL	boucle extracellulaire (extracellular loop)
EDTA	acide éthylène diamine tétra-acétique
EGF	facteur de croissance épithélial
EGFR	récepteur à l'EGF
ELISA	test d'immuno-absorption enzymatique
EMA	Agence Européenne du Médicament (European Medicines Agency)

ERK	kinase régulée par un signal extracellulaire (extracellular signal-regulated kinase), aussi appelée MAPK (mitogen-activated protein kinase)
ET-1	endothéline de type 1
ET _B R	récepteur de type B à l'endothéline
FC	fibrocystine
FDA	Agence Américaine des Produits Alimentaires et Médicamenteux (Food and Drug Administration)
Fmoc	Fluorénylméthoxycarbonyle
FRET	transfert d'énergie par résonance de Förster (Förster resonance energy transfer)
FZD	récepteur frizzled
G α , β , γ	sous-unité α , β ou γ de la protéine G
GDP	guanosine 5'-diphosphate
GRK	kinase spécifique des RCPG
GTP	guanosine 5'-triphosphate
H8	hélice α 8 des récepteurs
HAS	Haute Autorité de Santé
HEPES	acide 4-(2-hydroxyéthyl)-1-pipérazine éthane sulfonique
HPLC	chromatographie liquide haute performance
HTRF [®]	fluorescence homogène résolue en temps (homogeneous time resolved fluorescence)
IC50	concentration de ligand inhibant 50 % de la liaison du traceur
ICL	boucle intracellulaire (intracellular loop)
IEC	inhibiteur de l'enzyme de conversion
IGF	facteur de croissance insulino-semblable (insulin-like growth factor)
IGFR	récepteur à l'IGF
IP	intrapéritonéal
IP ₃	inositol-1,4,5-triphosphate
K _d	constante de dissociation d'un complexe à l'équilibre
K _i	constante d'inhibition
K _v	canal potassique sensible au potentiel
MEK	kinase de ERK
MQ	mambaquarétine
mTOR	protéine cible de la rapamycine des mammifères
NS	liaison non spécifique
OTR	récepteur à l'ocytocine
PBS	tampon phosphate salin
PC	polycystine
PKRAD	polykystose rénale autosomique dominante
PKRAR	polykystose rénale autosomique récessive
PLA2	phospholipase de type A2
ppm	partie par million
RCPG	récepteur couplé aux protéines G
RE	réticulum endoplasmique

Rho	récepteur rhodopsine
RMN	résonnance magnétique nucléaire
SEM	erreur standard sur la moyenne
SIADH	syndrome de sécrétion inappropriée d'hormone antidiurétique
SMO	récepteur smoothed
SMR	service médical rendu
SRA	système rénine-angiotensine
$t_{1/2}$	temps de demi-vie biologique
TC	tube collecteur
TCD	tube contourné distal
TCP	tube contourné proximal
<i>TEMPO</i>	Efficacité et sécurité d'emploi du tolvaptan dans la prise en charge de la polykystose rénale autosomique dominante et résultats (Tolvaptan Efficacy and Safety in Management of Autosomal Dominant Polycystic Kidney Disease and its Outcomes)
TFA	acide trifluoroacétique
TM	segment transmembranaire
UV	ultraviolet
VR	récepteur à la vasopressine
VRT	volume rénal total

Liste des figures

- Figure 1** – Estimation du nombre de toxines peptidiques par espèce venimeuse
- Figure 2** – Diversité des structures peptidiques tertiaires dans les venins
- Figure 3** – Convergence des sites d'activité des toxines animales
- Figure 4** – Restriction et recrutement des gènes
- Figure 5** – Structure du BPTI
- Figure 6** – Structure cristallographique de l' α -dendrotoxine
- Figure 7** – Dendrogramme des RCPG humains et quelques structures cristallographiques résolues
- Figure 8** – Diversité structurale de ECL2 chez les récepteurs *Rhodopsine*
- Figure 9** – Modélisation de la rupture de la liaison entre TM3 (Arg^{3.50}) et TM6 (Glu^{6.30}) suite à l'activation du récepteur β_2 AR
- Figure 10** – Cycle d'activation de la protéine G
- Figure 11** – Interaction de la protéine G avec un RCPG et modifications conformationnelles de la sous-unité $G\alpha$
- Figure 12** – Structure du néphron chez l'humain
- Figure 13** – Transport actif couplé au Na^+ dans le tubule rénal
- Figure 14** – Réabsorption et sécrétion tubulaire
- Figure 15** – Cycle cellulaire de l'aquaporine 2
- Figure 16** – Structure d'un cil primaire
- Figure 17** – Formation des kystes suite à la survenue d'une deuxième mutation
- Figure 18** – Voies de signalisation régulant la prolifération cellulaire dans les cellules épithéliales du tube collecteur
- Figure 19** – Sécrétion de liquides dans les kystes
- Figure 20** – Principaux mécanismes pathologiques impliqués dans la PKRAD et cibles thérapeutiques envisagées
- Figure 21** – Structures cristallographiques de MQ-1 et du variant Asn15Lys/Gly16Ala
- Figure 22** – Versatilité de l'activité de MQ-1 sur différentes cibles en fonction de sa séquence
- Figure 23** – Déplacement parallèle vers la droite des courbes d'activation de V2R par la vasopressine en présence de concentrations croissantes de MQ-1
- Figure 24** – Effet aquarétique suite une injection IP quotidienne pendant six jours de MQ-1 à différentes doses
- Figure 25** – Effet aquarétique suite une injection IP quotidienne pendant 99 jours de MQ-1 à 0,1 $\mu\text{mol/kg}$
- Figure 26** – Effet bénéfique de MQ-1 sur la progression des kystes rénaux
- Figure 27** – Débit et osmolalité urinaires sur 24 h après une injection IP unique de MQ-1 à différentes doses
- Figure 28** – Débit et osmolalité urinaires au cours des 24 h suivant une injection IP unique de MQ-1 à différentes doses
- Figure 29** – Débit et osmolalité urinaires suivant une injection IP unique de MQ-1 à différentes doses au-delà de 24 h

Figure 30 – Modélisation de la décroissance du débit urinaire en fonction du temps après une injection IP unique de MQ-1 à différentes doses

Figure 31 – Débit et osmolalité urinaires par jour après une injection IP quotidienne de MQ-1 à 0,003 $\mu\text{mol/kg}$

Figure 32 – Débit et osmolalité urinaires les quatre premières heures suivant une injection IP quotidienne de MQ-1 à 0,003 $\mu\text{mol/kg}$ pendant cinq jours

Figure 33 – Arbre phylogénétique des toxines Kunitz proches de MQ-1

Figure 34 – Dichroïsme circulaire des toxines synthétiques

Figure 35 – Liaison de l'AVP tritié sur des membranes de CHO-hV2R en présence de toxines synthétiques ou naturelles

Figure 36 – Production d'AMPC en présence d'AVP dans des cellules CHO-hV2R

Figure 37 – Production d'AMPC par les cellules CHO-hV2R stimulées par 1,77 nM d'AVP en présence de toxines synthétiques ou naturelles

Figure 38 – Comparaison des structures tertiaires modélisées des nouvelles toxines actives sur V2R avec la structure cristallographique de MQ-1

Figure 39 – Débit et osmolalité urinaires sur les vingt-quatre heures après une injection IP unique de toxine

Figure 40 – Alignements de séquences des toxines Kunitz

Figure 41 – Dichroïsme circulaire des variants synthétiques de MQ-1

Figure 42 – Alignement de séquences des toxines dont l'affinité a été testée sur V2R

Figure 43 – Liaison de l'AVP tritié sur des membranes de CHO-hV2R en présence des variants synthétiques de MQ-1

Figure 44 – Résidus mutés sur MQ-1 pour les tests de liaison sur V2R

Figure 45 – Modèles 1 et 2 du complexe MQ-1-V2R

Figure 46 – Cœur hydrophobe autour de la boucle 1 de MQ-1 selon les modèles 1 et 2

Figure 47 – Complémentarité ionique entre MQ-1 et V2R selon les modèles 1 et 2

Figure 48 – Modèles 3 et 4 du complexe MQ-1-V2R

Figure 49 – Cœur hydrophobe autour de la boucle 1 de MQ-1 selon les modèles 3 et 4

Figure 50 – Complémentarité ionique entre MQ-1 et V2R selon les modèles 3 et 4

Figure 51 – Titration des anticorps anti-MQ-1 dans le sérum des souris C57BL/6 immunisées sans adjuvant

Figure 52 – Estimation du nombre de lymphocytes T CD4 préexistant spécifiques pour KLH, ω -MVIIA et MQ-1 en nombre de cellules par million

Figure 53 – Inhibition de la production basale d'AMPC par MQ-1 dans des cellules CHO-hV2R surexprimant le récepteur

Figure 54 – Exemple du fractionnement du venin de *Dendroaspis viridis*

Figure 55 – Schéma de la synthèse chimique d'un peptide en phase solide

Figure 56 – Schéma de principe du dichroïsme circulaire

Figure 57 – Caractérisation d'un lot de préparation membranes

Figure 58 – Schéma de FRET

Figure 59 – Décroissance de la fluorescence dans le temps

Figure 60 – Principe de la quantification de l'AMPC produit par la cellule par compétition de liaison

Liste des tableaux

Tableau 1 – Nature des acides aminés aux positions P1 et P'1 de différentes toxines Kunitz et activité associée

Tableau 2 – Classification des stades d'évolution de la maladie rénale chronique

Tableau 3 – Paramètres urinaires sur 24 h suivant une injection IP unique de MQ-1 à différentes doses

Tableau 4 – Paramètres urinaires par jour après une injection unique de MQ-1 au-delà de 24 h

Tableau 5 – Paramètres urinaires par jour après une injection IP quotidienne de MQ-1 à 0,003 $\mu\text{mol/kg}$

Tableau 6 – Nouvelles toxines de mambas affines pour V2R

Tableau 7 – Masse, séquence et similarité de séquence avec MQ-1 des toxines Kunitz testées sur V2R

Tableau 8 – Affinité des toxines synthétiques ou des fractions naturelles sur V2R

Tableau 9 – Activité des toxines synthétiques ou des fractions naturelles sur V2R

Tableau 10 – Paramètres urinaires sur 24 h suivant une injection IP unique de toxine

Tableau 11 – Activité des variants synthétiques de MQ-1 sur V2R

SOMMAIRE

INTRODUCTION	19
I. Les protéines à structure Kunitz dans les toxines animales.....	20
A. Généralités sur les toxines	20
1) Organisation structurale des toxines.....	21
2) Activité biologique des toxines	22
3) Toxines et récepteurs couplés aux protéines G	24
B. Les toxines Kunitz	24
1) Phylogénie des toxines Kunitz	24
2) Structure canonique des peptides Kunitz	26
3) Principales activités des peptides Kunitz.....	27
4) Utilisation thérapeutique des peptides Kunitz	30
II. Les récepteurs couplés aux protéines G.....	31
A. Structure des RCPG.....	31
1) Classification	31
2) Description moléculaire du fonctionnement des RCPG <i>Rhodopsine</i>	33
B. Signalisation intracellulaire des RCPG	38
1) Cycle de désensibilisation et internalisation	38
2) Signalisation dépendante des protéines G	39
3) Signalisation indépendante des protéines G.....	39
C. Le récepteur de type 2 à la vasopressine	39
1) La vasopressine.....	40
2) Localisation et fonctions de V2R	40
3) Signalisation différentielle induite par V2R.....	41
4) Organisation structurale de V2R.....	42
III. Les polykystoses rénales	43
A. Description anatomique et physiologique des reins.....	43
1) Description générale	44
2) Le néphron, unité fonctionnelle du rein	44
3) Physiologie rénale.....	45
B. Description des cellules principales du tube collecteur	48
1) Régulation de l'osmolarité.....	48
2) Fonction ciliaire	50
C. Physiopathologie des polykystoses rénales.....	53
1) Génétique	53
2) Épidémiologie.....	54
3) Dysfonctionnements cellulaires	55
4) Évolution clinique.....	57
D. Axes thérapeutiques des polykystoses rénales.....	59
1) Axes thérapeutiques envisagés	59

2) Stratégies thérapeutiques actuellement appliquées	62
IV. La mambaquarétine-1	65
A. Caractérisation pharmacologique de MQ-1.....	65
B. Effet de MQ-1 sur un modèle murin de polykystose rénale.....	68
OBJECTIFS.....	71
RESULTATS ET DISCUSSION.....	75
I. Exploration pharmacodynamique de la mambaquarétine-1	76
A. Relation dose-activité d'une injection unique.....	76
1) Effet sur 24 heures	77
2) Effet au-delà de 24 heures	80
B. Administration répétée	82
II. Découverte de nouvelles toxines aquarétiques.....	85
A. Criblage des venins des autres Dendroaspis.....	85
B. Arbre phylogénétique	87
C. Découvertes de nouvelles toxines inhibitrices de V2R.....	88
D. Caractérisation pharmacologique des toxines actives sur V2R.....	89
1) Synthèse chimique des toxines.....	89
2) Affinité pour V2R	90
3) Caractérisation fonctionnelle <i>in vitro</i>	92
4) Modélisation de la structure tertiaire des nouvelles toxines aquarétiques..	93
5) Caractérisation fonctionnelle <i>in vivo</i>	94
III. Exploration du pharmacophore de la mambaquarétine-1	98
A. Étude comparative des séquences.....	98
1) Description des séquences Kunitz naturelles	98
2) Choix des variants.....	100
3) Affinité des variants synthétiques de MQ-1 pour V2R et corrélation avec l'affinité des variants naturels.....	101
B. Modèles d'interaction entre MQ-1 et V2R.....	105
1) Modèles 1 et 2	105
2) Modèles 3 et 4	108
C. Comparaison entre données expérimentales et modélisation	110
IV. Développement thérapeutique de la mambaquarétine-1	111
A. Place du tolvaptan dans le traitement des PKRAD en France.....	112
B. Point de vue industriel autour du développement thérapeutique de la mambaquarétine-1	112
C. Études complémentaires de la mambaquarétine-1 pour son développement thérapeutique.....	114
1) Immunogénicité de MQ-1.....	114

2) Voie d'administration	116
3) MQ-1, agoniste inverse de V2R	117
CONCLUSION ET PERSPECTIVES.....	119
I. Effet et devenir <i>in vivo</i> de la mambaquarétine-1 chez le rat	120
II. Initiation du développement thérapeutique de la mambaquarétine-1	122
III. Découverte d'un groupe de toxines Kunitz antagonistes du récepteur de type 2 à la vasopressine	123
IV. Relations structure-activité de la mambaquarétine-1 sur le récepteur de type 2 à la vasopressine	124
V. Publications à venir	126
MATERIEL ET METHODES.....	127
I. Production des toxines et variants.....	128
A. Fractionnement des venins.....	128
B. Synthèse des peptides.....	129
C. Purification et repliement des peptides	131
1) Conditions HPLC et contrôles	131
2) Oxydation des cystéines	131
3) Dichroïsme circulaire	132
II. Tests pharmacologiques	133
A. Culture cellulaire.....	133
1) Conditions de cultures cellulaires	133
2) Production de membranes.....	134
B. Test de liaison	134
1) Notions théoriques sur la liaison ligand-récepteur	134
2) Mode opératoire général des tests de liaison	135
3) Optimisation du test de liaison.....	135
4) Tests de compétition	136
C. Test de fonction.....	137
1) Théorie du transfert d'énergie.....	137
2) Principe du test de fonction AMPc Cisbio	139
3) Courbe dose-réponse de la vasopressine.....	140
4) Inhibition de la production d'AMPc.....	140
D. Test d'immuno-absorption enzymatique ELISA	141
III. <i>In vivo</i>.....	141
A. Conditions d'hébergement des animaux.....	142

SOMMAIRE

B. Préparation et administration des toxines	142
1) Chez les rats.....	142
2) Chez les souris.....	142
C. Suivi des animaux.....	143
1) Bien-être des animaux au cours des expériences	143
2) Évaluation de l'effet des toxines chez les rats.....	143
3) Prélèvements sanguins chez les souris.....	144
IV. Analyse statistique.....	145
BIBLIOGRAPHIE.....	147
ANNEXE	165

INTRODUCTION

I. Les protéines à structure Kunitz dans les toxines animales

A. Généralités sur les toxines

Il n'existe pas de définition officielle du mot « toxine ». Selon le contexte, une toxine peut désigner n'importe quelle substance ayant une activité toxique, c'est-à-dire néfaste pour la santé d'un être vivant. Le plus souvent, le terme peut être remplacé par biotoxine et fait alors référence à une substance d'origine biologique. Les toxines sont produites aussi bien par des organismes procaryotes (comme la toxine botulique produite par la bactérie *Clostridium botulinum*) qu'eucaryotes (par exemple la ricine produite par le ricin). Dans cette thèse, nous nous intéresserons aux toxines produites par des animaux venimeux.

De tout temps, les venins ont à la fois fasciné et effrayé les êtres humains de par leur haute dangerosité, provenant parfois de tout petits animaux. Un venin peut se définir comme « une sécrétion produite par une glande spécialisée d'un animal et administrée à un autre animal par un système d'inoculation particulier, et qui contient des molécules interférant avec les processus physiologiques et biochimiques normaux de façon à faciliter l'alimentation ou la défense de l'animal qui la produit » (Casewell *et al.* 2013). En effet, les principales fonctions sont la **prédation**, comme c'est le cas chez les serpents, les scorpions ou les araignées, la **défense**, comme chez la plupart des poissons venimeux ou des insectes, et plus rarement la **compétition** intraspécifique, comme chez l'ornithorynque (combat entre mâles). Les venins sont des mélanges complexes de molécules de natures variées et à activités biologiques diverses pouvant compter jusqu'à 1000 composés différents. Ils comptent principalement des peptides, des protéines, des sels et des petites molécules organiques de type acides aminés, acides nucléiques et neurotransmetteurs. La dénomination de toxine fait généralement référence aux composés peptidiques de petite taille (inférieure à 100 résidus). La composition du venin est en lien avec sa fonction. Les venins défensifs sont souvent très conservés entre les espèces et leur effet est immédiat. Les venins prédateurs sont beaucoup plus complexes et agissent par des effets physiologiques variés.

Si l'on prend l'ensemble des espèces animales venimeuses, autour des 170 000, et que l'on multiplie par les centaines de molécules différentes qu'elles produisent, la totalité des toxines uniques disponibles dans la nature peut être estimée à environ 40 millions (Figure 1). Cependant, seulement 5000 toxines sont actuellement caractérisées biologiquement. Il reste donc encore tout à découvrir du monde des toxines.

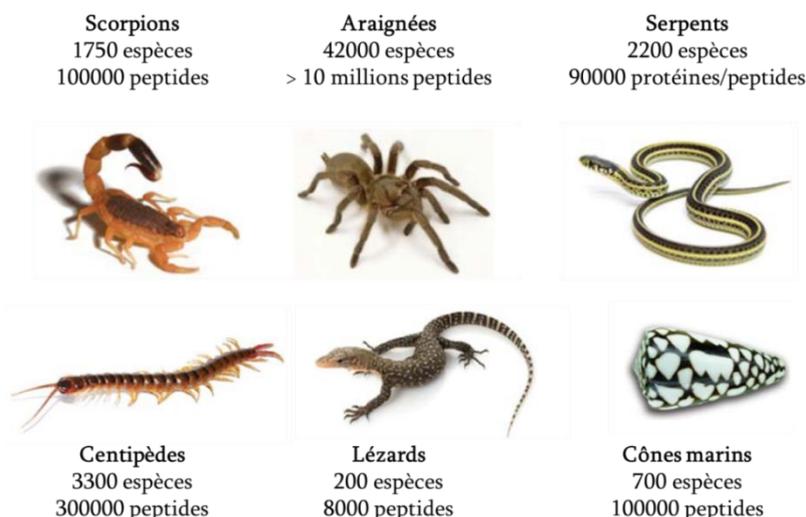


Figure 1 – Estimation du nombre de toxines peptidiques par espèce venimeuse. (Modifié d'après King 2011)

1) Organisation structurale des toxines

Malgré la haute diversité fonctionnelle des toxines dans les venins, il est intéressant de constater la redondance de leurs structures. En effet, la même structure protéique peut être retrouvée dans différentes espèces d'animaux venimeux et avoir évolué pour porter des activités biologiques différentes (Casewell *et al.* 2013). Il s'agit principalement de petites protéines compactes réticulées par un réseau de ponts disulfure¹ (Figure 2). Peuvent être citées en exemples les toxines à repliement dit « trois doigts », qui existent exclusivement chez les serpents et portent de très nombreuses activités, ou les toxines dites « à nœud cystine inhibiteur » (inhibitory cystine knot), qui existent chez de nombreuses espèces et qui sont principalement actives sur les canaux ioniques (King 2011; Kessler *et al.* 2017). Le repliement confère aux toxines une importante stabilité dans le sang, une résistance aux protéases et une capacité à passer certaines barrières anatomiques, ce qui, dans l'optique d'un développement thérapeutique, sont des caractéristiques idéales. Par ailleurs, au sein d'une séquence, se distinguent les résidus structuraux et les résidus non structuraux. Ces derniers sont relativement variables, ce qui explique la grande diversité d'activités biologiques associées à un même repliement.

¹ Pont disulfure : liaison covalente formée par oxydation entre deux atomes de soufre portés par les fonctions thiols (R-S-H) des cystéines.

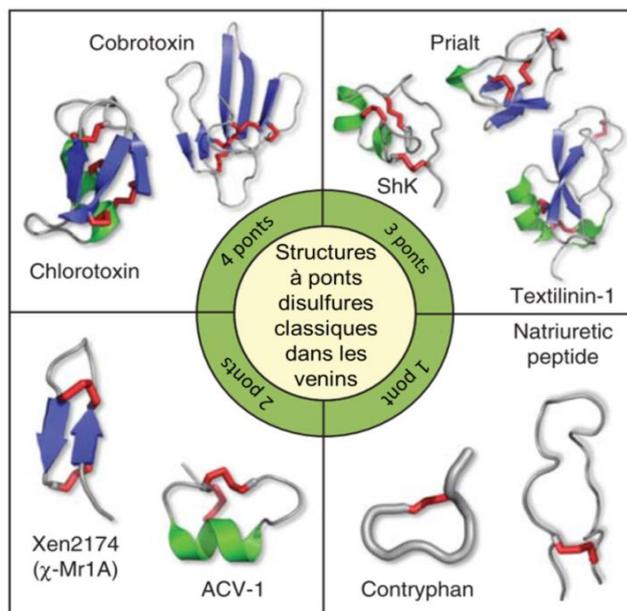


Figure 2 – Diversité des structures peptidiques tertiaires dans les venins. Vert : hélice α ; bleu : feuillet β ; rouge : pont disulfure. (Modifié d'après King 2011)

2) Activité biologique des toxines

Les venins ont longtemps été étudiés pour leur effet général et l'étude de leur composition plus précise, et donc des toxines, date des années 1960. Nous pouvons citer les travaux précurseurs de Tamiya et Arai qui ont isolé deux toxines du serpent de mer *Laticauda semifasciata* en 1966 (Tamiya & Arai 1966). Puisque les venins sont caractérisés par leur toxicité, l'étude des toxines s'est faite par la recherche des composés responsables de cette toxicité. C'est ainsi que la grande majorité des toxines connues aujourd'hui affectent soit la fonction cardiovasculaire, soit la fonction neurologique.

Les principales atteintes cardiovasculaires sont les troubles de la coagulation (hypo- ou hypercoagulation) par inhibition ou activation des différents facteurs de la coagulation, l'hypotension par induction d'une hypotension prolongée, ou altération de l'intégrité des parois vasculaires et des cellules cardiaques par perturbation des phospholipides membranaires (Figure 3-a). Au niveau du système nerveux, la transmission du message interneurone ou neuromusculaire est perturbée par atteinte des différents types de canaux ioniques impliqués, aussi bien au niveau pré- que postsynaptiques et se traduit par une hypo- ou hyperexcitabilité (Figure 3-b).

INTRODUCTION

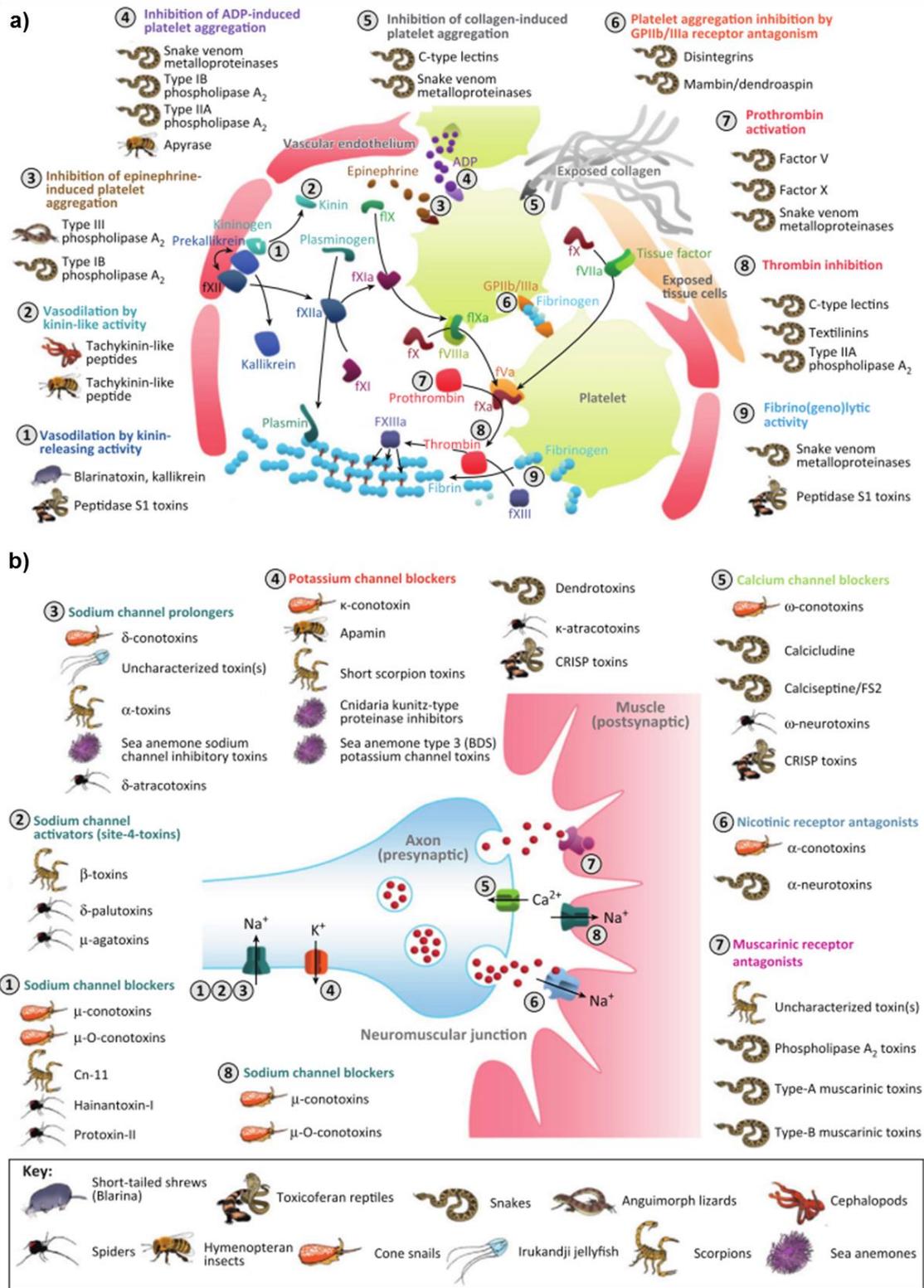


Figure 3 – Convergence des sites d’activité des toxines animales. a) Convergence des sites d’activité des toxines hématotoxiques. b) Convergence des sites d’activité des toxines neurotoxiques. Chaque cible est indiquée par un numéro. Les noms des toxines actives sur chaque cible sont listés sous la légende des numéros et l’espèce animale correspondante est notifiée par une image, les images étant elles-mêmes précisées dans l’encadré « Key » sous les figures. D’après Casewell *et al.* 2013.

3) Toxines et récepteurs couplés aux protéines G

Les récepteurs couplés aux protéines G (RCPG) sont une catégorie de récepteurs physiologiques largement distribués dans l'organisme et impliqués dans la quasi-totalité des processus biologiques (les RCPG seront précisément décrits dans le chapitre II de cette Introduction). Ils sont une cible thérapeutique de premier choix et 40 % des médicaments actuellement sur le marché sont dirigés sur un RCPG. Les premières toxines actives sur les RCPG sont en réalité des analogues mimant des peptides agonistes des récepteurs (« agonist mimicking toxins ») et leur identification date des années 1980 avec les conopressines actives sur les récepteurs à la vasopressine et à l'ocytocine et les sarafotoxines, des vasoconstricteurs homologues de l'endothéline-1 (Cruz *et al.* 1987; Kloog *et al.* 1988). Par la suite, des analogues des prokinéticines ont été mis en évidence comme MIT1 chez le mamba noir ou bv8 chez la grenouille (Schweitz *et al.* 1999; Li *et al.* 2001). Les premières « vraies » toxines actives sur des RCPG, c'est-à-dire de structure et composition totalement différentes de l'agoniste naturel du récepteur, ont été découvertes dans le venin des différents mambas avec les toxines muscariniques et les toxines adrénergiques, comme le groupe des toxines MT1 à 7 ou les ρ -Da1a et b, qui sont des toxines à repliement trois doigts (Jolkkonen *et al.* 1995; Maïga *et al.* 2013; Rouget *et al.* 2010). Deux toxines de cônes ont été identifiées dans les années 2000 : l'antagoniste adrénergique ρ -TIA et l'antagoniste du récepteur à la somatostatine τ -CnVA (Petrel *et al.* 2013; Sharpe *et al.* 2003).

En somme, très peu de toxines ciblant des RCPG sont connues pour le moment et l'équipe du Docteur Denis Servent (Service d'Ingénierie Moléculaire des Protéines – SIMOPRO, CEA Saclay, Gif-sur-Yvette), dans laquelle j'ai réalisé ma thèse, est l'une des seules au monde à travailler sur cette catégorie de toxines. Elle s'est spécialisée dans le criblage de venins dirigé sur des RCPG à intérêt thérapeutique. C'est ainsi qu'a été découverte, en 2008, la mambaquarétine-1, qui est à la fois la première toxine active sur un récepteur à la vasopressine et la première toxine de type Kunitz active sur un RCPG.

B. Les toxines Kunitz

Les molécules dites de type Kunitz correspondent à une famille de peptides associée à deux activités majoritaires : l'inhibition de protéases à sérine circulantes et le blocage de canaux potassiques. Elles sont réparties de façon ubiquitaire entre les plantes, les animaux et les microorganismes et sont exprimées dans divers tissus de leurs hôtes. La suite de ce chapitre sera consacrée aux peptides Kunitz animaux présents dans les venins.

1) Phylogénie des toxines Kunitz

Les toxines Kunitz sont présentes dans pratiquement toutes les espèces venimeuses, ainsi que dans les sécrétions de tiques ou d'insectes, qui peuvent s'apparenter aux venins.

Parmi ces dernières espèces, qui ne seront plus abordées par la suite, il existe de nombreuses variations structurales et l'activité antiprotéase dirigée contre les facteurs de la coagulation est la plus fréquente (Hargreaves *et al.* 2014; Fry 2015).

La façon dont les gènes de toxine évoluent est encore discutée. Deux théories s'opposent : la duplication-recrutement, la plus souvent évoquée, et la duplication-restriction, plus récente. La duplication-recrutement serait liée à la perte d'adressage de certaines protéines pour ses tissus d'origine par mutation lors de la duplication et l'apparition d'une séquence régulatrice permettant son expression au niveau de la glande à venin. La théorie de la duplication-restriction serait uniquement liée à la perte de l'expression de certaines toxines dans les tissus non venimeux lors de la duplication des gènes mais avec le maintien de la séquence d'adressage aux organes sécrétoires (Figure 4). Cependant, ces deux théories ne sont pas incompatibles et il est possible que selon les espèces, l'un de ces deux modes d'évolution soit privilégié par rapport à l'autre mais pas unique.

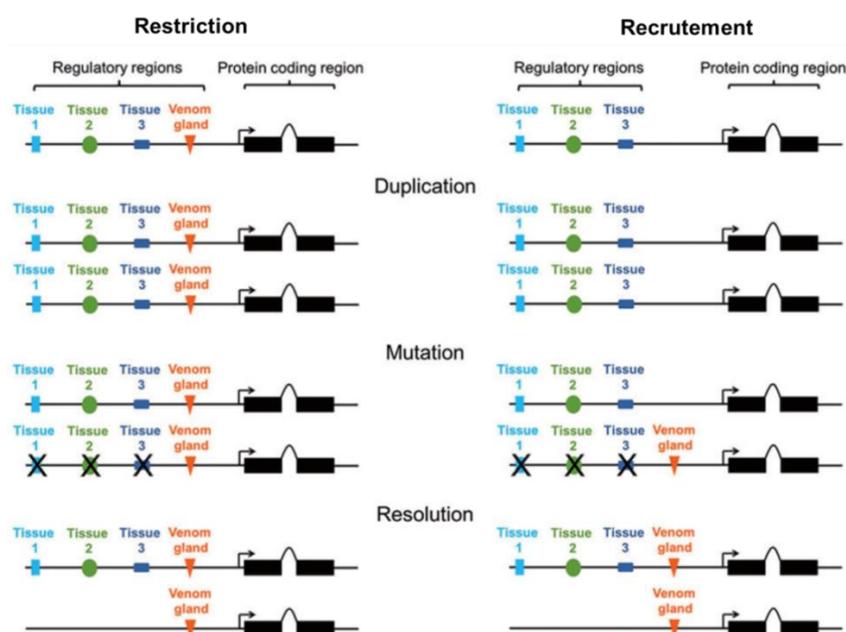


Figure 4 – Restriction et recrutement des gènes. Les gènes dupliqués peuvent être soit restreints soit recrutés à la glande à venin en fonction des combinaisons des facteurs de transcription de la région régulatrice. La croix indique la mutation ou la perte d'une région régulatrice. (Hargreaves *et al.* 2014)

L'évolution des Kunitz est grandement compatible avec la théorie de duplication-restriction puisqu'elles dérivent de protéines issues d'une grande variété de tissus dont le cerveau, les poumons, les ovaires ou l'utérus mais sans qu'elles puissent être rapprochées d'un groupe de protéines humaines en particulier (Fry 2005). Aucune protéine ancestrale n'a pu être identifiée mais celle-ci serait très probablement commune avec les waprines, des toxines de serpent dont l'activité est encore mal caractérisée. En effet, ces deux groupes de peptides partagent une très importante homologie de séquence pour leur

peptide signal et leur site de clivage (Zupunski *et al.* 2003; St. Pierre *et al.* 2008). Il est intéressant d'observer que les Kunitz ont évolué dans plusieurs espèces venimeuses distinctes de façon conjointe pour aboutir à la même activité spécifique (Fry 2015). C'est le cas des Kunitz bloqueurs de canaux potassiques qui existent aussi bien chez différentes espèces d'anémones de mer que chez les serpents (Fry 2005). Par ailleurs, plusieurs toxines Kunitz d'anémones de mer ont la particularité d'être actives aussi bien sur les protéases que sur les canaux potassiques. C'est le cas par exemple de ShPI-1 (*Stichodactyla helianthus*) ou de APEKTx1 (*Anthopleura elegantissima*) (García-Fernández *et al.* 2016; Peigneur *et al.* 2011).

Dans le sous-ordre des serpents, les Kunitz sont majoritairement représentés dans les familles des Élapidés et des Vipéridés qui partagent une protéine Kunitz ancestrale commune (Zupunski *et al.* 2003; Fry & Wüster 2004).

2) Structure canonique des peptides Kunitz

Le premier peptide Kunitz, identifié en 1936 chez le bœuf, est un inhibiteur pancréatique de la trypsine (BPTI), aussi appelé aprotinine (Kunitz & Northrop 1936). Sa structure a été obtenue par cristallographie en 1970 (Huber *et al.* 1970), puis en solution par résonance magnétique nucléaire (RMN) en 1989 (Wüthrich 1989). La numérotation des résidus utilisée dans ce paragraphe pour décrire une structure Kunitz se basera sur celle du BPTI et pourra être légèrement décalée pour d'autres peptides.

Les peptides Kunitz animaux (Kunitz-A) adoptent une structure de type $\alpha/\beta/\alpha$ particulièrement conservée. Ils possèdent une courte hélice α dans la partie N-terminale, puis une boucle 1 se dessine jusqu'au premier segment d'un feuillet β à deux brins antiparallèles. Les deux brins du feuillet β sont séparés par un coude β formé par les résidus 25 à 29. La boucle 2 se prolonge jusqu'à l'hélice α dans la partie C-terminale, des positions 48 à 56. Trois ponts disulfure hautement conservés maintiennent à la fois la conformation et stabilisent les sites de liaison : Cys5-Cys55, Cys30-Cys51 et Cys14-Cys38 (Figure 5-a) (Ranasinghe & McManus 2013). Quelques rares exemples montrent des variations de ce schéma. La conkunitzine-S1, identifiée dans le venin du cône *Conus striatus*, est la première protéine Kunitz-A identifiée ne possédant que deux ponts disulfure sans que la structure et l'activité ne soient altérées (Bayrhuber *et al.* 2005). De même, la toxine du scorpion *Lychas mucronatus* SdPI, un puissant inhibiteur de trypsine, ne possède pas le second pont disulfure. En revanche, sa séquence contient deux cystéines supplémentaires dans la partie C-terminale, susceptibles de former un troisième pont disulfure (Zhao *et al.* 2011). Cinq résidus ont été démontrés comme indispensables au maintien de la structure grâce aux interactions hydrophobes qu'ils établissent entre eux : Tyr23, Phe33, Tyr35, Asn43 et Asn44 (Figure 5-b). Ainsi, une seule mutation de l'un d'entre eux peut suffire à entraîner une réorganisation intramoléculaire et déstabiliser la conformation du site de liaison (Hanson *et al.* 2003).

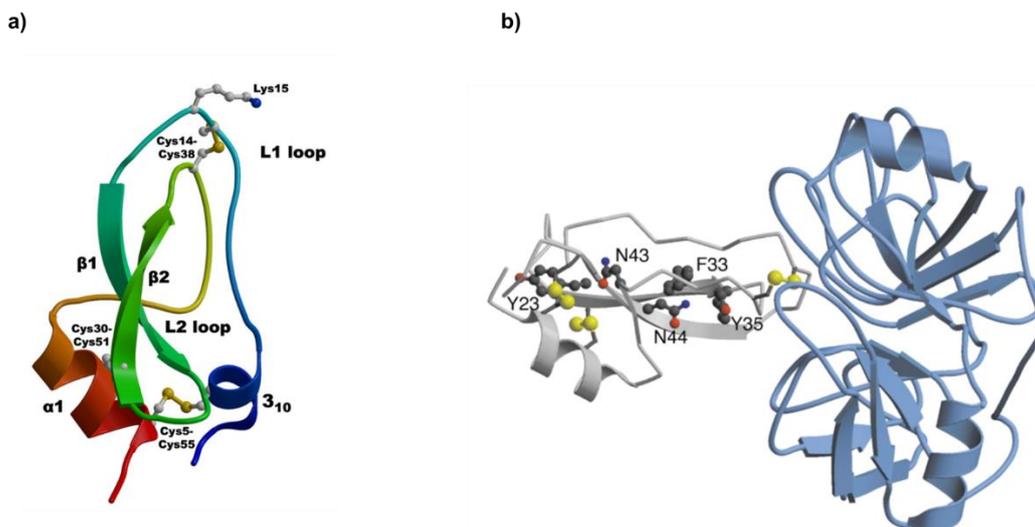


Figure 5 – Structure du BPTI. a) Principaux éléments de structure du BPTI, avec ces ponts disulfure et la position P1 (Lys15) mis en évidence (Paesen *et al.* 2009). b) Structure du BPTI (gris) lié à la trypsine (bleu). Les 5 résidus structuraux hautement conservés sont mis en évidence (Hanson *et al.* 2003).

3) Principales activités des peptides Kunitz

Le repliement Kunitz est classiquement associé à deux activités biologiques : l'inhibition de protéases à sérine et le blocage de canaux potassiques voltage-dépendants de type 1 (Kv1). Depuis quelques années, plusieurs activités nouvelles ont été mises en évidence dans les venins.

a) Les inhibiteurs de protéases

La base de données MEROPS répertorie et classe tous les inhibiteurs de protéases. Les Kunitz animaux appartiennent à la famille I2 qui compte 9016 séquences dont 78 peptides caractérisés pharmacologiquement et 21 structures résolues (Rawlings *et al.* 2016). D'après les séquences de protéines Kunitz connues, 80 % seraient des inhibiteurs de protéases.

Les études de structure-activité ont mis en évidence une série de six résidus critiques très exposés et localisés sur la boucle 1, aussi appelée boucle de liaison aux protéases (Ranasinghe & McManus 2013). Il s'agit des positions 13 à 18 chez le BPTI, respectivement nommées P3-P2-P1-P'1-P'2-P'3 selon la nomenclature des sites catalytiques peptidiques (Schechter & Berger 1967). Le BPTI forme un complexe irréversible avec les protéases, inhibant ainsi leur activité. La position P1 est cruciale : la mutation Lys15Gly ou Lys15Ala suffit à faire perdre un facteur 1000 en affinité pour la trypsine (Czapinska *et al.* 2000). La nature du résidu qui occupe cette place oriente la sélectivité du peptide. Une charge positive (lysine ou arginine) est associée à une activité antitrypsine alors qu'un acide aminé hydrophobe (souvent leucine ou méthionine) est

plutôt associé à une activité antichymotrypsine. La position P₁ est principalement occupée par une alanine ou une glycine (Ranasinghe & McManus 2013) (Tableau 1).

Tableau 1 – Nature des acides aminés aux positions P₁ et P'₁ de différentes toxines Kunitz et activité associée.

(Modifié d'après Ranasinghe and McManus, 2013)

Name	Organism	Domain	P ₁	P' ₁	Inhibitory enzymes
AceKI	<i>Ancylostoma ceylanicum</i>	1	M	A	Trypsin, chymotrypsin, elastase
BPTI	<i>Bos taurus</i>	1	K	A	Trypsin, chymotrypsin, elastase
Fh-Ktm	<i>Fasciola hepatica</i>	1	L	G	Chymotrypsin
EgKU-8	<i>Echinococcus granulosus</i>	1	R	A	Trypsin, chymotrypsin
BmTIsint	<i>Boophilus microplus</i>	1	K	G	Trypsin, plasma kallikrein, Cathepsin L
Ixolaris	<i>Ixodes scapularis</i>	1	E	S	Factor Xa
Simukunin	<i>Simulium vittatum</i>	1	R	A	Elastase, Factor Xa, Cathepsin G
Ornithodorin	<i>Boophilus microplus</i>	1	L	G	Thrombin
TAP	<i>Ornithodoros moubata</i>	1	D	S	Factor Xa
HNTX-XI	<i>Ornithoconus sp.</i>	1	K	A	Trypsin
SdPI	<i>Lychas mucronatus</i>	1	K	A	Trypsin
Conkunitzin	<i>Conus striatus</i>	1	T	K	None
21k	<i>Anisakis simplex</i>	1	T	Q	None
Dendrotoxin	<i>Dendroaspis sp.</i>	1	K	R	None

La grande majorité des Kunitz inhibiteurs de protéases ont pour cible une protéase à sérine. Quelques Kunitz sont connus pour leur activité sur des cystéine-protéases ou des aspartylprotéases ou encore pour leur activité à large spectre sur plusieurs types de protéases, comme c'est le cas de la toxine ShPI-1, extraite du venin de l'anémone *S. helianthus* (Rawlings *et al.* 2016; Smith *et al.* 2016; Delfin *et al.* 1996).

b) Les bloqueurs de canaux potassiques

Dans les années 1980, des homologues structuraux des inhibiteurs de protéases ont été mis en évidence dans le venin de certains élapidés. Ces toxines, peu ou pas actives sur les protéases, sont des neurotoxines actives sur les récepteurs potassiques (Harvey & Karlsson 1980). Par blocage de ces canaux, principalement de type Kv1, elles facilitent le relargage d'acétylcholine au niveau de la jonction neuromusculaire. Le premier représentant de ce groupe de peptides Kunitz est l' α -dendrotoxine, extraite du venin du mamba vert (*Dendroaspis angusticeps*) et qui a donné son nom à l'ensemble des toxines homologues, les dendrotoxines (Harvey & Karlsson 1980). Les dendrotoxines peuvent être à nouveau subdivisées en fonction de leur sélectivité et de leur structure primaire. On distingue le groupe de la δ -dendrotoxine et de la dendrotoxine-K, sélectif du canal Kv1.1, et le groupe de l' α -dendrotoxine et de la dendrotoxine-I, sélectif des canaux Kv1.1/2 et 6 et qui possèdent deux résidus supplémentaires en N-terminale. D'autres bloqueurs de canaux potassiques ont été caractérisés chez d'autres espèces, comme c'est le cas chez l'anémone de mer (*Anemonia sulcata*) avec le groupe des kalicludines (Schweitz *et al.* 1995).

Les bloqueurs de canaux potassiques n'utilisent pas la même stratégie de liaison que les inhibiteurs de protéases. L'activité est portée par la région N-terminale, et principalement les six résidus des positions 3 à 9, la Cys7 étant impliquée dans un pont disulfure. Le mécanisme d'action repose sur la présence d'une charge positive en position 5

ou 3 (selon le sous-groupe de dendrotoxines), généralement une lysine, qui mime la charge positive de l'ion K^+ (Figure 6) (Gasparini *et al.* 1998).

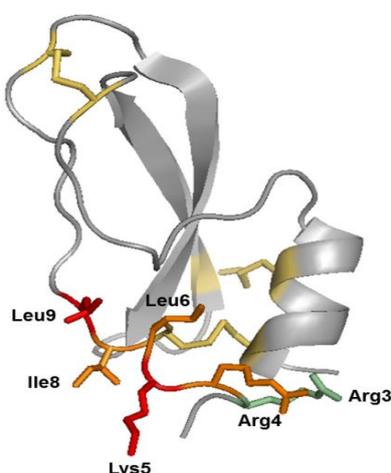


Figure 6 – Structure cristallographique de l'α-dendrotoxine. Structure obtenue par diffraction aux rayons X (PDB : 1DTX). La couleur des résidus correspond à l'importance de la perte d'affinité lorsqu'ils sont mutés d'après Gasparini *et al.* 1998. Vert : perte d'affinité d'un facteur 5 à 10 ; orange : perte d'affinité d'un facteur 10 à 100 ; rouge : perte d'affinité d'un facteur supérieur à 100. Jaune : ponts disulfure.

c) Autres activités Kunitz portées par des toxines

Depuis quelques années, des activités différentes de l'inhibition de protéases ou du blocage des canaux K^+ ont été mises en évidence chez des toxines Kunitz. Ces activités originales ne sont généralement portées que par un ou deux représentants.

Les *Pr*-mulgines-1, -2 et -3 sont des peptides Kunitz extraits du venin de *Pseudechis australis*. Si les *Pr*-mulgines-2 et -3 ont une activité inhibitrice des protéases à sérine classique (antitrypsine, antichymotrypsine, antiplasmine), la *Pr*-mulgine-1 inhibe exclusivement la métalloprotéase matricielle 2 (Inagaki *et al.* 2012).

Deux toxines de l'anémone de mer *Heteractis crista* exercent une activité antagoniste sur les récepteurs 1 vanilloïdes à potentiel transitoire qui sont des récepteurs calciques thermosensibles impliqués dans les phénomènes de nociception. APHC1 et 3 sont caractérisées par la présence d'une thréonine en position P1 au lieu d'une lysine, supposée responsable de leur activité (Andreev *et al.* 2008). Elles sont également faiblement inhibitrices de la trypsine (constante d'inhibition (K_i) > 500 nM) (Gladkikh *et al.* 2015).

Une activité anti-canal calcique a été mise en évidence chez deux toxines. D'abord la calcicludine, une toxine extraite du venin de *Dendrosapis angusticeps* (Schweitz *et al.* 1994; Gilquin *et al.* 1999). Celle-ci n'a aucune activité antitrypsine ou bloqueur de canaux K^+ et ne possède dans sa séquence aucun des acides aminés associés à ces activités, excepté une lysine en P1. En revanche, elle inhibe les canaux calciques voltage-dépendants de

type L (Schweitz *et al.* 1994). La taicatoxine a été mise en évidence dans le venin du taipan *Oxyuranus scutellatus*. Il s'agirait d'un complexe polymérique composé d'une α -neurotoxine, d'une phospholypase A2 (PLA2) et d'un peptide Kunitz de stœchiométrie 1:1:4 (Possani *et al.* 1992; Doorty *et al.* 1997).

Une toxine hétéromérique extraite du venin du serpent *Micrurus tener tener* a montré une activité agoniste des récepteurs ioniques sensibles aux protons (Bohlen *et al.* 2011). Ces derniers jouent un rôle majeur dans la nociception. La toxine MitTx se compose d'une sous-unité Kunitz et d'une sous-unité PLA2.

L'association hétérodimérique d'un peptide Kunitz avec une PLA2 n'est pas une exception. La β -bungarotoxine, extraite du venin de *Bungarus multicinctus*, est formée en réalité de deux sous-unités : la chaîne A₁, de conformation PLA2 et de la chaîne B₂, de conformation Kunitz. La chaîne B₂ possède une cystéine supplémentaire dans la partie C-terminale qui établit un pont disulfure avec une cystéine située dans la partie N-terminale de la chaîne A₁. Cette toxine bloque les canaux K⁺ et n'a aucune activité antitrypsine. La partie Kunitz ne possède dans sa séquence aucun des résidus conventionnels pour ce type d'activité (Pro5 et Lys9) (Kwong *et al.* 1995).

4) Utilisation thérapeutique des peptides Kunitz

Si les toxines ont longtemps été étudiées afin de mettre au point des antidotes contre les envenimations, elles sont depuis peu considérées tout autrement. En effet, leur haute sélectivité et affinité pour leur cible, comme leur résistance aux protéases grâce à leur repliement compact en font des outils de recherche de choix, tout comme de potentiels candidats thérapeutiques novateurs. Ainsi, plusieurs peptides Kunitz, d'origine venimeuse ou non, sont déjà utilisés en clinique ou sont en cours d'étude.

Le BPTI a été commercialisé à partir de 1993 sous le nom de Trasylo[®] (Bayer) pour son activité antifibrinolytique par inhibition de plusieurs protéases impliquées dans la cascade de coagulation. Il était indiqué dans la prévention des pertes de sang au cours des chirurgies cardiaques à haut risque (Koster *et al.* 2015). Cependant, plusieurs études ont montré une moindre efficacité comparée aux autres molécules dans la même indication ainsi qu'une augmentation des décès dans les 30 jours suivant les interventions sous Trasylo[®], ce qui a conduit les autorités de santé à demander l'arrêt de sa commercialisation en 2008 (Fergusson *et al.* 2008).

La textilinine est actuellement à l'étude afin de remplacer le BPTI dans la même indication. Cette toxine du serpent *Pseudonaja textilis*, qui partage 45 % d'homologie de séquence avec le BPTI, a l'avantage d'être particulièrement sélective pour la plasmine (Willmott *et al.* 1995). De plus, elle se dissocie rapidement de sa cible et est rapidement éliminée de l'organisme (Millers *et al.* 2009).

Plus récemment, le criblage de variants de l'inhibiteur de la voie du facteur tissulaire par la technique de phage display a permis d'identifier un puissant et sélectif inhibiteur de la kallikréine plasmaticque, une protéase à sérine impliquée dans la coagulation, la fibrinolyse, l'hypotension, la douleur et l'inflammation (Williams & Baird 2003). Ce peptide Kunitz appelé écallantide, et commercialisé sous le nom de Kalbitor® (Shire) aux États-Unis, est indiqué dans le traitement de la crise aigüe d'angioedème héréditaire.

Connue depuis les années 60, l'ulinastatine, également appelée bikunine, mingine ou encore inhibiteur urinaire de trypsine, est une protéine humaine à deux domaines Kunitz (Xu *et al.* 1998). Elle possède une activité antiprotéase à large spectre et est commercialisée sous le nom d'U-Tryp® (Bharat Serums & Vaccines Ltd.) en Chine, en Inde et en Corée du Sud et sous le nom de Miraclid® (Mochida Pharmaceutical) au Japon. Elle a plusieurs indications autour de la prise en charge des pancréatites et de divers syndromes inflammatoires (Maciejewski *et al.* 2005).

II. Les récepteurs couplés aux protéines G

Avec environ 800 représentants, les récepteurs couplés aux protéines G (RCPG) composent la plus importante famille de protéines membranaires du génome humain. En réponse à une très grande variété de stimuli (photons, protéines, peptides, petites molécules, hormones, protons ou ions), ils induisent la transduction de signaux intra et extracellulaires par l'intermédiaire ou indépendamment de protéines hétérotrimériques, dite protéines G car capables de lier la guanosine triphosphate. Ils sont répartis dans l'ensemble de l'organisme et participent ou régulent la majorité des phénomènes physiologiques. À l'heure actuelle, environ 40 % des médicaments sur le marché ont pour cible un RCPG. Cependant, parmi les 370 cibles thérapeutiques potentielles qu'ils représentent, seulement 12 % sont effectivement exploités, faute de ligands suffisamment sélectifs et sûrs (Lagerström & Schiöth 2008).

A. Structure des RCPG

1) Classification

Depuis leur découverte, plusieurs nomenclatures se sont succédées afin de classer les RCPG. Nous les présenterons ici selon la classification GRAFS de 2003, les cinq lettres représentant des cinq classes, qui se base sur une étude phylogénétique des RCPG humains et les différencie par leurs domaines dans la partie N-terminale (Figure 7) (Fredriksson *et al.* 2003).

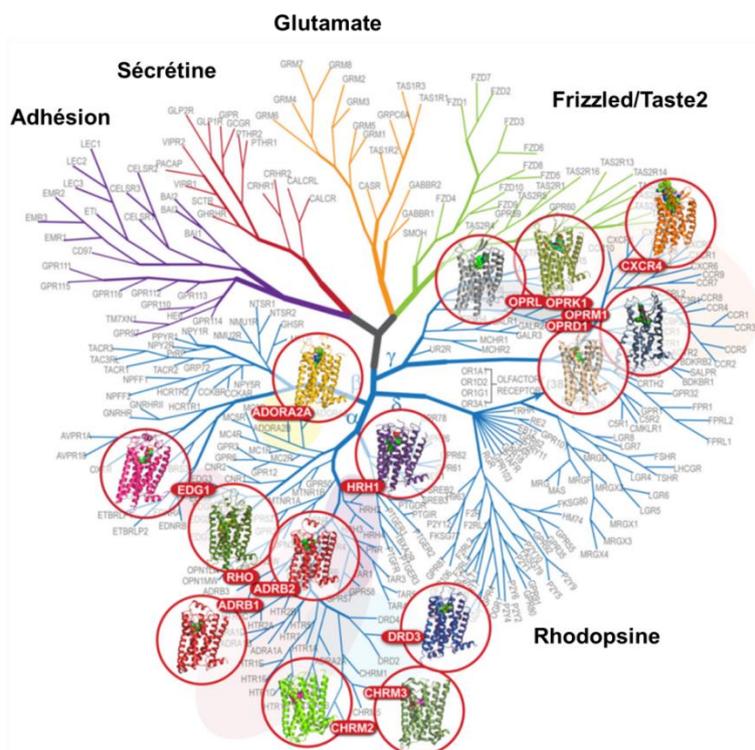


Figure 7 – Dendrogramme des RCPG humains et quelques structures cristallographiques résolues. L'arbre est construit par similarité de séquence (Katritch *et al.* 2013).

La famille des récepteurs *Glutamate* contient 22 membres dont les récepteurs métabotropes glutamate, les récepteurs GABA ou le récepteur senseur de calcium. Le site de liaison du ligand naturel se situe généralement dans la région N-terminale.

La famille des récepteurs *Rhodopsine*, aussi appelée classe A selon d'autres nomenclatures (Attwood & Findlay 1994), correspond à la plus vaste famille de RCPG avec environ 700 membres (Katritch *et al.* 2013). Elle est nommée d'après son chef de file, un des premiers RCPG identifiés en 1876 et un des mieux connus, la rhodopsine (Rho). Une très grande variété de ligands peut se fixer à cette famille de récepteurs : des peptides, des amines et purines, des lipides. Cette classe se subdivise en quatre groupes α , β , γ et δ , surtout différents par la diversité de leurs segments transmembranaires (TM), bien qu'ils partagent plusieurs motifs spécifiques conservés.

- Le sous-groupe α regroupe essentiellement des récepteurs à ligands amines et se caractérise par un site de liaison situé entre les TM. Il compte d'importantes cibles thérapeutiques comme les récepteurs dopaminergiques D1 et D2, sérotoninergiques 5-HT_{1A}, 5-HT_{1D} et 5-HT_{2A}, adrénergiques α_1 AR, α_2 AR, β_1 AR et β_2 AR, muscarinique M3 et somatostatine SSTR1, SSTR3 et SSTR4.

- Le sous-groupe β englobe surtout des récepteurs à ligands peptidiques dont le site de liaison se trouve entre les TM, les boucles extracellulaires et la partie N-terminale. Les récepteurs de l'endothéline, de la vasopressine et de l'ocytocine en font partie.

- Le sous-groupe γ inclut des récepteurs à ligands peptidiques et lipidiques. Les principaux représentants sont les récepteurs opioïdes, somatostatine SSTR2 et SSTR5, angiotensine AT1 et chimiokine CCR5.

- Enfin, le sous-groupe δ contient des récepteurs à ligands glycoprotéiques et nucléotidiques, les récepteurs activés par les protéases et surtout les récepteurs olfactifs. Le nombre de récepteurs olfactifs est estimé à 400 dans le génome humain. Il s'agit de récepteurs activés par des molécules volatiles non spécifiques. La majorité d'entre eux sont des récepteurs orphelins².

La famille des récepteurs *Adhésion* regroupe 33 récepteurs, dont 30 orphelins, et se subdivise en 8 groupes. Elle est très proche de la famille des récepteurs *Sécrétine* mais se distingue notamment par une partie N-terminale très longue contenant de nombreux sites fonctionnels spécifiques.

Les autres récepteurs connus constituent la famille des récepteurs *frizzled/Taste2*. Les récepteurs frizzled (FZD) sont au nombre de 10 chez l'homme, auxquels est associé le récepteur smoothed (SMO). Ils sont caractérisés par une large région N-terminale riche en cystéines dont neuf sont conservées chez les FZD, huit chez SMO. Leurs principaux ligands sont les glycoprotéines Wnt, impliquées dans l'embryogénèse et les cancers. Dans la même famille, les 25 récepteurs Taste2 sont impliqués dans le goût. Ils sont majoritairement orphelins.

La famille des récepteurs *Sécrétines* compte seulement 15 membres. Ils ont pour ligands des hormones peptidiques dont la calcitonine, le glucagon, l'hormone parathyroïde ou encore la sécrétine. Ils sont caractérisés par un site de liaison situé dans leur partie N-terminale hautement variable.

2) Description moléculaire du fonctionnement des RCPG *Rhodopsine*

Les RCPG portent également le nom de récepteurs à sept segments transmembranaires d'après leur organisation tertiaire. Ils possèdent en effet sept hélices α traversant la membrane (TM), reliées entre elles par trois boucles extracellulaires (ECL) et trois boucles intracellulaires (ICL). La partie N-terminale, de longueur très variable, se trouve à l'extérieur de la cellule et la partie C-terminale est intracytoplasmique. Il est courant d'observer une courte hélice α en C-terminale, nommée hélice 8 (H8), spécifique des récepteurs de la famille *Rhodopsine* (Cherezov *et al.* 2007). À l'heure actuelle, 27 structures cristallographiques de RCPG de la famille *Rhodopsine* ont été résolues, majoritairement en conformation inactivée.

² Les récepteurs sont dits orphelins lorsque leur ligand endogène n'est pas connu.

a) Le récepteur à l'état inactif

La structure à l'état non activé est maintenue par de nombreuses interactions intramoléculaires fortes telles que des ponts disulfure ou des ponts salins, spécifiques à chaque récepteur. Cependant, certaines interactions sont très conservées dont notamment un pont disulfure entre une Cys de ECL2 et la Cys^{3.25} (d'après la numérotation de Ballesteros et Weinstein³ (Ballesteros & Weinstein 1995)) au sommet du TM3 (Wheatley *et al.* 2012). Dans la partie cytoplasmique, le motif hautement conservé E/DRY de TM3 est en interaction avec TM6. Dans le cas du récepteur rhodopsine, l'Arg^{3.50} forme un pont salin avec le Glu^{6.30} alors que chez les récepteurs opioïdes μ -OR et κ -OR, l'Arg^{3.50} fait une liaison hydrogène avec la Thr^{6.34} (Huang *et al.* 2015; Wu *et al.* 2012). Chez μ -OR, la mutation du résidu Thr279^{6.34} en lysine est associée à l'activation constitutive du récepteur, confirmant l'implication de cette interaction dans le maintien de l'état non-actif (Manglik *et al.* 2012).

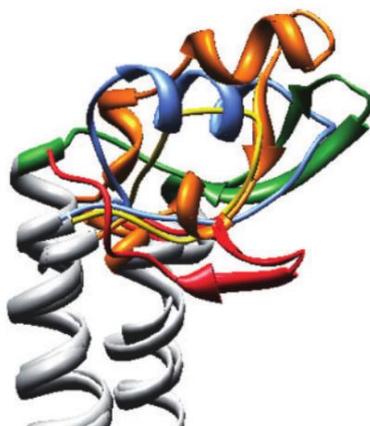


Figure 8 – Diversité structurale de ECL2 chez les récepteurs *Rhodopsine*. Structure cristallographique de ECL2 de cinq RCPG *Rhodopsine*. Rouge : Rho (PDB : 3CAP) ; bleu : β_2 AR (PDB : 2RH1) ; jaune : D3 (PDB : 3PBL) ; orange : A_{2A}R (PDB : 2YDO) ; vert : CXCR4 (PDB : 3OE0) (Wheatley *et al.* 2012).

ECL2 est généralement la plus longue des boucles extracellulaires et donc particulièrement flexible. Des différences importantes ont été observées d'un récepteur à l'autre concernant la longueur, la séquence mais aussi la structure. Par exemple, ECL2 dans Rho s'organise en feuillet β à deux brins antiparallèles qui recouvre le site de liaison, alors que chez le récepteur β_2 AR, elle comporte une courte hélice α stabilisée par un pont disulfure intrahélice (Figure 8) (Palczewski *et al.* 2000; Cherezov *et al.* 2007). Plusieurs études ont montré le rôle de régulateur négatif de ECL2 sur l'activation du récepteur par

³ La numérotation de Ballesteros et Weinstein attribue à chaque résidu deux numéros. Le premier correspond au segment transmembranaire auquel il appartient. Pour chaque segment transmembranaire, le résidu le plus conservé porte ensuite le numéro 50. Les autres résidus sont numérotés en fonction de leur emplacement par rapport à ce résidu de référence (Ballesteros & Weinstein 1995). Exemple : dans TM3, l'Arg de la séquence conservée DRY est le résidu de référence. On note donc Asp^{3.49}, Arg^{3.50} et Tyr^{3.51}.

stabilisation des interactions propres à l'état non actif (Massotte & Kieffer 2005). C'est le cas de Rho pour lequel ECL2 obstrue le site de liaison et s'écarte du récepteur en présence de photons (Ahuja *et al.* 2009).

b) Liaison de l'agoniste

Le site orthostérique, site de liaison du ligand endogène, se situe dans une zone définie entre les boucles extracellulaires et une poche constituée dans les TM du côté extracellulaire. Les boucles extracellulaires participent également à la liaison en orientant le ligand dans le site orthostérique et en l'y maintenant. Il a été observé que la disparition du pont disulfure hautement conservé entre ECL2 et TM3 entraîne un effet délétère sur la fonction de la plupart des récepteurs comme le récepteur de type 1 à la vasopressine (V1aR), Rho ou β_2 AR (Wheatley *et al.* 2012; Conner *et al.* 2007). De même, plusieurs maladies dysfonctionnelles affectant des RCPG, comme le diabète insipide néphrogénique (récepteur de type 2 à la vasopressine (V2R)) ou la rétinite pigmentaire (Rho), sont liées à des mutations sur des résidus des ECL1 et 3 (Wheatley *et al.* 2012; Bichet 2009). Ces observations confirment l'implication des ECL dans la liaison des ligands et leur rôle fonctionnel.

La rhodopsine a la particularité d'avoir son ligand endogène sélectif, le 11-*cis*-rétinal (un chromophore dérivé de la vitamine A), fixé covalamment (Palczewski *et al.* 2000). En présence de photons, le 11-*cis*-rétinal s'isomérisé, ce qui conduit à l'écartement de ECL2 et à l'activation de l'opsine (Palczewski *et al.* 2000).

D'autre part, les ligands ont une meilleure affinité pour leur récepteur si celui-ci est déjà couplé à une protéine G. Ce phénomène a été observé avec l'isoprotérénol, un agoniste de β_2 AR, dont l'affinité pour son récepteur est 100 fois supérieure en présence de protéine G (Rasmussen, DeVree, *et al.* 2011).

c) Modifications structurales lors de l'activation

Parmi les RCPG cristallisés, sept sont connus à la fois dans leur état actif et non actif : Rho, β_2 AR, A_{2A} R, M2R, μ -OR, CB1R et ET_BR (Venkatakrisnan *et al.* 2016; Hua *et al.* 2017; Shihoya *et al.* 2016). La comparaison de ces structures permet de mettre en évidence certains réarrangements structuraux canoniques des RCPG de la famille *Rhodopsine*. Le réarrangement de TM5 suite à la liaison de l'agoniste a été décrit pour de nombreux récepteurs (Rasmussen, Choi, *et al.* 2011; Oldham & Hamm 2008; Rasmussen, DeVree, *et al.* 2011). Il entraîne une rotation et un écartement de la partie cytoplasmique de TM6, ouvrant l'accès à plusieurs acides aminés impliqués dans la liaison avec la protéine G et modifie les interactions entre les TM au niveau cytoplasmique (Flock *et al.* 2015). Dans le cas de Rho, ce réarrangement de TM5 fait suite à l'ouverture de ECL2 (Ahuja *et al.* 2009). La liaison canonique entre TM3 et TM6 est rompue et TM3 vient former de nouvelles interactions polaires avec la Tyr du motif hautement conservé NPxxY de TM7 (Figure 9) (Huang *et al.* 2015; Wu *et al.* 2012; Venkatakrisnan *et al.* 2016). L'interaction entre TM7 et TM3 n'est pas possible à l'état non actif d'une part à cause de

leur éloignement mais également à cause de l'interaction de TM7 avec TM1 et H8 (Venkatakrisnan *et al.* 2016).

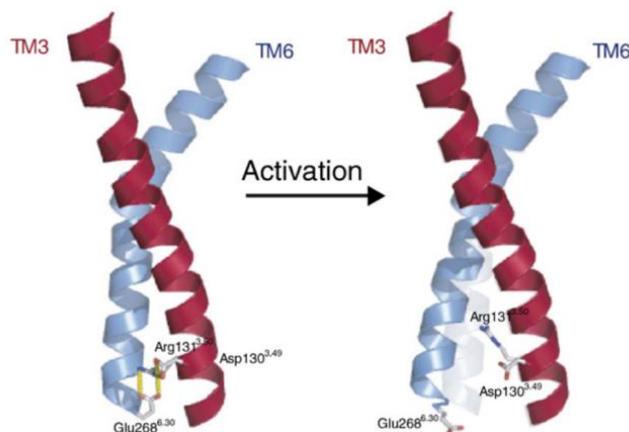


Figure 9 – Modélisation de la rupture de la liaison entre TM3 (Arg^{3.50}) et TM6 (Glu^{6.30}) suite à l'activation du récepteur β₂AR. (Kobilka 2007).

d) Liaison de la protéine G

Une protéine G est composée de trois sous-unités α, β et γ. Dans son état inactivé, la sous-unité α (Gα) est ancrée à la membrane du côté intracellulaire et possède une guanosine 5'-diphosphate (GDP), qui lui donne son nom de protéine G. Lors de la liaison d'un agoniste sur un RCPG, la GDP est libérée et la protéine G vient former un complexe de haute affinité avec le récepteur. Gα recrute alors une guanosine 5'-triphosphate (GTP) ce qui induit sa dissociation des sous-unités Gβγ. Les trois sous-unités vont interagir indépendamment avec différents effecteurs et activer diverses voies de signalisation. La GTP liée à la sous-unité Gα est alors rapidement hydrolysée en GDP, ce qui induit la fin de la signalisation intracellulaire. La protéine G trimérique se reforme alors dans son état inactivé (Figure 10) (Duc *et al.* 2015; Bockaert 1995).

D'un point de vue structural, Gα se compose de deux domaines : un domaine Ras-like, soit un feuillet β à six brins et cinq hélices α, et un domaine en hélice α. La poche de liaison du nucléotide, GDP ou GTP, se trouve à l'intersection entre ces deux domaines. L'activité GTPase est portée par le domaine Ras-like, qui comporte également le site de fixation à Gβγ. Gγ est essentielle à l'expression et au repliement correct de Gβ et elles sont indissociables en condition physiologique. La sous-unité Gβ se compose d'une hélice α en N-terminale et d'un ensemble de sept feuillets β à quatre brins antiparallèles. Elle interagit avec Gγ par formation d'une superhélice (Duc *et al.* 2015). Chez l'humain, il existe 21 sous-unités α différentes, 6 sous-unités β et 12 sous-unités γ. La multitude de combinaisons possibles des différentes sous-unités expliquent la vaste diversité des réponses intracellulaires liées à l'activation des RCPG.

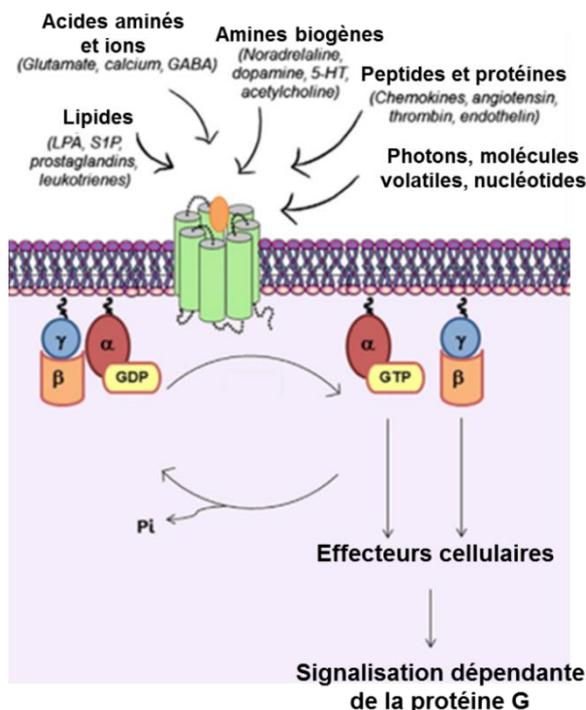


Figure 10 – Cycle d’activation de la protéine G. Les RCPG peuvent être activés par une grande variété chimique de ligands. Après fixation d’un agoniste, la protéine G se lie au récepteur et libère la GDP. La protéine G se dissocie alors en $G\alpha$ d’un côté et $G\beta\gamma$ de l’autre pour déclencher différentes voies de signalisation intracellulaire. $G\alpha$ recrute une GTP et la protéine G retrouve son état inactivé après hydrolyse du GTP en GDP. GDP : guanosine 5'-diphosphate ; GTP : guanosine 5'-triphosphate (modifié d’après Sánchez-Fernández *et al.* 2014).

Il n’existe que deux structures cristallographiques de RCPG complexés avec une protéine G : β_2AR avec une protéine G_s et $A_{2A}R$ avec une mini- G_s synthétique (Carpenter *et al.* 2016; Rasmussen, DeVree, *et al.* 2011). Il ressort plusieurs points communs de ces études. La protéine G se lie essentiellement par l’hélice α_5 du domaine Ras-like de $G\alpha$ (Figure 11-a). Elle établit une vingtaine d’interactions avec les TM3, 5 et 6 et les ICL2 et 3 pour β_2AR et les TM3, 5, 6 et 7, H8 et ICL2 pour $A_{2A}R$. Pour les deux récepteurs, l’Arg³⁵⁰ du récepteur est impliqué dans une interaction forte avec la Tyr391 de l’hélice 5 de $G\alpha$ (Rasmussen, DeVree, *et al.* 2011; Carpenter *et al.* 2016). On peut noter la présence d’un motif hydrophobe très conservé de l’hélice 5 de $G\alpha$ fortement impliqué dans l’interaction (Flock *et al.* 2015). De plus, une complémentarité des charges entre le récepteur chargé positivement et la protéine G pourrait contribuer à la liaison (Cherezov *et al.* 2007). Au niveau de la protéine G, une importante rotation de 127° du domaine à hélices α vers le domaine Ras-like a été observée dans le complexe $\beta_2AR-G\alpha_s$ (Figure 11-b) (Rasmussen, DeVree, *et al.* 2011). Ce mouvement est probablement en rapport avec la libération de la GDP. Les détails ne sont pas clairement élucidés mais cela fait probablement suite à des réarrangements internes, la zone d’interaction protéine G-récepteur et le site de liaison de la GDP étant éloignés de 30 Å. Si de nombreuses études tendent à penser que $G\beta\gamma$ entre également en contact avec le récepteur, la cristallisation du complexe $\beta_2AR-G\alpha_s$ n’a pas pu confirmer cette hypothèse (Rasmussen, DeVree, *et al.* 2011).

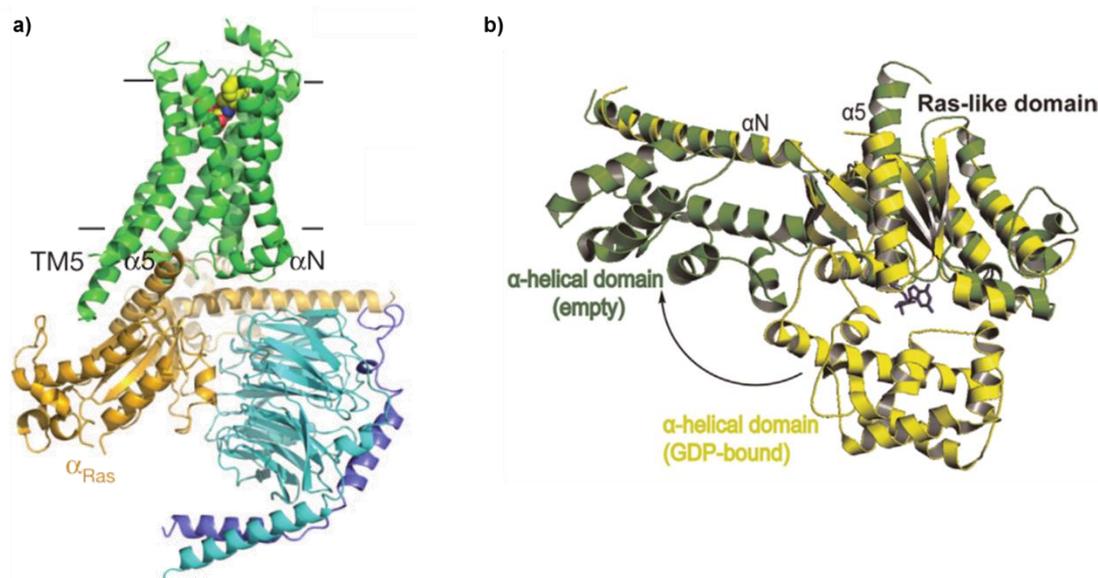


Figure 11 – Interaction de la protéine G avec un RCPG et modifications conformationnelles de la sous-unité G α . **a)** Structure cristallographique localisée et orientée dans la membrane du complexe formé par β_2 AR (vert) avec un antagoniste (sphères jaunes) et la protéine G α_s (orange). G α_s est liée avec G β (cyan) et G γ (violet) (Rasmussen, DeVree, *et al.* 2011). **b)** Comparaison de la protéine G à l'état inactivé lorsque la GDP est liée (jaune, PDB : 1GP2) et à l'état couplé au RCPG sans la GDP (vert, PDB : 3SN6). La GDP est représentée en stick bleu. La liaison au récepteur provoque un important déplacement du domaine à hélices α , ouvrant ainsi la poche de liaison du nucléotide (Duc *et al.* 2015).

B. Signalisation intracellulaire des RCPG

1) Cycle de désensibilisation et internalisation

La liaison d'un agoniste sur les RCPG provoque une activation transitoire des voies de signalisation qui prend fin lorsque le récepteur est phosphorylé par des kinases spécifiques des RCPG (GRK). La phosphorylation permet le recrutement de la β -arrestine, une protéine cytosolique, qui « désensibilise » le récepteur en se fixant et en empêchant la liaison de la protéine G. Le complexe β -arrestine-récepteur est alors internalisé par endocytose (Lutz *et al.* 1990; Bowen-Pidgeon *et al.* 2001; Innamorati *et al.* 1997; Shenoy & Lefkowitz 2011). Il a été démontré que la Tyr du motif hautement conservé NPxxY du TM7 était indispensable à l'internalisation du récepteur (Bouley *et al.* 2003). Soit les RCPG se dissocient rapidement de la β -arrestine et sont recyclés à la membrane comme c'est le cas de β_2 AR ou V1aR, soit ils forment un complexe intracellulaire stable avec la β -arrestine et peuvent alors être recyclés plus lentement ou dégradés comme par exemple AT1 ou V2R (Oakley *et al.* 2000).

2) Signalisation dépendante des protéines G

Les protéines G initient différentes voies de signalisation en fonction de leur sous-unité α . On distingue les protéines $G\alpha_s$ (deux membres), $G\alpha_i/o$ (neuf membres), $G\alpha_q/11$ (quatre membres) et $G\alpha_{12/13}$ (deux membres) (Duc *et al.* 2015; Syrovatkina *et al.* 2016). Les protéines $G\alpha_s$ sont responsables de l'activation de l'adénylate cyclase (AC), une enzyme qui convertit l'adénosine triphosphate (ATP) intracellulaire en adénosine monophosphate cyclique (AMPC) (Bondke Persson 2013). À l'inverse, les protéines $G\alpha_i/o$ diminuent le taux d'AMPC intracellulaire par inhibition de l'AC (O'Hayre *et al.* 2014). Les protéines $G\alpha_q$ activent la phospholipase C- β , qui clive le phosphatidylinositol-4,5-diphosphate en diacylglycérol et en inositol-1,4,5-triphosphate (IP₃) et augmente le Ca²⁺ intracellulaire (O'Hayre *et al.* 2014). Les protéines $G\alpha_{12/13}$ interagissent avec différentes petites GTPases et d'autres effecteurs intracellulaires (Neves *et al.* 2002).

De son côté, la sous-unité $\beta\gamma$ forment un dimère qui régule directement ou indirectement de nombreux effecteurs cellulaires, dont parfois ceux déjà régulés par $G\alpha$. Parmi les cibles les mieux connues des protéines $G\beta\gamma$, nous pouvons citer les canaux potassiques cardiaques Kir3, les canaux calciques voltage-dépendants Ca_v1, 2 et 3, certaines isoformes de l'adénylate cyclase, les phospholipases C, mais également directement les RCPG ou les GRK (Khan *et al.* 2013).

3) Signalisation indépendante des protéines G

Récemment, des voies de signalisation n'impliquant pas la protéine G mais directement la β -arrestine ont été mises en évidence. D'une part, la liaison d'un agoniste au récepteur peut induire le recrutement de la β -arrestine qui interagit à son tour avec d'autres protéines de signalisation, comme les tyrosine kinases et les kinases régulées par un signal extracellulaire (ERK) (Luttrell & Lefkowitz 2002; Shenoy & Lefkowitz 2011). La β -arrestine est également associée à une signalisation intracellulaire lorsqu'elle induit une internalisation prolongée des RCPG (Thomsen *et al.* 2016).

C. Le récepteur de type 2 à la vasopressine

Le récepteur de type 2 à la vasopressine (V2R), couplé à une protéine $G\alpha_s$, appartient à un groupe de quatre récepteurs homologues avec les deux récepteurs de type 1 à la vasopressine (V1aR et V1bR) et le récepteur à l'ocytocine (OTR), tous les trois couplés à une protéine $G\alpha_q/11$. V1aR participe, entre autres, à la vasoconstriction par des mécanismes centraux et périphériques multiples, et joue plusieurs fonctions au niveau hépatique (Koshimizu *et al.* 2012). Au niveau périphérique, V1bR stimule la sécrétion de l'hormone corticotrope ACTH et au niveau central, son implication dans plusieurs fonctions cognitives a été démontrée plus récemment (mémoire, apprentissage ou comportement) (Koshimizu *et al.* 2012). V2R contrôle la réabsorption finale de l'eau dans

les tubes collecteurs du rein. Enfin, OTR, très largement distribué dans l'organisme au niveau central et périphérique, concourt, entre autres, au comportement social et aux fonctions reproductives (Caldwell *et al.* 2008; Juul *et al.* 2014; Gimpl & Fahrenholz 2001).

1) La vasopressine

L'arginine-vasopressine (AVP), également appelée hormone antidiurétique, est connue depuis la fin du XIX^{ème} siècle et sa séquence depuis les années 50 : Cys-Tyr-Phe-Gln-Asn-Cys-Pro-Arg-Gly-NH₂, avec les deux cystéines formant un pont disulfure (Turner *et al.* 1951; Oliver & Schafer 1895). Elle peut se lier aux quatre récepteurs du groupe VR/OTR (Birnbaumer *et al.* 1992). De plus, elle intervient dans le cycle cellulaire au moment de la mitose, elle participe à la survie cellulaire et peut jouer le rôle d'inhibiteur de l'apoptose (Miller *et al.* 2013).

La synthèse de l'AVP a lieu dans l'hypothalamus (Burbach *et al.* 2001). La provasopressine, une préhormone de 164 acides aminés, est transportée et stockée par les axones des noyaux jusqu'au lobe postérieur de l'hypophyse, ou neurohypophyse (Caldwell *et al.* 2008). La pro-AVP est alors clivée pour libérer trois peptides : l'AVP dans sa conformation active, la neurophysine II (un transporteur protéique) et la copeptine (Morgenthaler 2010). Chez un sujet en bonne santé, la concentration circulante d'AVP est de l'ordre de 0,3 à 0,5 pg/ml (Bankir 2001). La sécrétion d'AVP fait suite à deux types de stimuli. Le premier correspond à une variation de la pression osmotique détectée par les osmorécepteurs, des neurones situés dans l'hypothalamus. Une augmentation de la pression osmotique de 1 % suffit à augmenter la concentration d'AVP de 1 pg/ml (Bankir 2001). Le deuxième type de stimulus correspond à une baisse importante du volume plasmatique, comme par exemple lors d'une hémorragie, et est détecté par des récepteurs cardiovasculaires sensibles à la pression, (Bankir 2001). La concentration plasmatique d'AVP est alors fortement augmentée, ce qui active à la fois V2R pour retenir l'eau au niveau rénal et V1aR afin de provoquer une vasoconstriction. L'hormone est ensuite dégradée par la voie des protéases et excrétée dans l'urine. À cause de sa petite taille, de sa courte demi-vie plasmatique (18 minutes) et de son interaction avec les plaquettes, l'AVP est difficile à doser dans le sang. C'est la copeptine, copeptide de l'AVP particulièrement stable dans le sang, qui est dosée à la place, les deux peptides étant sécrétés de façon équimolaire (Morgenthaler 2010).

2) Localisation et fonctions de V2R

Jusqu'à récemment, V2R n'avait été observé que dans la partie distale du néphron, unité fonctionnelle du rein, et dans les tubes collecteurs (description plus détaillée dans la partie III.A.2 de l'Introduction) où il exerce son activité antidiurétique par l'intermédiaire de la voie de signalisation dépendante de l'AMPc qui régule l'expression à la membrane de canaux aqueux, les aquaporines 2 (AQP2) (Mutig *et al.* 2007). Une activité mitogène a également été décrite dans ces mêmes populations cellulaires, activée par signalisation

indépendante des protéines G, impliquant la voie des ERK1 (Alonso *et al.* 2009). En dehors des tissus rénaux, V2R est exprimé dans les cellules endothéliales où il participe au contrôle de la sécrétion du facteur de coagulation von Willebrand via la voie de signalisation dépendante de l'AMPc (Kaufmann *et al.* 2000). V2R se trouve également dans l'oreille interne où il est associé à l'expression d'AQP2 et participe très probablement à la physiopathologie de la maladie de Ménière (Eckhard *et al.* 2012). Cependant, il semble que l'expression d'AQP2 ne soit pas dépendante de l'AMPc (Nevoux *et al.* 2011). Récemment, il a été démontré que les récepteurs V1aR, V2R et OTR participent à l'homéostasie osseuse dans les ostéoclastes et ostéoblastes (Tamma *et al.* 2013; Sun *et al.* 2016). Enfin, tous les sous-types de récepteurs à la vasopressine ont pu être observés dans les tissus tumoraux, dont le cancer du sein et le cancer pulmonaire à petites cellules (North 2000).

3) Signalisation différentielle induite par V2R

a) **Activation de ERK par transactivation d'un récepteur tyrosine kinase**

La transactivation des récepteurs tyrosine kinase par des RCPG est une voie de signalisation indépendante des protéines G décrite depuis maintenant plusieurs années. Concernant V2R, le mécanisme d'action et les nombreux intermédiaires impliqués ont été mis en évidence récemment *in vitro* et *in vivo* (Oligny-Longpré *et al.* 2012). L'activation de V2R par l'AVP permet la phosphorylation de la tyrosine kinase src, elle-même responsable de l'activation d'une métalloprotéase, encore non identifiée. Cette dernière permet la fonctionnalisation extracellulaire du facteur de croissance insulinique IGF-1 qui active alors son récepteur IGFR. Il s'ensuit l'activation dépendante de la β -arrestine-1 de ERK1/2, responsable de l'activité mitogène de l'AVP dans les tissus exprimant V2R (Alonso *et al.* 2009).

b) **Internalisation**

Après endocytose, V2R est très peu recyclé à la membrane mais est associé à une signalisation prolongée (Feinstein *et al.* 2013). Il a été démontré qu'un supercomplexe intracellulaire AVP-V2R- β -arrestine augmentait le temps de signalisation par la voie de l'AMPc au-delà de 20 minutes. Cela va à l'encontre du modèle selon lequel le recrutement de la β -arrestine empêche la liaison de $G\alpha$. Dans le modèle proposé par Thomsen *et al.* 2016, la β -arrestine interagirait avec $G\beta\gamma$ (Thomsen *et al.* 2016). La signalisation prend fin lors de la prise en charge du complexe par un rétromère, un trimère protéique qui adresse les protéines membranaires des endosomes vers le réseau transgolgien (Feinstein *et al.* 2013). En revanche, cet effet prolongé n'a pas été observé lors de l'activation de V2R par l'ocytocine (Feinstein *et al.* 2013). Le récepteur est ensuite dégradé, majoritairement par la voie lysosomale, et le taux stable de V2R dans la membrane cellulaire serait dû à une synthèse *de novo* de récepteurs (Bouley *et al.* 2005).

Plusieurs mutations ponctuelles sont connues pour modifier l'activité ou l'internalisation de V2R. Les mutations Asp136^{3,49}Ala, Arg137Cys^{3,50} et Arg137Leu^{3,50} sont associées à une activation constitutive du récepteur plus ou moins importante (Morin *et al.* 1998; Tenenbaum *et al.* 2009). La mutation Arg137His^{3,50} provoque l'internalisation constitutive du récepteur et l'absence de signalisation par l'AMPc (Barak *et al.* 2001). La mutation Arg181Cys^{4,67} agit comme un récepteur biaisé dont la voie de la β -arrestine n'est pas stimulée alors que celle de l'AMPc l'est partiellement (Armstrong *et al.* 2013). La mutation Met311Val^{7,39} bloque l'activité AMPc (Armstrong *et al.* 2013).

c) Dimérisation

La dimérisation des RCPG *Rhodopsine* a déjà été démontrée chez de nombreux récepteurs. L'homo comme l'hétérodimérisation ont été mises en évidence entre V1aR, V2R et OTR et ces dimères sont exprimés à la surface des cellules (Terrillon *et al.* 2003; Schulz *et al.* 2000). En ce qui concerne les récepteurs AVP/OT, des dimères ont été observés dans le réticulum endoplasmique (RE), ce qui laisse supposer une association constitutive et précoce, probablement liée au taux d'expression de chaque protomère par la cellule (Terrillon *et al.* 2003). Ainsi, le taux de dimérisation serait variable en fonction des tissus. La dimérisation influence le cycle cellulaire des récepteurs. Alors que V2R et V1aR ont des cycles cellulaires différents (dégradation majoritaire après internalisation pour V2R et recyclage à la membrane rapide pour V1aR), il a été montré *in vitro* que l'hétérodimère formé par ces deux récepteurs est internalisé et recyclé selon la voie du protomère activé (Terrillon *et al.* 2004).

4) Organisation structurale de V2R

Il existe assez peu d'informations structurales concernant les RCPG sensibles aux peptides. Seulement dix récepteurs de la famille *Rhodopsine* ont été cristallisés avec ce type de ligand : NTSR1, δ -OR, κ -OR, μ -OR, NOP, CXCR4, CCR5, PAR1, CB1R et ET_BR. Toutes les structures ont été obtenues en complexe avec des ligands non peptidiques à l'exception de CXCR4, lié à un antagoniste peptidique cyclique CVX15, de NTSR1, co-cristallisé avec la moitié C-terminale de son agoniste naturel NTS et de ET_BR lié à son agoniste naturel l'endothéline-1 (ET-1) (White *et al.* 2012; Egloff *et al.* 2014; Wu *et al.* 2010; Shihoya *et al.* 2016). Quelques caractéristiques générales peuvent être déduites d'après les structures existantes et comparées aux données connues pour V2R (Krumm & Grishammer 2015). Concernant V2R, seule la structure de son ICL3, indispensable à la liaison de la protéine *Gas*, en complexe avec une protéine chaperonne gC1qR a été déterminée par RMN (Bellot *et al.* 2009; Granier *et al.* 2004).

Le site de liaison des ligands peptidiques est, le plus souvent, largement exposé au solvant. Cependant, il peut être partiellement recouvert par l'extrémité de la partie N-terminale du récepteur et ses ECL1 et 2, à l'exception de PAR1 pour lequel ECL2 couvre totalement le site de liaison. Concernant V2R, les déterminants moléculaires démontrés comme impliqués dans le site de fixation des ligands sont en adéquation avec cette

description. Il s'agit des résidus Arg100 (ECL1), Asp103 (ECL1), Lys202 (ECL2) et G304 (TM7) (Cotte *et al.* 1998). Une importante complémentarité de charges participe à la liaison du ligand, comme c'est le cas pour les complexes NTS-NTSR1 et dynorphine- κ -OR (Krumm & Grisshammer 2015). La co-cristallisation de ET_BR et ET-1 a montré un site orthostérique faisant appel à toute la partie extracellulaire du récepteur, à l'exception de TM1, ce qui correspond à une surface d'interaction exceptionnelle d'environ 1500 Å² (Shihoya *et al.* 2016).

Un modèle à deux sites de fixation a été proposé pour CXCR4 : un site en surface pour l'affinité et la spécificité et un site plus profond pour la signalisation (Wu *et al.* 2010). Pour V2R, ce sont trois sites de fixation de l'agoniste séparés par des barrières énergétiques qui ont été proposés par simulation en dynamique moléculaire. L'AVP se fixerait dans un premier temps dans le vestibule, un site de liaison externe situé entre les ECL2 et 3 avant de s'enfoncer vers le site de liaison intermédiaire puis le site orthostérique (Saleh *et al.* 2016). La fixation de la protéine G serait à l'origine de l'abaissement de la barrière énergétique et permettrait le passage du site intermédiaire vers le site orthostérique (Saleh *et al.* 2016).

III. Les polykystoses rénales

Les polykystoses rénales (PKR) sont des maladies génétiques héréditaires qui, comme leur nom l'indique, se traduisent par la formation de kystes sur les reins, affectant à terme le bon fonctionnement de cet organe et engendrant de nombreux dommages collatéraux.

Afin de comprendre au mieux ces pathologies, nous commencerons par la description anatomique et physiologique des reins. Puis nous nous pencherons sur la physiopathologie de ces maladies, et enfin nous ferons l'état des lieux des thérapies actuellement disponibles et envisagées.

A. Description anatomique et physiologique des reins

Les reins sont les organes responsables du maintien de la pression artérielle, de la régulation de la composition du sang et de l'élimination des déchets métaboliques de l'organisme (Widmaier *et al.* 2008; Marieb & Hoehn 2010; Guénard 2009).

1) Description générale

Les reins sont situés dans la partie postérieure de la paroi abdominale, derrière le péritoine. En forme de haricot, les dimensions moyennes chez l'adulte sont de 12 cm de long, 6 cm de large et 3 cm d'épaisseur, pour un poids moyen de 150 g. Ils sont entourés de trois couches de tissus qui les soutiennent et les protègent : la capsule fibreuse rénale, la capsule adipeuse rénale et la *fascia* rénale, de l'extérieur vers l'intérieur. Le rein se compose de trois parties : le cortex, la médulla et le bassinnet. Ce dernier est connecté avec l'uretère pour permettre le passage de l'urine vers la vessie.

Les reins sont richement vascularisés. Environ 1200 mL de sang arrivent aux reins chaque minute par les artères rénales. Celles-ci se ramifient largement dans le tissu cortical en rayonnant vers la partie périphérique des reins où elles forment un réseau complexe de microvaisseaux alimentant la fonction de filtration du rein.

2) Le néphron, unité fonctionnelle du rein

Le néphron constitue l'unité fonctionnelle rénale. Chaque rein en contient environ un million. Un néphron se compose d'un corpuscule, situé dans le cortex, et d'un tubule, de taille variable. On distingue les néphrons corticaux, majoritaires et exclusivement dans le cortex, et les néphrons juxtamédullaires, dont la partie tubulaire s'étend plus ou moins profondément dans la médulla (Figure 12-a).

a) **Le corpuscule rénal**

Le corpuscule rénal est une vésicule formée par la capsule glomérulaire, ou capsule de Bowman, qui entoure un bouquet de microcapillaires sanguins issus des artérioles afférentes : les glomérules. La paroi des capillaires glomérulaires constitue la membrane de filtration. Cette membrane particulièrement poreuse laisse filtrer de grandes quantités de liquide : il s'agit du filtrat glomérulaire. Celui-ci s'accumule dans la capsule glomérulaire avant de poursuivre dans la partie tubulaire du néphron. Les éléments du sang non filtrés quittent le corpuscule par les artérioles efférentes (Figure 12-b).

b) **Le tubule rénal**

Le tubule rénal est composé du tube contourné proximal (TCP), de l'anse de Henlé et du tube contourné distal (TCD) (Figure 12-a). Le tubule rénal débouche dans un tube collecteur (TC), dit de Bellini, qui reçoit les filtrats de nombreux néphrons. Les différents TC fusionnent à leur tour pour déverser l'urine dans le bassinnet.

La paroi du tubule rénal est formée d'une couche unique de cellules polarisées reposant sur une lame basale. Le pôle apical correspond au côté de la cellule en contact avec la lumière du tubule et le pôle basal correspond au côté en contact avec l'espace interstitiel. Les caractéristiques de ces cellules sont adaptées à leurs fonctions, variables selon les parties du néphron.

Les tubules sont cernés de capillaires issus des artérioles efférentes et rejoignent les veinules à proximité. Leur paroi poreuse permet le passage de substances par réabsorption depuis l'urine vers les capillaires ou, à l'inverse, par sécrétion depuis les capillaires vers la lumière tubulaire.

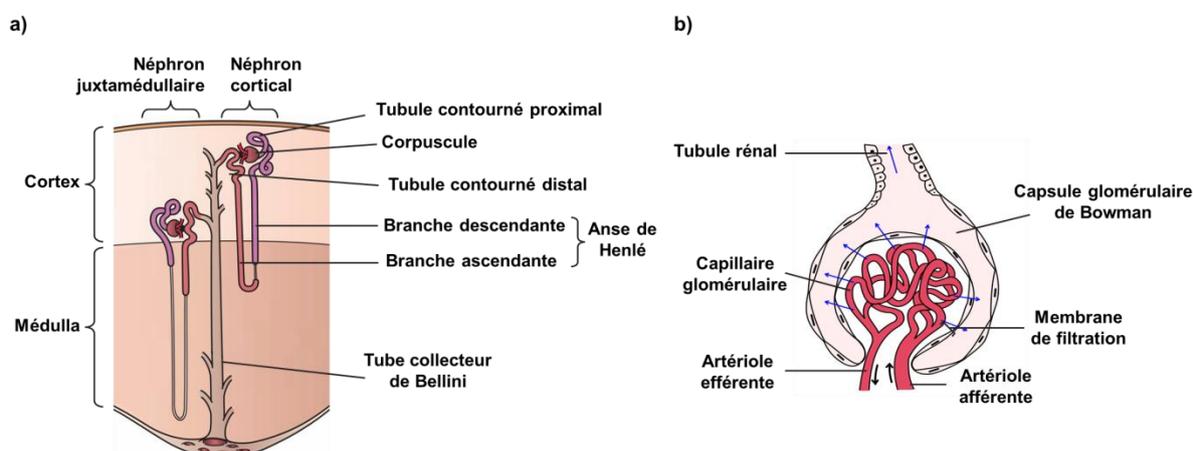


Figure 12 – Structure du néphron chez l'humain. a) Schéma des différents types de néphron dans le cortex et la médulla. b) Schéma du corpuscule rénal. Les flèches bleues indiquent le sens de circulation du filtrat glomérulaire.

3) Physiologie rénale

Le rein régule la composition du sang de façon à maintenir des concentrations en ions et en protéines compatibles avec le bon fonctionnement de l'organisme. Parallèlement, l'ajustement du volume d'eau influence directement la pression artérielle. Le rein participe ensuite à l'élimination des déchets métaboliques, parfois toxiques, pour empêcher leur accumulation dans l'organisme : urée issue des protéines, acide urique issu des acides nucléiques, créatinine issue de la créatine musculaire, *etc.* Cette fonction d'élimination s'applique également aux substances chimiques exogènes, tels que les médicaments ou les pesticides.

Le rein joue également une fonction endocrinienne puisqu'il sécrète plusieurs hormones : l'érythropoïétine qui stimule la croissance des globules rouges dans la moelle osseuse, et la rénine, premier intervenant du système rénine-angiotensine (SRA) qui régule la réabsorption de Na^+ et contrôle la pression artérielle.

Enfin, le rein possède une activité métabolique en participant à l'activation de la vitamine D, indispensable à l'absorption intestinale du Ca^{2+} .

a) La filtration glomérulaire

Chaque jour, environ 180 litres de filtrat glomérulaire sont produits par le corpuscule rénal. Le filtrat glomérulaire est composé des ions, des petites molécules organiques et d'une fraction de l'eau plasmatique du sang. Les éléments cellulaires et la

majorité des protéines du plasma sont retenus par la membrane de filtration, principalement selon leur poids moléculaire, avec une limite à 60 kDa. À ce phénomène s'ajoute la répulsion exercée par les glycoprotéines membranaires envers les protéines plasmatiques, toutes chargées négativement.

La filtration est possible grâce à la pression nette de filtration, qui correspond à la différence entre la pression hydrostatique glomérulaire, favorable à la filtration, et les pressions osmotique glomérulaire et hydrostatique capsulaire, s'opposant à cette filtration. En cas d'altération de l'intégrité de la membrane, les protéines peuvent passer dans le filtrat, provoquant une diminution, voire une inversion de la pression nette de filtration et donc l'arrêt de la filtration glomérulaire.

Le débit de filtration glomérulaire (DFG) correspond au volume de filtrat formé chaque minute par la totalité des glomérules rénaux. Chez l'adulte sain, il est de 90 mL/min/1,73 m². Il dépend de l'aire totale de filtration, de la perméabilité de la membrane et de la pression de filtration. Le calcul du DFG est un bon indicateur facile à suivre de l'état général du rein. Il peut être estimé par mesure de la clairance⁴ de la créatinine, une substance totalement filtrée et non réabsorbée par les reins. Sa mesure est utilisée pour classer les différents stades d'évolution d'une maladie rénale chronique (Tableau 2).

Tableau 2 – Classification des stades d'évolution de la maladie rénale chronique. (Haute Autorité de Santé 2012)

Stade	DFG (mL/min/1,73 m ²)	Définition
1	≥ 90	Maladie rénale chronique* avec DFG normal ou augmenté
2	Entre 60 et 89	Maladie rénale chronique* avec DFG légèrement diminué
3A	Entre 45 et 59	Insuffisance rénale chronique modérée
3B	Entre 30 et 44	
4	Entre 15 et 29	Insuffisance rénale chronique sévère
5	< 15	Insuffisance rénale chronique terminale

* Avec marqueurs d'atteinte rénale : albuminurie, hématurie, leucocyturie, ou anomalies morphologiques ou histologiques, ou marqueurs de dysfonction tubulaire, persistant plus de 3 mois (et à deux ou trois examens consécutifs).

b) Réabsorption et sécrétion tubulaire

Dans le tubule rénal, une partie des éléments du filtrat glomérulaire sont immédiatement réabsorbés. C'est le cas de pratiquement tous les nutriments organiques (glucose, acides aminés). L'eau et les ions sont en revanche réabsorbés en fonction des besoins de l'organisme.

La réabsorption est un mécanisme de transport sélectif des molécules de la lumière du tubule vers la circulation, par voie transcellulaire ou par voie paracellulaire. Selon les substances, la réabsorption peut être active ou passive. La majorité des transports actifs est

⁴ La clairance est la capacité d'un organe à éliminer un élément d'un fluide. Elle correspond au volume de fluide totalement épuré de cet élément par unité de temps.

couplée au transport actif de Na^+ par la pompe sodium-potassium adénosine triphosphate-dépendante (Na^+/K^+ -ATPase) (Figure 13). Grand nombre de substances possèdent un transporteur commun au Na^+ dans la membrane apicale qui les déplace contre leur gradient de concentration grâce à l'énergie générée par la pompe. La réabsorption passive déplace les solutés du milieu le plus concentré vers le milieu le moins concentré, sans utilisation d'énergie, par osmose, diffusion et diffusion facilitée. Elle est la conséquence de la réabsorption obligatoire de l'eau due au fort gradient osmotique imposé par les déplacements de Na^+ et autres solutés réabsorbés activement. Ce mouvement d'eau modifie le gradient de concentration des solutés non réabsorbés précédemment et provoque leur diffusion vers la circulation sanguine.

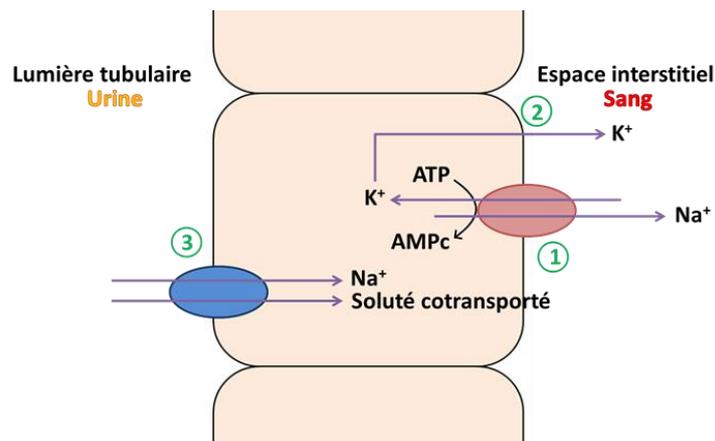


Figure 13 – Transport actif couplé au Na^+ dans le tubule rénal. (1) Transport actif primaire du Na^+ par la pompe Na^+/K^+ -ATPase. (2) Sortie du K^+ dans le sens du gradient de concentration. (3) Transport actif secondaire des solutés couplé à la réabsorption de Na^+ .

La sécrétion peut également être active ou passive. La sécrétion active se fait par des transporteurs spécifiques contre leur gradient de concentration des solutés concernés. Les ions sont principalement sécrétés passivement par des canaux perméables, comme c'est le cas du K^+ dans le TCD et le TC suite à sa réabsorption active par la pompe Na^+/K^+ -ATPase.

La majeure partie de la réabsorption se déroule dans le TCP qui réabsorbe la totalité du glucose, des acides aminés, du lactate, des peptides filtrés et de l'urée. Il réabsorbe également 60 à 70 % de l'eau, des ions Na^+ , K^+ , Ca^{2+} et Cl^- , ainsi que 80 % du HCO_3^- (Figure 14).

D'autre part, c'est dans les cellules pariétales du TCP qu'est produit le NH_4^+ à partir du NH_3 et des protons H^+ avant d'être sécrétés. La branche descendante de l'anse de Henlé est principalement une zone de transport passif d'eau et de quelques solutés. Sa branche ascendante est en revanche totalement imperméable à l'eau. C'est là que sont réabsorbés 15 % des ions Na^+ , Cl^- et HCO_3^- , 30 % des ions Ca^{2+} et Mg^{2+} ainsi que 30 % du NH_4^+ sécrété précédemment. Le TCD est en partie imperméable à l'eau. Il réabsorbe majoritairement les ions Na^+ , Cl^- , Ca^{2+} et Mg^{2+} (Figure 14).

La paroi du TC, perméable à l'eau, est composée de deux types de cellules épithéliales aux rôles bien définis : les cellules intercalaires sont impliquées dans le maintien de l'équilibre acido-basique du sang grâce à des transporteurs actifs des ions H^+ et HCO_3^- sensibles au pH et les cellules principales participent à l'homéostasie de l'eau et du Na^+ . La réabsorption de ces deux éléments est sous contrôle hormonal : la vasopressine pour l'eau et l'aldostérone pour le Na^+ .

Les substances exogènes, comme les médicaments liés aux protéines, sont sécrétées majoritairement au niveau du TCP et dans le TC (Figure 14).

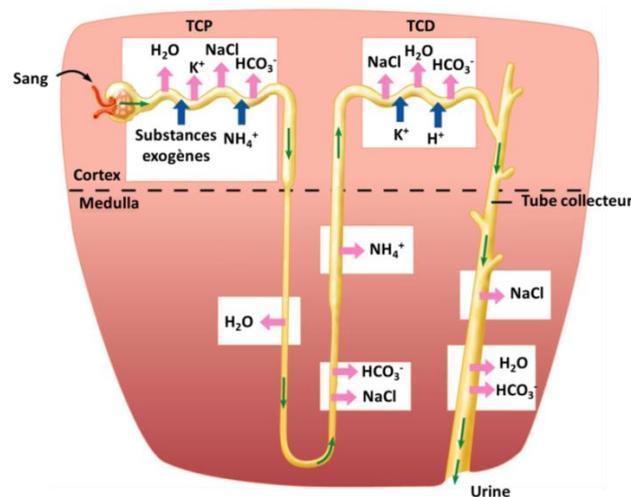


Figure 14 – Réabsorption et sécrétion tubulaire. Les ions subissent plusieurs mouvements entre réabsorption et sécrétions en fonction des différentes parties du néphron. L'eau est toujours réabsorbée tout au long du tubule, excepté dans la branche ascendante de Henlé dont la paroi est imperméable. Flèches roses : réabsorption ; flèches bleues : sécrétion ; flèches vertes : sens de circulation de l'urine. TCP : tube contourné proximal ; TCD : tube contourné distal

B. Description des cellules principales du tube collecteur

Dernière zone de transformation de l'urine pour acquérir sa composition et sa concentration définitive, le TC exerce ses fonctions grâce aux cellules intercalaires et aux cellules principales. Les différents dérèglements cellulaires mis en cause dans les PKR ont lieu au sein des cellules principales. Cette partie sera donc consacrée à la description de leur fonctionnement dans un contexte physiologique.

1) Régulation de l'osmolarité

C'est dans les tubes collecteurs que se déroule la réabsorption de l'eau en fonction des besoins de l'organisme, indispensable au maintien de l'osmolarité plasmatique (300 mOsm). Cette fonction est assurée par les cellules principales grâce à des canaux aqueux,

les aquaporines, dont l'expression à la membrane apicale est contrôlée par la vasopressine (AVP), via l'activation du récepteur de type 2 à la vasopressine (V2R), situé au pôle basal des cellules. En absence de ce contrôle, la diurèse est multipliée par dix et donne lieu à un syndrome polyuro-polydipsique, également appelé diabète insipide.

Les aquaporines (AQP) sont des protéines membranaires permettant le passage des molécules d'eau à travers la membrane plasmatique dans de nombreux tissus et entre autres dans le néphron. Au niveau des cellules principales, AQP2 est exprimée du côté apical, et AQP3 et AQP4 du côté basal (Nielsen *et al.* 1993; Wilson *et al.* 2013). L'expression à la membrane d'AQP2 est régulée par l'AVP. En absence d'AVP, AQP2 est principalement localisée dans des endosomes (Barile *et al.* 2005). Suite à l'activation de V2R, AQP2 est phosphorylée en quelques minutes par une phosphokinase A dépendante de l'adénosine monophosphate cyclique (AMPC) et passe dans la membrane apicale plasmatique par un phénomène d'exocytose dépendant de la mobilisation de calcium intracellulaire (Nielsen *et al.* 1995; Nishimoto *et al.* 1999; Chou *et al.* 2000). Après entrée d'eau dans la cellule, elle est endocytée pour être à nouveau stockée ou dégradée dans le milieu intracellulaire (Figure 15). La quantité d'AQP2 au niveau membranaire résulte de l'équilibre entre exocytose et endocytose du récepteur (Brown *et al.* 2008). Par ailleurs, il existe une réponse cellulaire globale permettant d'augmenter la quantité d'AQP2 dans la membrane apicale. Suite à une administration à long terme d'AVP, de quelques heures à quelques jours, la quantité d'AQP2 est significativement augmentée dans le TC (DiGiovanni *et al.* 1994). La quantité globale d'AQP2 dans la cellule correspond à la balance entre sa synthèse, sa sécrétion et sa dégradation intracellulaire. En effet, AQP2 peut être sécrétée dans l'urine par l'intermédiaire d'exosomes comme dégradée par la voie des lysosomes ou celle des protéasomes (Kanno *et al.* 1995; Pisitkun *et al.* 2004; Hasler *et al.* 2002; Kamsteeg *et al.* 2006).

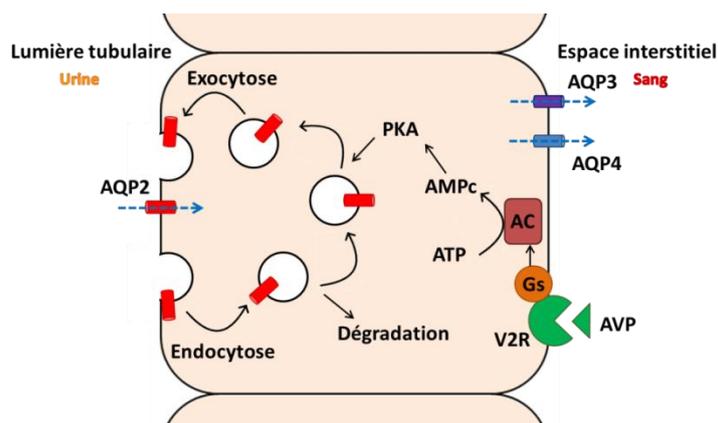


Figure 15 – Cycle cellulaire de l'aquaporine 2. Sous contrôle de l'AVP, AQP2 est exprimée à la membrane apicale des cellules épithéliales du TC en fonction des besoins de l'organisme. Lorsque le signal cesse, AQP2 est endocytée pour être soit recyclée, soit dégradée. L'eau sort de la cellule au pôle basal par les AQP3 et 4. Flèches bleues : sens de circulation de l'eau.

2) Fonction ciliaire

Au niveau apical, les cellules principales du tube collecteur possèdent un cil primaire unique, senseur du flux urinaire, qui régule l'entrée des ions Ca^{2+} à l'intérieur des cellules. Le Ca^{2+} transite à travers un complexe membranaire formé par la polycystine 1, la polycystine 2 et la fibrocystine qui contrôle son activité.

a) Le cil primaire

Le cil primaire est un organe immobile hautement compartimenté présent dans la plupart des types cellulaires et assurant une fonction de capteur de l'environnement extracellulaire (Lee *et al.* 2011). Il se présente sous la forme d'une projection de la membrane plasmatique supportée par un élément cytosquelettique, l'axonème, formé de neuf paires de microtubules organisées en anneau (Figure 16) (Singla & Reiter 2006). Le cil primaire se constitue durant l'interphase à partir d'une structure associée à la membrane, le corps basal ou centriole, et se résorbe au moment de la mitose (Yoder 2007).

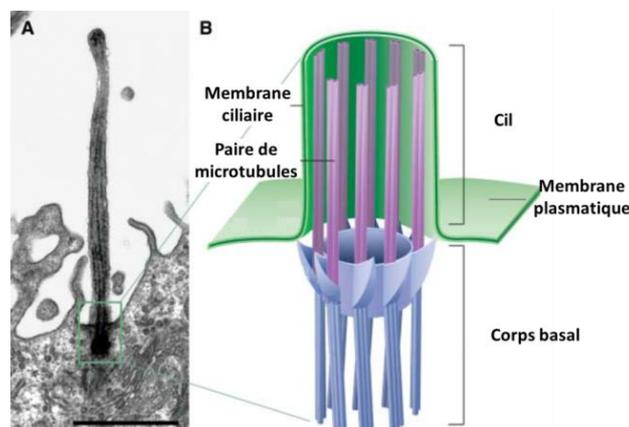


Figure 16 – Structure d'un cil primaire. A) Cil primaire vu par microscopie électronique. B) Schéma d'un cil primaire et de l'axonème (Singla & Reiter 2006).

b) La polycystine 1

La polycystine 1 (PC1) est une glycoprotéine à 11 segments transmembranaires (Hughes *et al.* 1995; Sandford *et al.* 1997). Sa longue partie N-terminale extracellulaire (3074 acides aminés) est composée de différents domaines conservés dont 16 répétitions d'un motif original appelé PKD, présentant une homologie de structure avec les domaines de type immunoglobuline (The International Polycystic Kidney Disease Consortium 1995; Bycroft *et al.* 1999). La partie C-terminale intracellulaire est plus courte et possède une superhélice (Qian *et al.* 1997).

PC1 est exprimée principalement dans la membrane plasmatique des cellules épithéliales tubulaires rénales, mais aussi dans les canaux hépatiques et pancréatiques, dans l'épithélium et dans l'endothélium de la peau et des vaisseaux sanguins, ainsi que dans les muscles lisses des parois des vaisseaux sanguins (Geng *et al.* 1996; Ibraghimov-

Beskrovnaya *et al.* 1997; Griffin *et al.* 1997). Au niveau du rein, cette protéine est localisée plus précisément dans la partie distale du tubule rénal, aussi bien dans la région corticale que médullaire : branche ascendante de Henlé, TCD et TC (Foggensteiner *et al.* 2000; Ibraghimov-Beskrovnaya *et al.* 1997).

Au niveau des cellules épithéliales, PC1 participe aux interactions cellule-cellule et cellule-matrice (Hughes *et al.* 1995; Ibraghimov-Beskrovnaya *et al.* 1997). D'autre part, PC1 régule négativement la voie de signalisation de mTOR (mammalian Target of Rapamycin), une kinase à sérine/thréonine essentielle dans le transport des protéines, la croissance et la prolifération cellulaire (Shillingford *et al.* 2006). De plus, un site de liaison intracellulaire à une protéine Gi/o a été mis en évidence, suggérant une fonction de RCPG pour PC1 afin de réguler négativement le taux d'AMPc intracellulaire (Parnell *et al.* 1998). Cette fonction est inhibée lors de l'association avec PC2 (Delmas *et al.* 2002; Delmas *et al.* 2004).

c) La polycystine 2

La polycystine 2 (PC2), également appelée TRPP2 pour transient receptor potential polycystin 2, est une glycoprotéine à six segments transmembranaires dont les deux extrémités terminales sont intracytoplasmiques et qui possède une superhélice en C-terminale (Mochizuki *et al.* 1996; Tsiokas *et al.* 1997; Cai *et al.* 1999).

Au niveau rénal, PC2 est exprimée dans les cellules épithéliales du TCD, majoritairement dans la zone médullaire, ainsi que dans les cellules des TC (Foggensteiner *et al.* 2000). Au niveau subcellulaire, elle a été identifiée principalement dans la membrane du réticulum endoplasmique (RE) en tant que canal cationique non sélectif perméable au Ca^{2+} , lui-même activé par la présence de Ca^{2+} intracytoplasmique (González-Perrett *et al.* 2001). Elle interagit également avec un autre canal calcique, le récepteur à l'IP₃, présent dans la membrane du RE (Sammels *et al.* 2010). À la membrane apicale des cellules épithéliales, PC2 s'associe d'une part avec PC1 au niveau des cils primaires pour former un canal calcique appelé complexe polycystine (détaillé dans le paragraphe suivant) et avec les récepteurs 4 vanilloïdes à potentiel transitoire pour former un nouveau canal calcique activé par le facteur de croissance épithélial (EGF) (Hanaoka *et al.* 2000; Zhang *et al.* 2013). PC2 joue un rôle primordial dans la régulation du taux de Ca^{2+} intracellulaire, lui-même impliqué dans la protection des cellules contre l'apoptose (Wegierski *et al.* 2009).

En dehors du rein, PC2 est présente dans les cellules des muscles lisses vasculaires, tout comme PC1 (Torres *et al.* 2001).

d) Le complexe polycystine

Au niveau des cils primaires des cellules principales des TC, le complexe polycystine forme un récepteur mécanosensible aux contraintes de cisaillement imposées par le débit urinaire (Nauli *et al.* 2003). Par un mécanisme encore mal connu, le fléchissement des cils primaires conduit à l'entrée de Ca^{2+} à l'intérieur de la cellule (Nauli

et al. 2003; Praetorius & Spring 2001). Ce flux calcique déclenche à son tour la libération du Ca^{2+} stocké dans des réserves intracellulaires, telles que le RE (Praetorius & Spring 2001; Aguiari *et al.* 2003).

Le complexe polycystine joue un rôle dans le contrôle du cycle cellulaire. Par exemple, il a été démontré que PC1 séquestre le facteur de transcription STAT6 au niveau de la membrane du cil primaire (Low *et al.* 2006). De même, le complexe, qui est également localisé au niveau de la membrane plasmique, retient le facteur de transcription Id2 par liaison à PC2 (Li *et al.* 2005).

e) Régulation du complexe polycystine par la fibrocystine

La fibrocystine (FC), également appelée polyductine, est issue d'un des plus longs gènes identifiés chez l'homme (470 kb) et génère de nombreuses isoformes de la protéine (Onuchic *et al.* 2002). FC est composée d'un seul domaine transmembranaire, d'une longue partie N-terminale extracellulaire et d'une partie C-terminale intracellulaire courte à quatre sites de phosphorylation potentiels (Ward *et al.* 2002; Xiong *et al.* 2002; Onuchic *et al.* 2002). Par homologie structurale, FC est prédite comme étant un récepteur membranaire et intervenant dans des réactions de régulation de l'adhésion cellulaire, de répulsion et de prolifération ou encore de régulation et de maintien du TC et des canaux hépatiques biliaires (Onuchic *et al.* 2002; Ward *et al.* 2002; Sweeney & Avner 2006). Si son rôle n'est pas encore clairement établi, des interactions avec différentes voies de signalisation ont été mises en évidence. Par exemple, FC interagit avec la voie de la phosphoinositide 3 kinase/protéine kinase B, impliquée dans les phénomènes de prolifération cellulaire et d'apoptose (Sun *et al.* 2011).

FC est essentiellement localisée dans les cellules épithéliales du rein, du foie et du pancréas (Menezes *et al.* 2004; Ward *et al.* 2002; Onuchic *et al.* 2002). Dans le rein, elle s'exprime dans le TC cortical et médullaire, et plus faiblement dans le TCP et dans le TCD (Menezes *et al.* 2004). Au niveau cellulaire, elle est localisée essentiellement dans la membrane plasmique apicale, au niveau des cils primaires et dans les corps basaux des cellules rénales épithéliales (Menezes *et al.* 2004; Wang *et al.* 2004; Ward *et al.* 2003; Zhang *et al.* 2004).

Dans les cils primaires, FC et PC2 interagissent physiquement par l'intermédiaire du complexe protéique kinésine-2⁵ (Wu *et al.* 2006). D'un point de vue fonctionnel, la non expression de FC est corrélée à une diminution de la présence de PC2 dans les cils primaires de l'épithélium rénal (Kim *et al.* 2008). De même, une diminution de la concentration intracellulaire de Ca^{2+} a été observée lorsque FC est inactivée (Yang *et al.* 2007). Ces résultats confirment l'hypothèse selon laquelle FC régule l'expression de PC2 dans les cils primaires, et par conséquent le fonctionnement du complexe polycystine (Wu *et al.* 2006; Kim *et al.* 2008). D'autre part, il a été démontré chez la souris que les gènes

⁵ La kinésine-2 appartient à la famille des kinésines, un groupe de protéines motrices associées aux microtubules et impliquées dans les transports protéiques.

PKD1 (PC1), *PKD2* (PC2) et *PKHD1* (FC) agissent ensemble pour la mise en place et le maintien de l'intégrité du tubule rénal (Garcia-Gonzalez *et al.* 2007).

C. Physiopathologie des polykystoses rénales

Les PKR se caractérisent par une physiopathologie complexe. Après avoir décrit le fonctionnement non pathologique des milieux et acteurs concernés, nous allons pouvoir comprendre au mieux la façon dont ils sont impactés dans la maladie et les nombreuses conséquences engendrées.

1) Génétique

Il existe deux formes de PKR : une forme autosomique dominante (PKRAD) et une forme autosomique récessive (PKRAR). Elles se différencient essentiellement par les gènes mutés, la vitesse de progression de la maladie et leur sévérité.

a) La forme autosomique dominante

Deux gènes sont mis en causes dans les PKRAD : *PKD1*, à l'origine des PKRAD dites de type 1, et *PKD2* pour les PKRAD de type 2 (Mochizuki *et al.* 1996; The European Polycystic Kidney Disease Consortium 1994; The International Polycystic Kidney Disease Consortium 1995).

Les mutations sur *PKD1* concernent environ 78 % des cas, celles sur *PKD2*, 13 % des cas et aucune mutation n'a été détectée dans les 9 % de cas restants (Audrézet *et al.* 2012; Rossetti *et al.* 2007). Si ces mutations non détectées correspondent probablement à des mutations atypiques des gènes *PKD1* ou *PKD2*, l'hypothèse d'un troisième locus reste soupçonnée (Paul *et al.* 2014). Les PKRAD présentent une très importante hétérogénéité allélique, qui se retrouve au niveau phénotypique : à ce jour, 2323 mutations différentes de *PKD1* ont été décrites, dont 1273 pathogènes, et 278 pour *PKD2*, dont 202 pathogènes (PKD Foundation Web Site). Au sein d'une famille porteuse de la même mutation germinale, une importante variabilité des symptômes a été observée, variant d'une forme sévère à l'absence totale de signe clinique. D'autre part, des études de microdissections des tubules ont montré que chaque kyste dérive d'une seule cellule et que seulement 1 % des néphrons donne lieu à la formation de kystes (Qian & Watnick 1999). Ces deux observations ont conduit à l'hypothèse qu'une seconde mutation somatique est nécessaire pour déclencher la kystogenèse dans les deux types de PKRAD (Figure 17) (Qian *et al.* 1996; Qian & Watnick 1999; Pei *et al.* 1999).

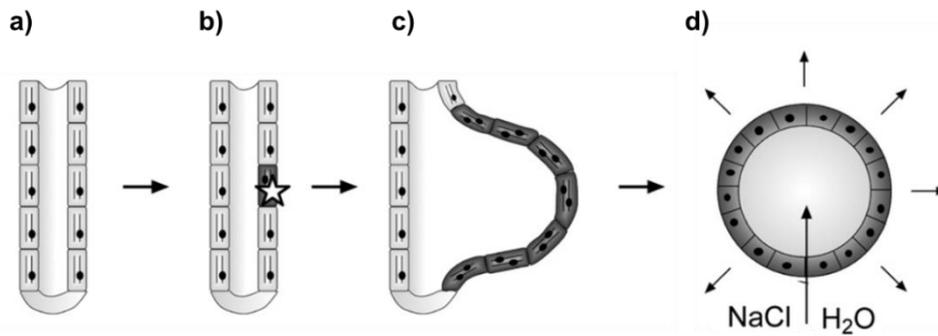


Figure 17 – Formation des kystes suite à la survenue d'une deuxième mutation. a) Les cellules épithéliales du tube collecteur rénal possèdent une seule mutation germinale b) Une deuxième mutation somatique (étoile) survient dans une seule cellule. c) Prolifération monoclonale de la cellule porteuse des deux mutations. d) Le kyste augmente de volume par prolifération cellulaire et sécrétion de liquides dans sa lumière et se détache du tubule dont il est issu. D'après Köttgen 2007.

b) La forme autosomique récessive

La forme récessive des PKR est due à une mutation sur le gène *PKHD1*, codant pour la FC (Zerres *et al.* 1994). Comme la forme dominante, la forme récessive présente une importante variabilité symptomatique interindividuelle pouvant s'expliquer par la longueur importante du gène correspondant (Sweeney & Avner 2006). Sur les 748 mutations recensées, la majorité sont uniques (Department of Human Genetics RWTH Aachen University).

2) Épidémiologie

La forme **autosomique dominante** est la maladie rénale héréditaire la plus répandue dans le monde avec une prévalence variant de 1/400 à 1/1000 suivant les régions (Torres *et al.* 2007).

La forme **autosomique récessive** est une maladie rare⁶ dont la prévalence est de 1/20000 (Gunay-Aygun *et al.* 2006). Il s'agit d'une maladie infantile sévère dont le diagnostic se fait généralement *in utero* ou au plus tard à la naissance. Malgré les importants progrès des soins néonataux, la PKRAR est la cause de décès de 25 à 30 % des nouveau-nés atteints au cours de leur première année (Sweeney & Avner 2014; Zerres *et al.* 1996).

⁶ Une maladie rare se définit par une prévalence inférieure à 1/2000 (Ministère de la Santé 2009).

3) Dysfonctionnements cellulaires

a) **Dérégulation du cycle cellulaire**

À l'état basal, la prolifération des cellules épithéliales du rein est régulée par la voie des Ras/Raf/MEK/ERK (McCubrey *et al.* 2007). L'activation du récepteur à l'EGF (EGFR) active la petite protéine G Ras. S'ensuit une cascade de phosphorylation sur Raf-1, MEK puis ERK qui active les facteurs de transcription c-Jun et c-Myc (McCubrey *et al.* 2007). V2R, activé par l'AVP, favorise la prolifération cellulaire par deux voies de signalisation : la voie de l'AMPc qui stimule Ras et induit une cascade de phosphorylation sur B-Raf puis MEK et par la voie des ERK1/2, indépendante de la protéine G, qui met en jeu la transactivation du récepteur à l'IGF (Yamaguchi *et al.* 2004; Oligny-Longpré *et al.* 2012). Dans le même temps, la prolifération cellulaire est limitée par des rétrocontrôles négatifs qu'exercent l'AMPc sur Raf-1 d'une part et le Ca²⁺ intracellulaire sur B-Raf par l'intermédiaire de la PI3K et d'Akt d'autre part (Yamada *et al.* 1995; Guan *et al.* 2000). L'ensemble de ce réseau de régulation permet de maintenir les cellules dans un état de prolifération modérée (Figure 18-a).

Les mutations du canal calcique qu'est le complexe polycystine induisent une chute de la concentration intracellulaire de Ca²⁺, ce qui lève la répression exercée sur B-Raf (Yamaguchi *et al.* 2006). L'activité proliférative cellulaire est alors augmentée et favorise la formation des kystes (Figure 18-b) (Yamaguchi *et al.* 2004).

Par ailleurs, PC1 régule négativement mTOR, protéine essentielle dans les phénomènes de traduction des protéines, de croissance et de prolifération cellulaire (Shillingford *et al.* 2006). Dans les PKRAD de type 1, une activation inappropriée de mTOR a été observée dans les cellules épithéliales de la bordure des kystes, probablement impliquée dans la kystogenèse (Shillingford *et al.* 2006). De plus, il a été observé une diminution de la kystogenèse dans deux modèles murins traités par la rapamycine, un inhibiteur spécifique de mTOR, et un effet bénéfique sur la taille des reins chez l'homme suite au traitement avec cette même molécule (Shillingford *et al.* 2006). Enfin, le complexe polycystine n'étant plus fonctionnel, il n'exerce plus son contrôle négatif sur le facteur de transcription Id2, ce qui contribue également à la kystogenèse (Figure 18-b) (Li *et al.* 2005).

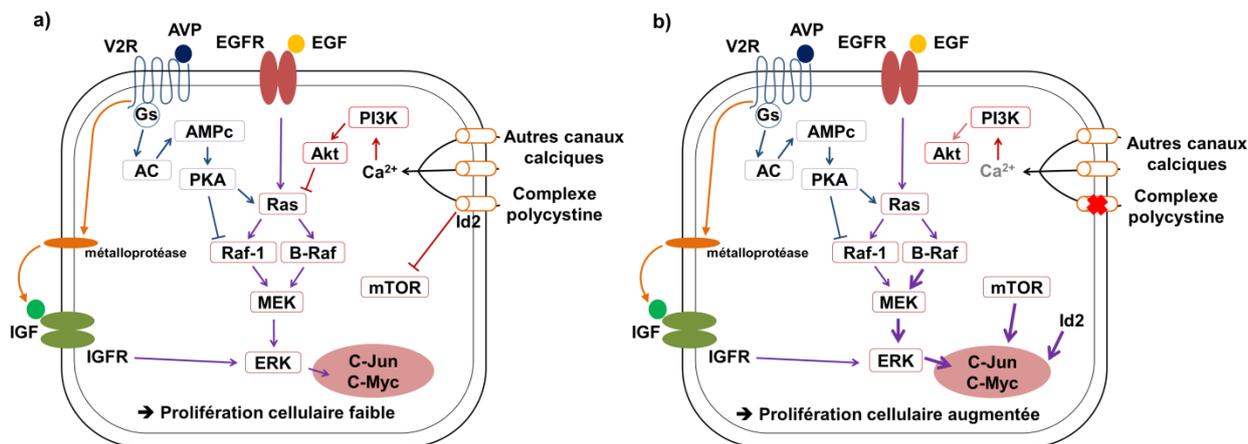


Figure 18 – Voies de signalisation régulant la prolifération cellulaire dans les cellules épithéliales du tube collecteur. a) Dans un contexte physiologique, la voie des MEK peut être activée par l’AVP ou bien par l’EGF. Un rétrocontrôle négatif est assuré par le taux de Ca²⁺ intracellulaire. Le complexe polycystine inhibe l’activation de mTOR et Id2. b) Dans un contexte pathologique de PKRAD, les rétrocontrôles négatifs par le Ca²⁺ et le complexe polycystine ne sont plus assurés et donnent lieu à une suractivation des facteurs de transcription nucléaires.

Parallèlement à la prolifération excessive des cellules épithéliales, une forte activité apoptotique a été observée. Deux théories s’opposent : d’une part, l’apoptose est supposée être la première étape dans la perte progressive des fonctions rénales normales, d’autre part, l’apoptose serait plutôt un élément protecteur contre la progression de la maladie (Goilav 2011; Zhou & Li 2015). Dans tous les cas, il est évident qu’il y a une dérégulation du cycle cellulaire entre prolifération et apoptose. Si les mécanismes responsables ne sont pas encore bien compris, PC1, PC2 et FC ont toutes été démontrées comme impliquées d’une manière ou d’une autre dans le contrôle de l’apoptose (Boletta *et al.* 2000; Goilav 2011).

b) Sécrétion anormale dans les kystes

Dans les PKRAD, les kystes sont issus de toutes les parties du néphron. La prolifération des cellules épithéliales forme des excroissances du tubule qui s’en détachent pour former des sacs indépendants remplis de liquides (Figure 19). La pompe Na⁺/K⁺-ATPase située au pôle basal des cellules kystiques génère une déplétion sodique intracellulaire. Par transport actif secondaire, le cotransporteur Na⁺/K⁺/2Cl fait entrer dans la cellule des ions Na⁺ et des ions Cl⁻ qui sont ensuite sécrétés dans la lumière du kyste via le canal régulateur de la conductance transmembranaire de la fibrose kystique (CFTR), dont l’expression est dépendante de l’AMPc (Takiar & Caplan 2011). Par réaction, s’ensuivent des mouvements paracellulaires d’eau allant dans le même sens.

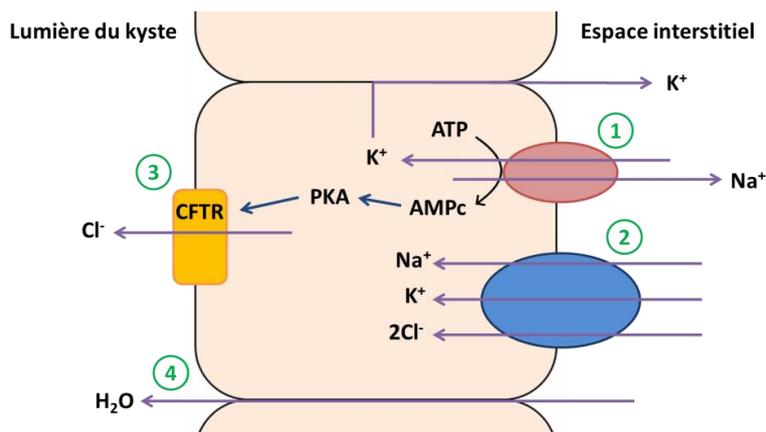


Figure 19 – Sécrétion de liquides dans les kystes. 1) Au pôle basal, la pompe Na^+/K^+ -ATPase fait sortir le Na^+ de la cellule en échange d'une entrée de K^+ . 2) La déplétion sodique est compensée par l'entrée de Na^+ via un cotransporteur $\text{Na}^+/\text{K}^+/2\text{Cl}^-$. 3) Les ions Cl^- sont sécrétés hors de la cellule au pôle apical par le canal CFTR. 4) Le changement de concentration ionique dans le kyste provoque des mouvements paracellulaires d'eau.

Dans les PKRAR, les kystes se forment uniquement au niveau des TC et restent attachés à la paroi, si bien qu'il en résulte plutôt une sorte d'élargissement des TC. La sécrétion reste l'élément nécessaire à l'élargissement des kystes mais elle survient par un mécanisme n'impliquant pas CFTR (Sweeney & Avner 2006). Plusieurs hypothèses ont été formulées mais les résultats contradictoires ne permettent pas d'affirmer le mécanisme mis en jeu.

c) Autres dysfonctionnements cellulaires

Il existe bien d'autres troubles du fonctionnement cellulaire causés par les PKR. Il a été rapporté une altération de la polarité des protéines membranaires, dont EGFR ou la pompe Na^+/K^+ -ATPase, qui témoigne d'un défaut de maturation des cellules kystiques (Orellana *et al.* 1995; Wilson *et al.* 2000). D'autre part, des anomalies des interactions cellules-matrice ont été observées dont une réponse hyperproliférative au collagène, l'altération de l'expression et de la localisation des métalloprotéases matricielles et la prolifération des fibroblastes interstitiels (Wilson 2004).

4) Évolution clinique

Alors que le même complexe protéique est touché dans toutes les PKR, les conséquences cliniques et leur gravité sont très différentes selon qu'il s'agit de la forme dominante ou récessive. Ici est présentée l'évolution générale de la maladie. Il faut garder à l'esprit l'importante hétérogénéité clinique interindividuelle.

a) La forme autosomique dominante

Les PKRAD sont des maladies d'apparition généralement tardive. Chez les personnes atteintes de la PKRAD de type 1, l'âge moyen de survenue de l'insuffisance

rénale chronique terminale (DFG < 15 ml/min/1,73 m²) est de 58,1 ans contre 79,7 ans chez les patients atteints du type 2 (Cornec-Le Gall *et al.* 2013).

Des défauts de concentration des urines ont été observés chez 60 % des enfants atteints de PKRAD. Cela provoque une augmentation réactionnelle de la concentration plasmatique d'AVP et une hyperstimulation des récepteurs vasculaires V1a, à l'origine d'une hyperfiltration glomérulaire, du développement d'une hypertension artérielle et de la dégradation de la fonction rénale (Torres *et al.* 2007; Torres 2006).

La moitié des patients atteints de PKRAD développe une hypertension artérielle⁷ dès l'âge de 20 à 34 ans, accompagnée entre autres d'une rétention sodique rénale anormale (Torres *et al.* 2007). Plusieurs mécanismes ont été proposés. Un système rénine-angiotensine (SRA)⁸ local a été mis en évidence dans les tissus kystiques avec une synthèse des différents composants du SRA par les cellules épithéliales des kystes (Loghman-Adham *et al.* 2004). La prise en charge thérapeutique doit être précoce car les complications cardiovasculaires sont la première cause de mortalité chez ces patients et une pression artérielle non contrôlée accélère le déclin de la fonction rénale et potentialise le risque de morbi-mortalité par rupture d'anévrisme intracrânien (Torres *et al.* 2007). De plus, les patients atteints de PKR présentent plus fréquemment que la population générale des anomalies des valves aortiques et des prolapsus de la valve mitrale. Environ 60 % des patients adultes rapportent souffrir de douleurs rénales aiguës d'étiologie variée (infection urinaire, calculs rénaux, hémorragie kystique) (Torres *et al.* 2007). *In fine*, la dilatation bilatérale des tubules du néphron liée à la présence des kystes conduit à l'insuffisance rénale. La vitesse de progression est très variable d'un individu à un autre, mais débute rarement avant 30-50 ans (Torres *et al.* 2007). Des cas de kystes extrarénaux ont été rapportés. Les premiers organes atteints après le rein sont le foie, les vésicules séminales et le pancréas (Torres *et al.* 2007).

b) La forme autosomique récessive

Les formes récessives des PKR sont des maladies pédiatriques graves. Elles appartiennent aux syndromes fibrokystiques hépatorénaux congénitaux (Sweeney & Avner 2014).

Dans les formes les plus sévères, les individus atteints de PKRAR présentent à la naissance une hypoplasie pulmonaire, mortelle dans 25 à 30 % des cas, ainsi que des TC massivement dilatés (Zerres *et al.* 1996). Les deux tiers des individus développent une hypertension sévère au cours de l'enfance et tous sont atteints d'une insuffisance rénale de progression rapide (avec une forte variabilité interindividuelle) : 50 % des patients atteignent le stade d'insuffisance rénale terminale au cours des dix premières années de

⁷ L'hypertension artérielle est définie par une pression artérielle $\geq 140/90$ mm de Hg, selon la Haute Autorité de Santé (HAS) (Haute Autorité de Santé 2005)

⁸ Dans le SRA, la rénine transforme l'angiotensinogène en angiotensine I, à son tour activée par l'enzyme de conversion en angiotensine II.

leur vie (Sweeney & Avner 2014). En plus des atteintes rénales, la PKRAR s'accompagne systématiquement d'une atteinte hépatique plus sévère (Sweeney & Avner 2014). L'atteinte hépatique, au niveau des canaux biliaires, engendre une fibrose hépatique qui se répercute sur le système vasculaire (hypertension portale, hémorroïdes, saignements gastro-intestinaux) et sur le système hépato-gastro-intestinal (varices œsophagiennes et gastriques, splénomégalie, hypersplénisme, syndrome de malabsorption des vitamines liposolubles).

D. Axes thérapeutiques des polykystoses rénales

1) Axes thérapeutiques envisagés

Les différentes étapes du mécanisme physiopathologique des PKR constituent autant de cibles thérapeutiques potentielles (Figure 20).

a) La régulation de l'homéostasie calcique intracellulaire

La concentration intracellulaire de Ca^{2+} est cruciale pour le maintien du niveau prolifératif et est directement impactée par les mutations à l'origine des PKR. Pour réguler l'homéostasie calcique, plusieurs molécules ont été testées. Entre autres, le triptolide, un diterpène naturel utilisé dans la médecine traditionnelle chinoise contre l'inflammation et les troubles immunitaires, est un agoniste indirect de PC2 qui induit la libération de Ca^{2+} à partir des réserves du RE (Figure 20-5) (Leuenroth *et al.* 2008). Ses effets bénéfiques sur la prolifération des cellules épithéliales et le volume rénal total (VRT) ont été démontrés chez l'animal (Leuenroth *et al.* 2008).

b) Les voies de signalisation de l'AMPc

Dans des conditions physiologiques, les taux d'AMPc et de Ca^{2+} intracellulaires contribuent à réguler la voie des MEK/ERK et à maintenir une prolifération cellulaire faible (Yamada *et al.* 1995). La diminution de la concentration calcique intracellulaire, suite aux mutations sur le complexe polycystine, déséquilibre la balance AMPc/ Ca^{2+} et induit l'hyperactivation de la voie proliférative des MEK/ERK. Diminuer la concentration intracellulaire d'AMPc permettrait de rééquilibrer la balance AMPc/ Ca^{2+} . Cette hypothèse a été confirmée *in vivo* par l'inhibition de la production d'AMPc dépendante de la vasopressine. Il a été observé qu'un modèle murin de PKR dépourvu d'AVP circulante ne développait jamais de kystes jusqu'à injection de 1-déamino-8-D-arginine vasopressine, un analogue synthétique de l'hormone (Wang *et al.* 2008). La concentration d'AMPc dans les cellules principales du TC est augmentée sous l'activation des RCPG couplés Gs, comme les récepteurs aux catécholamines, aux prostaglandines ou V2R, et diminuée par activation des RCPG couplés Gi, comme les récepteurs à la somatostatine ou à l'apeline.

La somatostatine est une hormone sécrétée par plusieurs organes (hypothalamus, pancréas, intestin) qui régule en retour la sécrétion de nombreuses autres hormones

(hormone de croissance, insuline, glucagon...) (Figure 20-2). Ayant une très courte demi-vie, des analogues de synthèse plus stables sont utilisés en clinique, principalement comme antitumoraux : l'octréotide et le lanréotide le plus souvent (Irazabal & Torres 2013). L'octréotide a montré son efficacité en étude préclinique pour stopper l'expansion des kystes hépatiques et rénaux (Harris & Torres 2009). Un essai clinique de phase 3 sur trois ans a montré que l'augmentation du VRT était deux fois moins importante chez les sujets traités que chez ceux du groupe placebo, mais cette différence n'était pas significative (Caroli *et al.* 2013). Cependant, la distribution ubiquitaire des récepteurs à la somatostatine entraîne un risque d'effets secondaires important difficilement conciliable avec un développement thérapeutique pour une maladie chronique. Cette réflexion est également valable pour le récepteur à l'apeline, alors que ce peptide présente un double intérêt en réduisant à la fois la sécrétion d'AVP au niveau central et en inhibant la production d'AMPc induite par activation de V2R au niveau du tube collecteur (De Mota *et al.* 2004; Hus-Citharel *et al.* 2014).

Le blocage des récepteurs aux catécholamines ou aux prostaglandines, des RCPG couplés Gs, a été testé *in vitro* mais leur faible sélectivité pour les cellules épithéliales rénales et leur importante toxicité potentielle ne sont pas favorables à la mise en place d'études *in vivo* (Irazabal & Torres 2013). Seul le blocage de V2R reste la voie thérapeutique la plus prometteuse à ce jour, notamment grâce à son expression quasi-exclusivement rénale qui en fait une cible hautement spécifique (Figure 20-1).

c) Autres voies de signalisation intracellulaire

De nombreux facteurs de croissance, dont des molécules EGF-like, sont hautement concentrés dans les liquides contenus dans la lumière des kystes et les récepteurs correspondants, comme EGFR, sont surexprimés au pôle apical des cellules épithéliales (Irazabal & Torres 2013; Richards *et al.* 1998). L'arrêt du développement des kystes a été observé dans des modèles animaux par inhibition de l'activité tyrosine kinase liée à EGFR et un essai clinique de phase 2 a été réalisé avec le bosutinib, un inhibiteur de ces kinases (résultats non publiés, essai thérapeutique référencé NCT01233869) (Figure 20-6) (Irazabal & Torres 2013; Torres & Harris 2007). Des résultats similaires ont été obtenus en bloquant les récepteurs du facteur de croissance vasculaire endothélial, du facteur de croissance des hépatocytes et du facteur de croissance insulino-like 1 (Irazabal & Torres 2013).

La kinase mTOR, essentielle à la synthèse protéique et à la prolifération cellulaire, est sous contrôle négatif indirect de PC1 (Dere *et al.* 2010). N'étant plus régulée correctement dans la PKRAD, un traitement par des inhibiteurs de mTOR (everolimus et sirolimus, déjà utilisés comme immunosuppresseurs) avait été envisagé (Figure 20-8). Malheureusement, aucune amélioration n'a pu être démontrée dans les premiers essais cliniques réalisés et il avait déjà été observé dans le cadre de greffe d'organe que les reins sont particulièrement résistants à cette famille de médicaments (Canaud *et al.* 2010; Walz *et al.* 2010; Serra *et al.* 2010). Néanmoins, de nouveaux essais cliniques sont en cours.

d) Autres axes thérapeutiques à l'étude

L'augmentation du volume des kystes est due à la sécrétion des ions Cl^- à travers le CFTR suite à leur accumulation intracellulaire par cotransport avec le Na^+ . CFTR, tout comme la voie de signalisation de mTOR, est sous contrôle négatif des protéines kinases dépendantes de l'AMPc. Celles-ci étant elles-mêmes stimulées par la metformine, un antidiabétique, le ralentissement de la croissance des kystes a pu être observé sur des modèles animaux traités par cette molécule (Takiar *et al.* 2011). Une étude clinique est actuellement en cours (NCT02656017). Par ailleurs, un effet synergique bénéfique de la metformine et de la rapamycine a été mis en évidence *in vitro* (Figure 20-9) (Mekahli *et al.* 2014).

Les polycystines 1 et 2 participent indirectement à l'inhibition de Cdk2, une kinase dépendante des cyclines qui favorise la prolifération cellulaire, par contrôle négatif d'Id2 (Li *et al.* 2005; Bhunia *et al.* 2002). La roscovitine, un inhibiteur de CDK, a permis l'inhibition de la kystogenèse, l'amélioration de la fonction rénale, le blocage du cycle en phase G1/S et l'inhibition de l'apoptose sur un modèle murin (Figure 20-3) (Bukanov *et al.* 2012).

La pravastatine, une statine inhibitrice de la prolifération cellulaire utilisée cliniquement dans l'hyperlipidémie, s'est avérée efficace pour ralentir la progression du VRT. Il s'agissait d'un essai clinique mené pendant trois ans sur des patients jeunes (8-22 ans) afin d'évaluer l'intérêt d'un traitement précoce (Cadnapaphornchai *et al.* 2014).

Enfin, une nouvelle voie thérapeutique, testée sur plusieurs modèles murins, s'est montrée encourageante : l'inhibition de la sirtuine I par la vitamine B3. Cette déacétylase est surexprimée dans les PKRAD suite à la mutation de PC1 et stimule la prolifération cellulaire tout en réprimant l'apoptose (Figure 20-4) (Zhou *et al.* 2013). Une étude clinique de phase 2 a été réalisée (résultats non publiés, essai thérapeutique référencé NCT02140814).

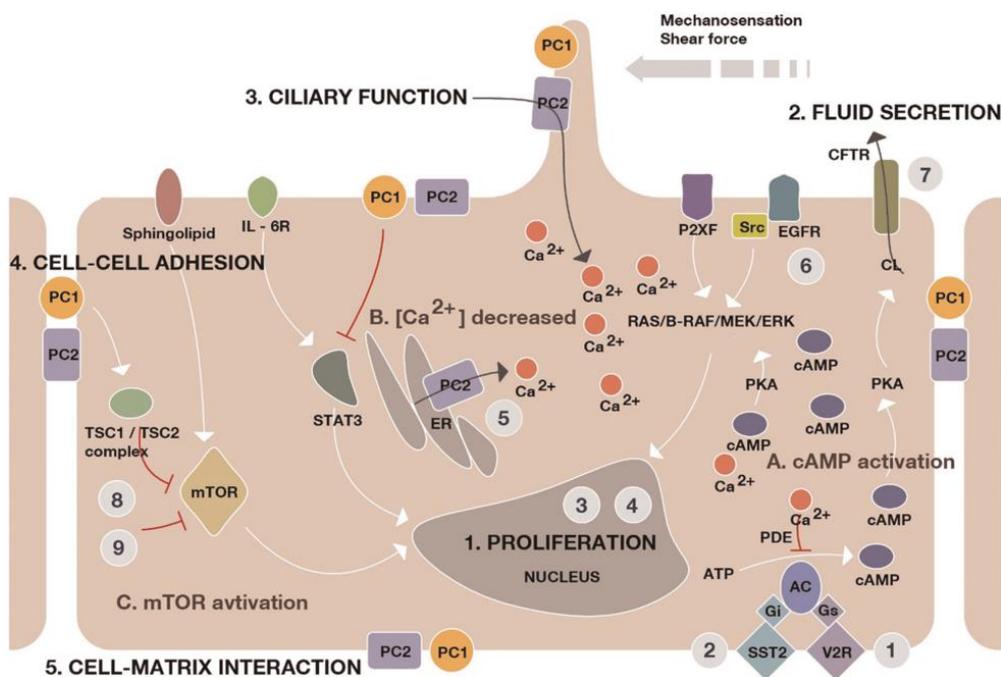


Figure 20 – Principaux mécanismes pathologiques impliqués dans la PKRAD et cibles thérapeutiques envisagées. Les PC1 et 2 sont exprimées dans le cil primaire du côté apical de la cellule. Elles régulent plus ou moins directement : **1.** la prolifération cellulaire, **2.** la sécrétion de fluides, **3.** la fonction ciliaire, **4.** l'adhésion cellule-cellule et **5.** l'interaction cellule-matrice. Les dysfonctionnements du complexe polycystine engendrent des voies de signalisation aberrantes dont : **A)** l'activation de l'AMPC, **B)** la diminution de Ca^{2+} intracellulaire et **C)** l'activation de mTOR. Les principales cibles thérapeutiques sont indiquées par un chiffre dans un cercle gris : **1)** Antagonistes de V2R ; **2)** analogues de la somatostatine ; **3)** roscovitine ; **4)** inhibiteurs de la sirtuine I ; **5)** triptolide ; **6)** inhibiteurs de tyrosine kinases ; **7)** inhibiteurs de CFTR ; **8)** inhibiteurs de mTOR et **9)** metformine. (Modifié d'après Salvadori & Tsalouchos 2017)

2) Stratégies thérapeutiques actuellement appliquées

Jusqu'en 2015, il n'existait aucun traitement spécifique contre les PKR. La prise en charge thérapeutique était uniquement basée sur un traitement symptomatique de l'hypertension artérielle et de l'insuffisance rénale. Depuis 2015, une molécule, le tolvaptan, commercialisée sous le nom de spécialité Jinarc® par les laboratoires Otsuka, Japon, a été mise sur le marché dans différents pays dont la France et suscite un grand espoir pour les patients.

a) **Prise en charge symptomatique des PKR**

La première prise en charge des PKR réside dans le traitement de l'hypertension artérielle avec pour objectif de maintenir les valeurs tensionnelles en dessous de 130/80 mm de Hg. Les deux classes d'antihypertenseurs les plus appropriées sont les inhibiteurs de l'enzyme de conversion (IEC) et les antagonistes des récepteurs de l'angiotensine II (ARA II) qui ciblent le SRA, suractivé dans les PKR (Ecdar & Schrier 2009). De plus, le

contrôle de la pression artérielle permet de ralentir la progression de l'insuffisance rénale (Patch *et al.* 2011).

La dialyse est proposée lorsque les patients sont en insuffisance rénale terminale (DFG < 15 ml/min/1,73 m²). Une transplantation rénale peut être envisagée dans un second temps (Sweeney & Avner 2014). Dans les PKRAR, l'atteinte hépatique est courante et une double transplantation hépatorénale a démontré son intérêt dans certains cas bien définis (Brinkert *et al.* 2013).

b) Prise en charge spécifique de la PKRAD : le tolvaptan

Le tolvaptan est issu de la famille des vaptans, des antagonistes compétitifs non peptidiques des récepteurs à la vasopressine. Les vaptans de dernière génération ont une sélectivité de plus en plus marquée pour V2R (Greenberg & Verbalis 2006). L'augmentation de la diurèse qui en résulte est quantitativement similaire à celle provoquée par la prise d'un diurétique mais n'entraîne pas de perte de sels : il s'agit d'un effet dit « aquarétique » (Peri 2013). Cette fonction aquarétique est particulièrement utile pour lutter contre l'hyponatrémie, et c'est dans cette indication que les premiers vaptans ont été développés. Trois molécules sont actuellement commercialisées dans cette indication : le conivaptan (Vaprisol®, Cumberland Pharmaceuticals) aux États-Unis, le mozavaptan (Physuline®, Otsuka) au Japon et le tolvaptan (Samsca®, Otsuka) dans ces deux pays (Peri 2013; FDA 2009). D'autres vaptans ont été testés en phase clinique II ou III mais leur hépatotoxicité a stoppé leur développement. En effet, une élévation importante des aminotransaminases hépatiques (ASAT et ALAT), pouvant refléter une atteinte hépatique sévère, est survenue chez certaines personnes traitées. Les mécanismes mis en jeu ne sont pas parfaitement élucidés mais l'inhibition de transporteurs biliaires hépatiques par certains métabolites des vaptans et l'inhibition de la respiration mitochondriale sont les deux hypothèses les plus probables (Slizgi *et al.* 2016; Woodhead *et al.* 2017).

Le caractère d'antagoniste compétitif sélectif pour V2R des vaptans en fait de potentiels candidats thérapeutiques pour le traitement des PKR. Plusieurs études ont démontré leur efficacité sur différents modèles pathologiques murins avec une diminution de la concentration d'AMPC intracellulaire, l'inhibition du développement des kystes et la préservation de la fonction rénale (Gattone *et al.* 2003; Torres *et al.* 2004; Wang *et al.* 2005).

Le tolvaptan, ou 7-Chloro-5-hydroxy-1-[2-méthyl-4-(2-méthylbenzoyl-amino)benzoyl]-2,3,4,5-tétrahydro-1*H*-1-benzazépine, ou encore OPC-41061, est à ce jour le vaptan ayant la plus faible hépatotoxicité (Yamamura *et al.* 1998; Kondo *et al.* 1999). Il a fait l'objet d'une étude clinique de phase III pour la prise en charge de la PKRAD : *TEMPO 3:4* (Tolvaptan Efficacy and Safety in Management of Autosomal Dominant Polycystic Kidney Disease and its Outcomes) (Torres *et al.* 2012). Cet essai multicentrique randomisé contrôlé a mis en évidence le ralentissement de la progression de la PKRAD lors d'une prise quotidienne de tolvaptan pendant trois ans. La qualité de vie des patients s'est trouvée améliorée, notamment grâce à l'atténuation des symptômes

invalidants telles que les douleurs rénales et dorsales ou encore les infections urinaires. Ces effets bénéfiques contrebalançaient la survenue des effets indésirables liés au blocage de la fonction antidiurétique de V2R (soif, polyurie, polydipsie, nocturie) perçus alors comme mineurs par les patients. Un pourcent des personnes traitées par le tolvaptan a présenté une augmentation des enzymes hépatiques ASAT et ALAT, réversible à l'arrêt du traitement, ce qui représente une fréquence plus élevée que celle observée lors des études cliniques menées sur la même molécule dans le cadre du traitement des hyponatrémies. Pour deux de ces patients, l'augmentation des enzymes correspondait à une atteinte hépatique sévère. Il est à noter qu'aucune amélioration n'a été observée concernant l'hypertension artérielle associée à la pathologie. Un second essai clinique a fait suite, *TEMPO 4:4*, afin d'évaluer l'efficacité du tolvaptan pendant deux années supplémentaires chez les patients déjà traités, tout en initiant le traitement chez les patients anciennement inclus dans le groupe placebo de l'étude *TEMPO 3:4* (Torres *et al.* 2017). La molécule a montré un effet protecteur prolongé sur la fonction rénale. Les mêmes effets indésirables que dans l'étude précédente ont été rapportés, dans des proportions similaires.

Suite à la première étude, les agences du médicament américaine (Food and Drug Administration - FDA) et européenne (European Medicines Agency - EMA), qui s'étaient toujours montrées réfractaires à la mise sur le marché du tolvaptan dans l'indication contre la polykystose rénale, principalement à cause de son hépatotoxicité, ont publié un avis favorable à sa commercialisation, sous le nom de Jinarc® (Otsuka).

L'affinité du tolvaptan pour V2R est 1,8 fois supérieure à celle de l'AVP. De plus, il est 29 fois plus sélectif pour V2R que pour V1aR, ce qui limite le risque d'effets secondaires dans le cadre d'une utilisation thérapeutique (Miyazaki *et al.* 2007). Ses caractéristiques pharmacocinétiques ont été établies chez une personne saine. Sa biodisponibilité par voie orale est de 40 % en moyenne et il est lié à 99 % aux protéines plasmatiques (Baur & Meaney 2014). Comme tous les vaptans, il est pris en charge au niveau du foie par le cytochrome P450 3A4 et génère neuf métabolites éliminés dans les urines, dont deux ont été identifiés comme responsables de la toxicité hépatique (Furukawa *et al.* 2014; Slizgi *et al.* 2016). C'est aussi un substrat et un inhibiteur de la glycoprotéine phosphate, ce qui potentialise le risque d'interaction médicamenteuse (Kim *et al.* 2011; Yamamura *et al.* 1992). Enfin, le tolvaptan est éliminé majoritairement par voie fécale sous forme inchangée et seulement 1 % du tolvaptan est retrouvé inchangé dans les urines (Kim *et al.* 2011; Shoaf *et al.* 2007). En absence d'altération sévère de la fonction rénale (clairance à la créatinine inférieure à 10 ml/min), il n'est pas nécessaire d'ajuster les doses (Shoaf *et al.* 2014). Son temps de demi-vie est de 12 h et sa concentration plasmatique maximale est atteinte 3 h après la prise (Kim *et al.* 2011; Shoaf *et al.* 2007).

IV. La mambaquarétine-1

Les venins ont longtemps été étudiés dans le but de trouver des antidotes. Cependant, leur utilisation comme outil curatif remonte à plusieurs millénaires au même titre que les plantes médicinales. Pour donner quelques exemples, le venin de serpent était utilisé contre l'arthrite et les troubles gastro-intestinaux dans la médecine Ayurvédique et la médecine traditionnelle chinoise se servait de la peau de crapaud séchée comme diurétique, anesthésique et anticancéreux. L'avènement des techniques de protéomique et de transcriptomique depuis les années 2000 et les récents progrès en chimie analytique ont rendu possible la séparation des composés des venins et leur criblage à haut débit afin d'identifier leurs cibles spécifiques (King 2011). À l'heure actuelle, une dizaine de toxines ou dérivés sont sur le marché et environ le double est en essai clinique.

Comme présenté dans les chapitres précédents, les récepteurs couplés aux protéines G (RCPG) représentent des cibles de choix pour le développement de nouveaux médicaments de par leur implication dans la physiopathologie de nombreuses maladies. Par ailleurs, les venins sont une source immense et encore peu exploitée de molécules biologiquement actives hautement spécifiques. C'est à partir de ces deux constats que l'équipe « Toxines, récepteur et canaux » de Denis Servent (Service d'Ingénierie Moléculaire des Protéines – SIMOPRO, CEA Saclay, Gif-sur-Yvette) a pris le parti de cribler des venins de serpents sur des RCPG à intérêt thérapeutique afin de découvrir de nouveaux candidats thérapeutiques novateurs.

Ma thèse s'inscrit dans la continuité d'un projet initié en 2007, suite à la mise en évidence d'une toxine extraite du venin du mamba vert (*Dendroaspis angusticeps*) et active sur le récepteur de type 2 à la vasopressine (V2R). Ce récepteur est très bien caractérisé, validé comme cible thérapeutique d'intérêt mais peu exploité par manque d'antagonistes efficaces et sûrs. En bloquant l'activité de ce récepteur, la toxine de mamba provoque une activité aquarétique, d'où elle tire son nom : la mambaquarétine-1 (MQ-1). Ses propriétés en font un candidat thérapeutique potentiel afin de traiter la polykystose rénale (PKR).

Ce chapitre reprend l'ensemble des résultats obtenus dans mon laboratoire et par nos collaborateurs avant l'initiation de mon travail de thèse. Ils ont fait l'objet d'une publication parue en juin 2017 dans le journal *Proceedings of the National Academy of Sciences* (Ciolek *et al.* 2017) (Annexe).

A. Caractérisation pharmacologique de MQ-1

Le mamba vert, ou mamba vert de l'Est, est reconnu comme étant l'un des serpents les plus dangereux au monde. Il vit dans la zone Sud/Sud-Est de l'Afrique. C'est dans son

venin qu'ont été découvertes les premières dendrotoxines (Dtx), les toxines Kunitz bloqueurs de canaux potassiques (Harvey & Karlsson 1980). La mambaquaretine-1 a été isolée du venin du mamba vert par fractionnement multiple et criblage sur V2R. Ce peptide a un poids moléculaire de 6367,2 Da et 6373,2 Da avant et après réduction respectivement, ce qui indique la présence de trois ponts disulfure et ces deux caractéristiques réunies indiquent un repliement compatible avec celui des peptides Kunitz. Sa séquence de 57 acides aminés a été obtenue par dégradation d'Edman et analyse de masse ce qui a permis sa production par synthèse chimique pour la suite des expériences. La structure cristallographique de MQ-1 a été résolue par diffraction à rayon X (résolution : 1,06 Å), confirmant la structure de type Kunitz (Figure 21).

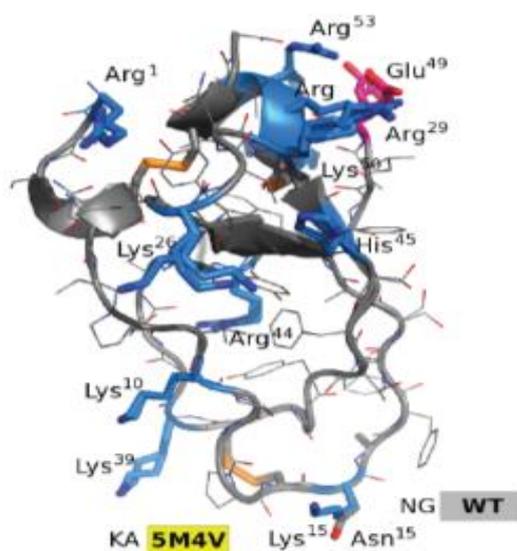


Figure 21 – Structures cristallographiques de MQ-1 et du variant Asn15Lys/Gly16Ala. Les nombreuses positions chargées de MQ-1 sont mises en évidence (PDB du variant Asn15Lys/Gly16Ala : 5M4V).

L'affinité de MQ-1 pour V2R est de 5,02 nM (Figure 22-a). Pour des concentrations inférieures à 10 µM, aucune liaison n'a pu être observée sur les récepteurs de la même famille V1aR, V1bR et OTR. Sa haute sélectivité pour V2R a été confirmée par un profil de sécurité mené sur 156 RCPG, 15 canaux ioniques et 45 enzymes. Seules une activité sur le canal Kv1.1 (concentration inhibitrice médiane (IC₅₀) = 8,2 µM) et sur la trypsine (IC₅₀ = 14,8 µM) ont été observées (Figure 22-b et c). Ces résultats sont en accord avec l'absence, dans la séquence de MQ-1, des résidus canoniques décrits comme nécessaires aux activités antitrypsine et bloqueur de canaux potassiques. En effet, ses positions P1 et P'1, cruciales pour l'activité antitrypsine (Lys et Ala), sont occupées respectivement par une Asn et une Gly et la position 3, nécessairement chargée positivement pour inhiber les Kv1, présente une Ser.

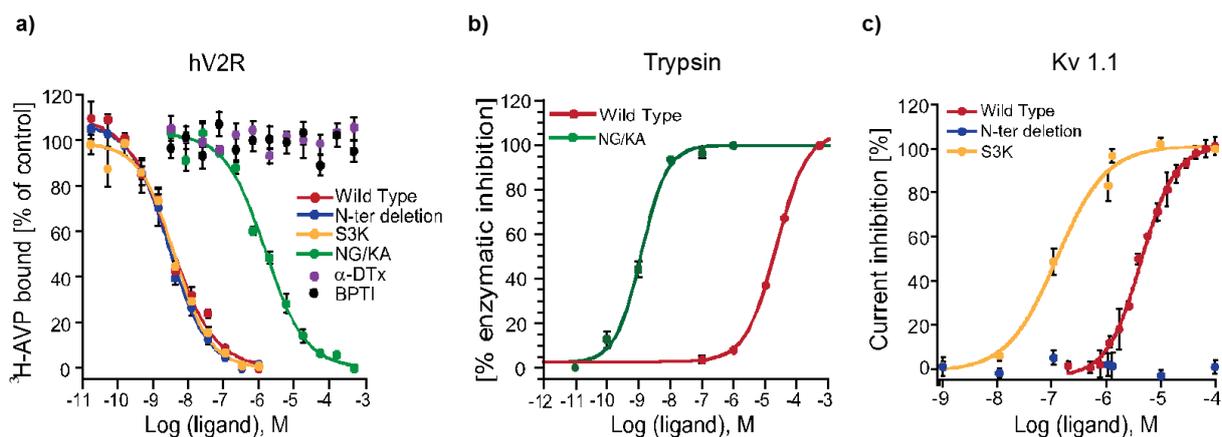


Figure 22 – Versatilité de l’activité de MQ-1 sur différentes cibles en fonction de sa séquence. a) Inhibition de la liaison de ³H-AVP sur V2R par MQ-1 non mutée (rouge), ses variants tronqué en N-terminale (bleu), Ser3Lys (jaune) et Asn15Lys/Gly16Ala (vert), ainsi que par l’α-Dtx (violet) et le BPTI (noir). **b)** Inhibition de l’activité enzymatique de la trypsine par MQ-1 non mutée (rouge) et la variant Asn15Lys/Gly16Ala (vert). **c)** Inhibition du courant électrique du canal potassique Kv1.1 par MQ-1 non mutée (rouge), le variant tronqué en N-terminale (bleu) et le variant Ser3Lys (jaune). Chaque courbe est la moyenne de trois expériences indépendantes, les barres d’erreur représentent l’écart-type.

Les inhibiteurs de protéases à sérine et les dendrotoxines utilisent des parties de leur séquence spatialement opposées pour interagir avec leur cible. Afin de connaître la stratégie de liaison employée par MQ-1 pour se lier à V2R, le variant Ser3Lys, une version de MQ-1 tronquée en N-terminale de quatre résidus et le double variant Asn15Lys/Gly16Ala ont été synthétisés et leur affinité pour V2R testées. Le variant Ser3Lys n’a montré aucune perte d’affinité pour V2R ($K_i = 1,39$ nM) contrairement au double variant dont l’affinité était 1000 fois plus faible que la toxine non mutée ($K_i = 4000$ nM) (Figure 22-a). Il en a été déduit que la boucle 1 de MQ-1 était majoritairement impliquée dans l’interaction au récepteur. À cette même occasion, il a été observé une étonnante versatilité pharmacologique : le simple variant Ser3Lys a montré une meilleure efficacité pour bloquer Kv1.1 ($IC_{50} = 308$ nM) et l’activité anti-trypsine du double variant Asn15Lys/Gly16Ala était nanomolaire ($IC_{50} = 0,77$ nM) (Figure 22-b et c).

V2R est un récepteur couplé $G_{\alpha s}$. Activé, il induit plusieurs voies de signalisation dont les trois les mieux connues sont la production du second messager AMPc, la mobilisation de la β -arrestine et la phosphorylation des ERK. Seul en présence du récepteur, MQ-1 n’induit aucun effet sur ces trois voies de signalisation. En revanche, en présence de vasopressine, elle empêche leur activation ($K_i = 12,0$ nM pour la production d’AMPc, $K_i = 110$ nM pour la mobilisation de la β -arrestine et $K_i = 210$ nM pour la phosphorylation des ERK1 et 2) (Figure 23-a, b et c). MQ-1 est donc un antagoniste compétitif total de V2R.

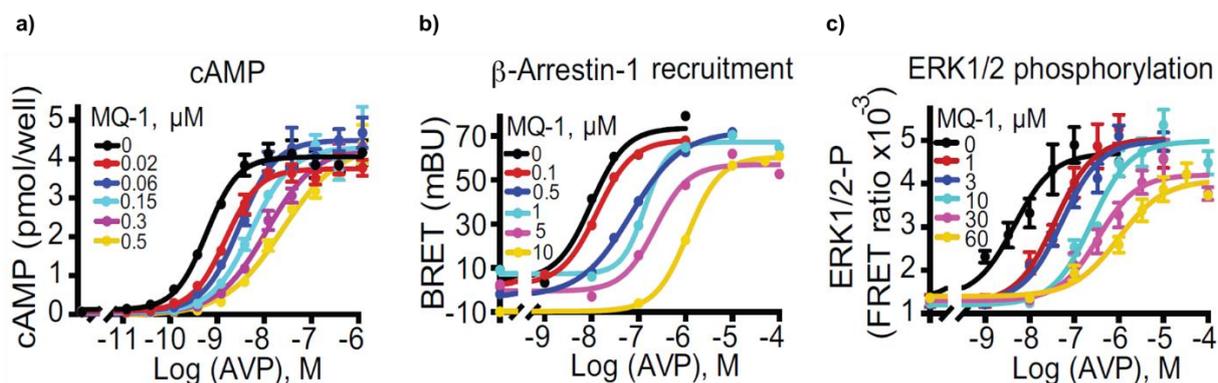


Figure 23 – Déplacement parallèle vers la droite des courbes d’activation de V2R par la vasopressine en présence de concentrations croissantes de MQ-1. a) Production d’AMPc. b) Recrutement de la β -arrestine-1. c) Phosphorylation des ERK1 et 2. Chaque courbe est la moyenne d’au moins trois expériences indépendantes, les barres d’erreur représentent le SEM.

B. Effet de MQ-1 sur un modèle murin de polykystose rénale

Afin d’explorer son potentiel thérapeutique, MQ-1 a été testée sur un modèle murin d’ADPKD : les souris CD1-*pcy/pcy*. Il s’agit en réalité d’un modèle de néphronophtise liée à une mutation non-sens du gène humain orthologue *Nphp3* (Nagao *et al.* 2012). Cliniquement, cette pathologie se traduit chez la souris par la formation de nombreux kystes dans les reins, visibles dès trois semaines et elle progresse vers l’insuffisance rénale terminale autour de 30 semaines. Les souris CD-*pcy/pcy* sont issues d’une souche C57BL/6.

Afin de déterminer quelle dose de MQ-1 était la plus adaptée pour un essai sur le long terme, des groupes de sept souris âgées de dix semaines ont été injectées par voie intrapéritonéale (IP) et sous-cutanée quotidiennement pendant six jours aux doses 0,01, 0,1 et 1 $\mu\text{mol/kg}$. Un groupe contrôle de souris saines C57BL/6 ont reçu la dose de 1 $\mu\text{mol/kg}$ de toxines. Tous les groupes, l’augmentation du volume urinaire couplée à la diminution de l’osmolalité urinaire ont été observées, témoignant de l’effet aquarétique attendu. Les résultats étaient similaires quel que soit la voie d’administration. L’effet aquarétique était présent dès le premier jour de traitement pour les plus fortes doses, mais est apparu au bout de quatre jours pour le groupe ayant reçu 0,01 $\mu\text{mol/kg}$ (Figure 24).

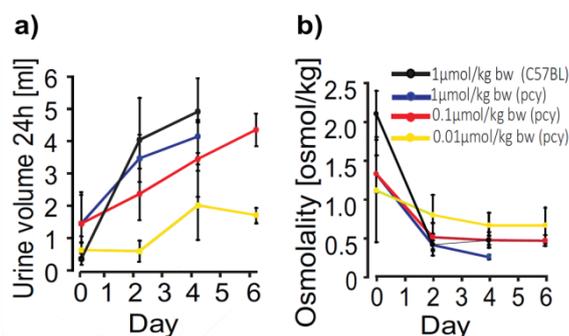


Figure 24 – Effet aquarétique suite une injection IP quotidienne pendant six jours de MQ-1 à différentes doses. a) Volume urinaire total sur 24 h. b) Osmolalité urinaire moyenne sur 24 h. Chaque point représente la moyenne du groupe aux temps 0, jour 2, jour 4 et jour 6 pour les deux plus faibles doses, les barres d'erreurs correspondent à l'écart-type.

La dose 0,1 μmol/kg par voie IP a été retenue pour traiter un groupe de six souris CD1-pcy/pcy pendant 99 jours en comparaison avec un groupe contrôle recevant une solution saline. L'effet aquarétique de MQ-1 a été observé pendant toute la durée de l'essai, sans modification de l'excrétion des ions urinaires et donc sans perte d'efficacité dans le temps (Figure 25). À la fin de l'essai, l'effet bénéfique de MQ-1 était appréciable aussi bien au niveau de la fonction rénale qu'au niveau plus de la progression des kystes. Le dosage de la créatinine circulante a montré que le DFG des souris traitées était maintenu, contrairement à celui des souris non traitées (respectivement, 0,59 mg/dl contre 1,86 mg/dl, $p = 0,002$).

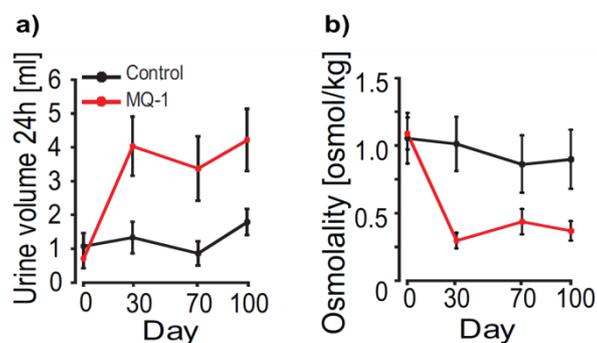


Figure 25 – Effet aquarétique suite une injection IP quotidienne pendant 99 jours de MQ-1 à 0,1 μmol/kg. a) Volume urinaire total sur 24 h. b) Osmolalité urinaire moyenne sur 24 h. Chaque point représente la moyenne du groupe aux temps 0, jour 30, jour 70 et jour 100, les barres d'erreurs correspondent à l'écart-type.

L'observation des tissus rénaux a permis de constater que le nombre total de kystes était significativement réduit de 33 % chez les souris traitées par rapport au groupe placebo (Figure 26). D'autre part, l'analyse des organes post-traitement n'a montré aucune toxicité ou effet secondaire suite à la prise répétée de la toxine. Ces résultats positifs restent à être confirmés à la fois sur un plus grand nombre d'individus et dans d'autres modèles animaux de PKR. Néanmoins, l'efficacité sur la progression des kystes est

comparable à celle démontrée pour le tolvaptan, mais la nature chimique différente de MQ-1 permet de prédire qu'elle n'engendrera probablement pas les mêmes effets secondaires que le tolvaptan. Ces arguments ont été mis en valeur afin de prendre contact avec différentes industries pharmaceutiques susceptibles d'initier le développement thérapeutique de MQ-1 dans le cadre de la prise en charge des PKRAD.



Figure 26 – Effet bénéfique de MQ-1 sur la progression des kystes rénaux. Coupes histologiques de reins colorées par hématoxyne et éosine représentatives des reins de souris CD1-pcy/pcy non traitées (gauche) et traitées (droite) par MQ-1 après 99 jours de traitement quotidien. Les taches blanches correspondent aux kystes.

OBJECTIFS

À l'heure actuelle, seulement 0,01 % des quelques 40 millions de toxines estimées dans la nature sont caractérisées. Pourtant, les venins représentent une formidable banque de peptides naturels à activité biologique. Partant de ce constat et face au besoin urgent de trouver de nouveaux médicaments, le criblage de venins sur des récepteurs à intérêt thérapeutique apparaît comme une opportunité innovante. Étant impliqués dans la grande majorité des processus physiologiques, les récepteurs couplés aux protéines G (RCPG) représentent la première classe thérapeutique et sont la cible d'environ 40 % des médicaments sur le marché. C'est dans ce contexte que l'équipe « Toxines, récepteurs, canaux » (Service d'Ingénierie Moléculaire des Protéines, Institut Joliot, CEA Saclay, Gif-sur-Yvette) a découvert en 2007 la première toxine peptidique Kunitz antagoniste du récepteur de type 2 à la vasopressine (V2R), la mambaquarétine-1 (MQ-1), dans le venin du mamba vert. V2R est responsable de la concentration finale des urines par réabsorption de l'eau en fonction des besoins de l'organisme. Il participe aussi à la physiopathologie de la polykystose rénale autosomique dominante (PKRAD), une pathologie héréditaire qui touche une personne sur 400 à 1000 à travers le monde. Cette maladie provoque la formation de kystes sur les reins qui conduisent à terme à une insuffisance rénale terminale. L'ensemble des recherches dédiées à cette pathologie s'accordent pour valider le blocage de V2R comme la meilleure stratégie thérapeutique actuelle dans cette indication. Un seul médicament existe depuis peu sur le marché, le Jinarc® (Otsuka), mais plusieurs interrogations subsistent quant à son efficacité et sa sécurité d'emploi sur le long terme. Une première étude de MQ-1 comme traitement d'un modèle murin de polykystose rénale a obtenu des résultats très positifs, nous encourageant à entreprendre son développement thérapeutique. C'est dans cette finalité que les objectifs de ma thèse ont été définis.

Avant de s'attacher à l'effet thérapeutique d'une molécule, il convient de connaître au mieux ses caractéristiques *in vivo*. Mon premier objectif de thèse sera de déterminer la pharmacodynamie de MQ-1 chez des rats sains par injection intrapéritonéale (IP). Pour observer la survenue d'un effet aquarétique (augmentation du volume urinaire sans perte d'osmoles), les animaux seront placés en cage métabolique. Dans un premier temps, nous nous intéresserons à l'effet dose-réponse, ce qui permettra de déterminer la dose la plus appropriée pour un traitement chronique en fonction de l'importance et de la durée de l'effet. Dans un second temps, nous réaliserons des injections répétées à la posologie la plus pertinente d'après les résultats précédents pour mesurer un éventuel effet cumulatif.

En tant que ligand hautement sélectif de V2R, MQ-1 est une molécule de premier choix pour générer des outils permettant d'étudier sa cible. Mon second objectif de thèse sera de mettre en évidence les déterminants moléculaires de MQ-1 responsables de son affinité pour son récepteur. Nous rechercherons l'existence de toxines dont l'affinité pour V2R ne serait pas encore décrite en explorant les bases de données répertoriant des toxines Kunitz dont la séquence est proche de celle de MQ-1. Les animaux venimeux appartenant à la même espèce partagent communément des toxines homologues. Nous criblerons donc le venin des trois autres mambas pour trouver de probables nouvelles mambaquarétines. L'activité des toxines affines pour V2R sera caractérisée pharmacologiquement aussi bien

OBJECTIFS

in vitro qu'*in vivo*. À partir de l'étude comparative des séquences des toxines actives ou non actives sur V2R, un certain nombre de positions susceptibles d'être impliquées dans l'affinité des toxines seront étudiées par mutation et tests de liaison. Ces résultats seront confrontés à des modèles *ab initio* du complexe MQ-1-V2R générés par des collaborateurs. En retour, ces modèles mettront en avant d'autres positions à explorer expérimentalement afin de valider le pharmacophore le plus plausible.

Enfin, mon troisième objectif de thèse sera d'appréhender les premières étapes d'un développement pharmaceutique au contact de nos collaborateurs industriels. Certaines problématiques spécifiques à l'industrie pharmaceutique seront soulevées (positionnement sur le marché, coût de production, immunogénicité, voie d'administration) et nous tâcherons d'apporter des éléments de réponse.

RÉSULTATS ET DISCUSSION

I. Exploration pharmacodynamique de la mambaquarétine-1

L'étude pharmacodynamique d'une molécule s'intéresse à la façon dont cette molécule agit sur un organisme vivant et quelles modifications elle entraîne sur le fonctionnement physiologique de cet organisme. Dans un premier temps, nous nous sommes intéressés aux doses de mambaquarétine-1 (MQ-1) à utiliser et leurs effets après une injection unique. Dans un second temps, nous avons sélectionné la dose la plus appropriée pour observer les effets d'une injection répétée pendant cinq jours.

L'expérimentation animale n'était pas une pratique habituelle au sein de notre laboratoire. Aussi, le protocole expérimental a été longuement discuté et parfois revu après plusieurs essais. Toutes nos expérimentations *in vivo* ont été menées sur des groupes de 6, 12 ou 18 rats Sprague-Dawley, mâles, âgés de 8 à 12 semaines et de poids moyen 320 ± 60 g. Nous avons choisi d'administrer MQ-1 par voie intrapéritonéale (IP) de façon à ce que la molécule atteigne rapidement la circulation générale avec une biodisponibilité importante. La toxine a été préparée dans une solution filtrée de NaCl 0,9 %. Le groupe placebo a reçu une injection de NaCl 0,9 % seul. Le débit urinaire et l'excrétion d'osmoles ont été rapportés au poids des animaux. Deux jours avant l'injection, les rats étaient placés isolément en cage métabolique afin qu'ils s'habituent à cet environnement. Dans nos conditions expérimentales, le groupe placebo urinait avec un débit médian de 1,56 ml/h/kg, l'osmolalité urinaire était de 1228 mOsm/kg H₂O et l'excrétion osmolaire était de 1804 μ Osm/h/kg (Tableau 3). Après une semaine passée en cage métabolique, nous avons observé un changement dans le comportement des rats, notamment concernant le toilettage, suggérant l'apparition d'un mal-être. Aucun rat n'est resté plus de sept jours en cage métabolique. Aucun animal n'a atteint de point d'arrêt au cours des expériences (perte de poids supérieure à 10 % en 24 heures).

A. Relation dose-activité d'une injection unique

En se basant sur les résultats obtenus précédemment sur les souris (Ciolek *et al.* 2017), nous avons dans un premier temps utilisé une dose pour laquelle nous étions sûrs d'observer un effet aquarétique important, correspondant à une augmentation du débit urinaire et une diminution de l'osmolalité urinaire sans modification de l'excrétion des osmoles dans les urines. Dans un second temps, nous avons diminué les doses d'un facteur 3 jusqu'à ne plus observer d'effet. Les doses testées étaient : 0,3, 0,1, 0,03, 0,01, 0,003 et 0,001 μ mol/kg.

1) Effet sur 24 heures

Pour commencer, nous nous sommes intéressés à l'effet de MQ-1 sur les vingt-quatre heures suivant l'injection. Concernant le débit urinaire, plus la dose augmentait, plus le débit urinaire était important (Figure 27-a). Seule la plus faible dose à 0,001 $\mu\text{mol/kg}$ n'a pas montré d'augmentation statistiquement significative du débit urinaire (2,34 ml/h/kg, $p = 1,00$, Tableau 3). De même, l'osmolalité urinaire était statistiquement diminuée en fonction de la dose, exceptée pour la dose 0,001 $\mu\text{mol/kg}$ (1156 $\mu\text{Osm/kg H}_2\text{O}$, $p = 0,69$, Figure 27-b et Tableau 3). Afin de vérifier que l'augmentation du débit urinaire n'entraînait pas de pertes d'ions, nous avons quantifié indirectement les osmoles dans les urines. L'excrétion osmolaire n'évoluait pas en fonction de la dose. Elle était plus élevée pour toutes les doses mais de façon statistiquement significative seulement dans les groupes ayant reçu 0,003, 0,03 et 0,3 $\mu\text{mol/kg}$ (respectivement 2710 $\mu\text{Osm/h/kg}$, $p = 0,003$; 2280 $\mu\text{Osm/h/kg}$, $p = 0,005$ et 2658 $\mu\text{Osm/h/kg}$, $p < 0,001$, Tableau 3).

Tableau 3 – Paramètres urinaires sur 24 h suivant une injection IP unique de MQ-1 à différentes doses. Médianes, valeurs extrêmes et p value du débit urinaire, de l'osmolalité urinaire et de l'excrétion osmolaire dans les vingt-quatre heures suivant une injection IP unique de MQ-1 à différentes doses. L'analyse statistique a été réalisée par un test post-hoc de Dunnett en prenant le groupe placebo comme référence.

Dose ($\mu\text{mol/kg}$)	n	Débit urinaire (ml/h/kg)			Osmolalité urinaire (mOsm/kg H ₂ O)			Excrétion osmolaire ($\mu\text{Osm/h/kg}$)		
		Médiane	[min-max]	pvalue	Médiane	[min-max]	pvalue	Médiane	[min-max]	pvalue
Placebo	22	1,56	0,72-2,59	-	1228	644-1913	-	1804	1234-2930	-
0,001	6	2,34	1,52-3,90	1,00	1156	594-1480	0,69	2206	1644-2564	0,72
0,003	6	5,13	3,21-11,68	0,02	503	277-594	<0,001	2710	1828-3226	0,003
0,01	11	7,82	6,63-11,55	<0,001	273	195-387	<0,001	2092	1585-2795	0,38
0,03	11	10,45	9,17-14,54	<0,001	214	154-275	<0,001	2280	1900-3082	0,005
0,1	12	12,83	8,31-21,54	<0,001	162	98-224	<0,001	2046	1713-2234	0,97
0,3	17	20,95	8,78-29,48	<0,001	136	80-250	<0,001	2658	2129-3364	<0,001

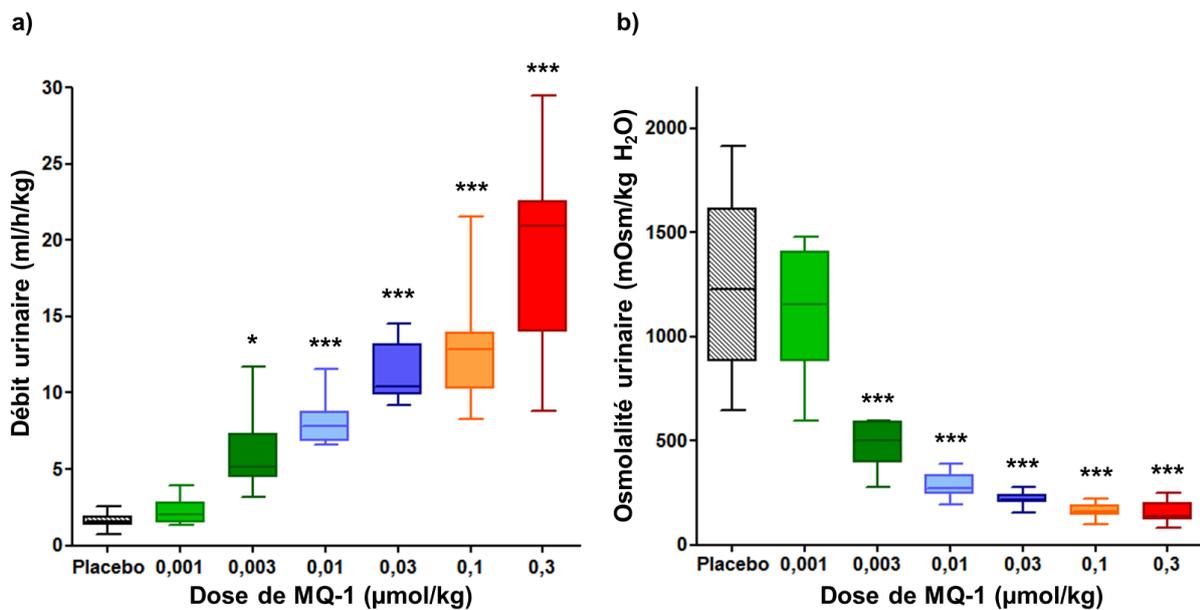


Figure 27 – Débit et osmolalité urinaires sur 24 h après une injection IP unique de MQ-1 à différentes doses. a) Débit urinaire. b) Osmolalité urinaire. Chaque boîte représente Q1, la médiane et Q3, les barres d'erreur correspondent aux valeurs minimales et maximales. L'analyse statistique a été réalisée par un test post-hoc de Dunnett en prenant le groupe placebo comme référence : * pour $p =]0,05-0,01]$, *** pour $p < 0,001$.

D'après l'analyse statistique, nous observons donc un effet aquarétique pur uniquement pour les doses 0,01 et 0,1 µmol/kg. Si la variation du débit urinaire et de l'osmolalité des urines est cohérente avec l'effet aquarétique attendu, les fluctuations de l'excrétion osmolaire ne sont pas reliées à la dose. Il convient de prendre en compte deux éléments concernant la quantification de ce paramètre. Premièrement, l'élimination des osmoles est liée à l'ingestion d'osmoles, que ce soit par la nourriture ou par la boisson. Or, le protocole expérimental utilisé ne permettait pas de mesurer la quantité de nourriture et d'eau ingérée de façon suffisamment précise pour pouvoir établir un bilan entrée/sortie des osmoles fiable. Deuxièmement, l'excrétion osmolaire a été calculée à partir de trois valeurs mesurées : le volume d'urine, l'osmolalité urinaire et le poids de l'animal. L'erreur de calcul cumule donc l'erreur de mesure de chacun de ces paramètres. L'osmolalité urinaire et le poids de l'animal sont mesurés avec une erreur inférieure à 10 %, donc négligeable. En revanche, l'erreur sur le volume urinaire est plus importante et difficile à quantifier. En effet, au moment où les biberons étaient placés, quelques gouttes s'écoulaient dans les cages et tombaient dans le pot de recueil des urines. D'autre part, il était courant d'observer un peu de nourriture dans les urines. Après plusieurs expérimentations, nous avons donc placé des filtres à l'entrée des pots collecteurs afin de pallier ce problème. Les tests statistiques concernant l'excrétion osmolalité doivent donc être interprétés avec prudence. Seule une différence particulièrement importante entre les groupes pourrait être considérée comme significative, ce qui n'est pas le cas dans notre étude.

Pour avoir une vision plus précise de la cinétique d'action de MQ-1, nous avons relevé les urines toutes les heures pendant les quatre premières heures suivant l'injection. Pour le groupe placebo, le débit urinaire était nul ou trop faible pour être mesuré. Pour toutes les doses entre 0,003 et 0,3 $\mu\text{mol/kg}$, l'activité aquarétique de la toxine existe dès la première heure et augmente rapidement jusqu'à atteindre un effet maximum au cours de la deuxième heure post-injection. Il s'ensuit une rapide diminution de l'activité au cours des deux heures suivantes (Figure 28). Sur la période entre 4 et 24 h post-injection, il n'y a plus d'effet aquarétique à la dose 0,003 $\mu\text{mol/kg}$. Pour la dose 0,01 $\mu\text{mol/kg}$, le débit urinaire n'est pas statistiquement différent de celui du groupe placebo, en revanche l'osmolalité urinaire est toujours statistiquement diminuée (Figure 28). Pour les doses plus élevées, l'effet aquarétique perdure.

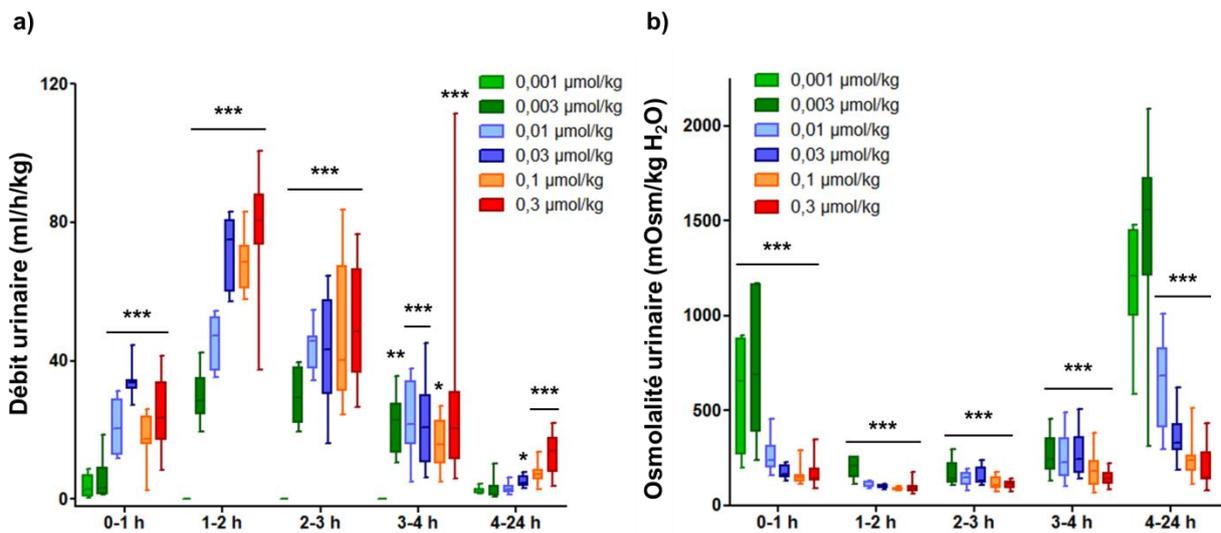


Figure 28 – Débit et osmolalité urinaires au cours des 24 h suivant une injection IP unique de MQ-1 à différentes doses. a) Débit urinaire. b) Osmolalité urinaire. Chaque boîte représente Q1, la médiane et Q3, les barres d'erreur correspondent aux valeurs minimales et maximales. L'analyse statistique a été réalisée par un test post-hoc de Dunnett en prenant le groupe placebo (valeurs des 24 premières heures) comme référence : * pour $p =]0,05-0,01]$, ** pour $p =]0,01-0,001]$, *** pour $p < 0,001$.

L'effet maximal atteint dans les deux heures après administration est le même aux trois doses 0,03, 0,1 et 0,3 $\mu\text{mol/kg}$. Ainsi, il apparaît que pour toutes ces doses, le débit urinaire maximal est atteint. Or, le facteur physiologique limitant du débit urinaire est la vitesse de filtration glomérulaire et la réabsorption tubulaire du néphron. Nos expériences montrent que la dose 0,03 $\mu\text{mol/kg}$ est suffisante pour empêcher la totalité de la réabsorption d'eau dépendante de V2R. Ensuite, la vitesse à laquelle l'effet aquarétique disparaît n'est pas la même en fonction de la dose, comme nous avons pu l'observer entre 4 et 24 h post-injection, où la toxine était encore active seulement aux doses 0,03, 0,1 et 0,3 $\mu\text{mol/kg}$, d'après le débit urinaire. Cependant, la cinétique d'effet entre 4 et 24 h post-injection est difficile d'estimer. Les relevés réalisés entre 6 et 8 h post-injection au cours de nos premières expérimentations s'étaient révélés difficilement quantifiables car cette période correspondant à la phase de sommeil chez les rats. En revanche, la période entre 8

et 24 h post-injection correspond à leur période d'éveil et donc à un métabolisme tout à fait différent. C'est pourquoi le bilan entre 4 et 24 h montre que l'effet aquarétique est toujours présent alors que la période entre 4 et 8 h ne permet pas de mesurer d'effet.

2) Effet au-delà de 24 heures

Afin de savoir combien de temps MQ-1 est active dans l'organisme, nous avons continué le suivi des animaux par un relevé urinaire quotidien jusqu'à 96 h après l'injection. Deux exceptions sont à noter : n'ayant pas provoqué d'effet au cours de la première journée, le suivi du groupe 0,001 $\mu\text{mol/kg}$ n'a pas été suivi au-delà de vingt-quatre heures. De même, la dose 0,003 $\mu\text{mol/kg}$ n'entraînait plus aucun effet au cours de la deuxième journée, ce qui a décidé l'arrêt du suivi de ce groupe.

Pour ce qui est du débit urinaire, seule la dose la plus forte à 0,3 $\mu\text{mol/kg}$ a montré une différence statistiquement significative sur les trois jours suivants, reflétant un effet aquarétique persistant (jour 2 : 9,64 ml/h/kg, $p < 0,001$; jour 3 : 6,00 ml/h/kg, $p < 0,001$; jour 4 : 3,76 ml/h/kg, $p < 0,001$, Figure 29 et Tableau 4). En revanche, l'osmolalité urinaire reste statistiquement plus faible aux doses 0,1 et 0,3 $\mu\text{mol/kg}$ (respectivement, jour 2 : 703 et 283 mOsm/kg H_2O , $p < 0,001$ pour les deux ; jour 3 : 956 et 455 mOsm/kg H_2O , $p = 0,003$ et $p < 0,001$; jour 4 : 990 et 754 mOsm/kg H_2O , $p = 0,001$ et $p < 0,001$, Tableau 4). Le groupe ayant reçu 0,003 $\mu\text{mol/kg}$ présentait une osmolalité statistiquement supérieure à celle du groupe placebo le deuxième jour (2000 mOsm/kg H_2O , $p = 0,008$, Tableau 4), de même que le groupe 0,01 $\mu\text{mol/kg}$ au quatrième jour après l'injection (1924,0 mOsm/kg H_2O , $p < 0,001$, Tableau 4). Ceci peut s'expliquer par une entrée d'osmoles supérieure dans ces groupes à travers la prise alimentaire ou de boisson. Comme expliqué précédemment, le protocole expérimental ne permettait pas de mesurer avec suffisamment de précision ces paramètres pour pouvoir affirmer cette hypothèse.

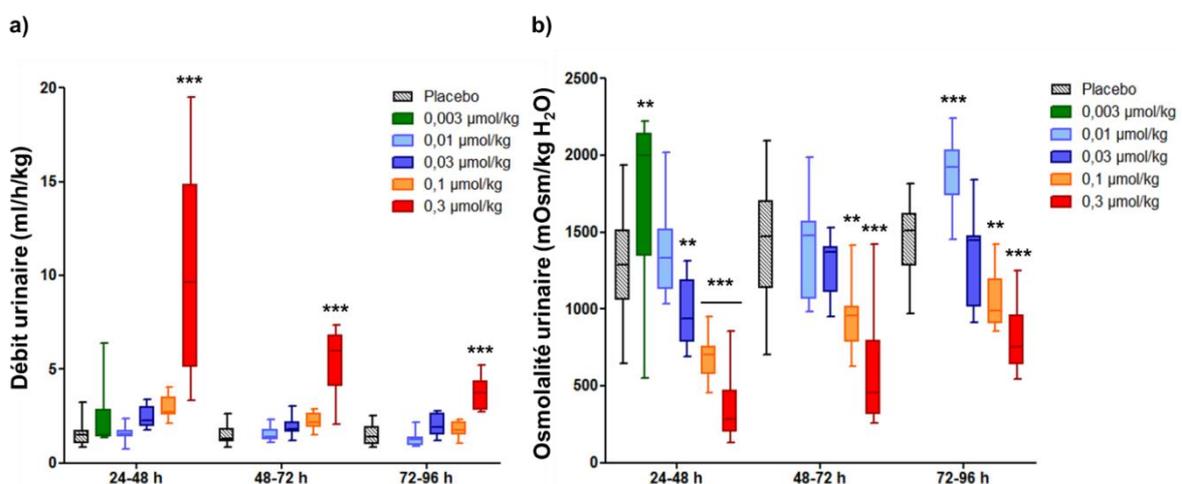


Tableau 4 – Paramètres urinaires par jour après une injection unique de MQ-1 au-delà de 24 h. Médiane, valeurs extrêmes et p value du débit urinaire, de l'osmolalité urinaire et de l'excrétion osmolaire par jour les 2^{ème}, 3^{ème} et 4^{ème} jours après une injection IP unique de MQ-1. L'analyse statistique a été réalisée par un test post-hoc de Dunnett en prenant le groupe placebo comme référence. Nd : no data

	Dose (µmol/kg)	n	Débit urinaire (ml/h/kg)			Osmolalité urinaire (mOsm/kg H ₂ O)			Excrétion osmolaire (µOsm/h/kg)		
			Médiane	[min-max]	pvalue	Médiane	[min-max]	pvalue	Médiane	[min-max]	pvalue
24-48h	Placebo	22	1,49	0,86-3,23	-	1290	648-1936	-	1652	966-3535	-
	0,003	6	1,53	1,36-6,40	0,93	2000	548-2220	0,008	3077	2285-3677	<0,001
	0,01	11	1,58	0,76-2,36	1,00	1332	1032-2020	0,91	2117	1510-2709	0,67
	0,03	11	2,25	1,78-3,37	0,75	937	688-1312	0,040	2064	1598-3091	0,01
	0,1	12	2,74	2,10-4,07	0,37	703	454-948	<0,001	1930	1599-2298	0,97
	0,3	17	9,64	3,32-19,50	<0,001	283	129-856	<0,001	2617	1721-3738	<0,001
48-72h	Placebo	17	1,30	0,83-2,61	-	1472	704-2096	-	1887	1446-2841	-
	0,003	6	nd			nd			nd		
	0,01	11	1,42	1,09-2,30	1,00	1476	980-1984	1,00	1906	1312-3409	0,87
	0,03	11	1,82	1,22-3,03	0,37	1368	954-1526	0,69	2592	1859-3039	0,03
	0,1	12	2,18	1,52-2,87	0,10	956	624-1412	0,003	1998	1698-2328	1,00
	0,3	12	6,00	2,05-7,37	<0,001	455	258-1420	<0,001	2617	1798-4216	0,01
72-96h	Placebo	16	1,42	0,86-2,54	-	1512	968-1812	-	1736	1338-2939	-
	0,003	6	nd			nd			nd		
	0,01	11	1,25	0,92-2,15	0,65	1924	1452-2240	<0,001	2243	1423-3919	0,23
	0,03	11	1,90	1,22-2,78	0,12	1444	915-1838	0,78	2742	1762-4016	0,001
	0,1	12	1,77	1,05-2,34	0,55	990	856-1424	0,001	1868	1294-2503	0,99
	0,3	12	3,76	2,74-5,23	<0,001	754	544-1252	<0,001	2838	2370-3600	<0,001

L'étude de la relation dose-activité de MQ-1 ouvre de nombreuses questions sur la pharmacodynamie et le métabolisme de la toxine. Pour commencer à y répondre, nous avons modélisé la diminution de l'effet aquarétique en se basant sur les données du débit urinaire afin d'estimer le temps de demi-vie biologique ($t_{1/2}$)⁹. La diminution du débit urinaire a d'abord été modélisée selon une équation de décroissance exponentielle à une pente et le temps de demi-vie biologique était estimé entre 1 et 4 h selon la dose (Figure 30-a). L'évolution du débit urinaire aux deux plus fortes doses 0,1 et 0,3 µmol/kg a également été modélisée selon une équation de décroissance exponentielle à deux pentes. Pour 0,1 µmol/kg, ce modèle n'était pas applicable. En revanche, la dose 0,3 µmol/kg correspondait mieux à ce modèle ($R^2 = 0,98$ contre $R^2 = 0,94$), avec une première phase de décroissance rapide selon $t_{1/2} = 48$ min, puis une seconde phase de décroissance lente selon $t_{1/2} = 43$ h (Figure 30-b).

⁹ Le temps de demi-vie biologique est un paramètre pharmacodynamique qui correspond au temps au bout duquel l'effet maximum est diminué de moitié. Cette constante est différente du temps de demi-vie plasmatique, paramètre pharmacocinétique, qui représente le temps au bout duquel la concentration circulante de la molécule est divisée par deux.

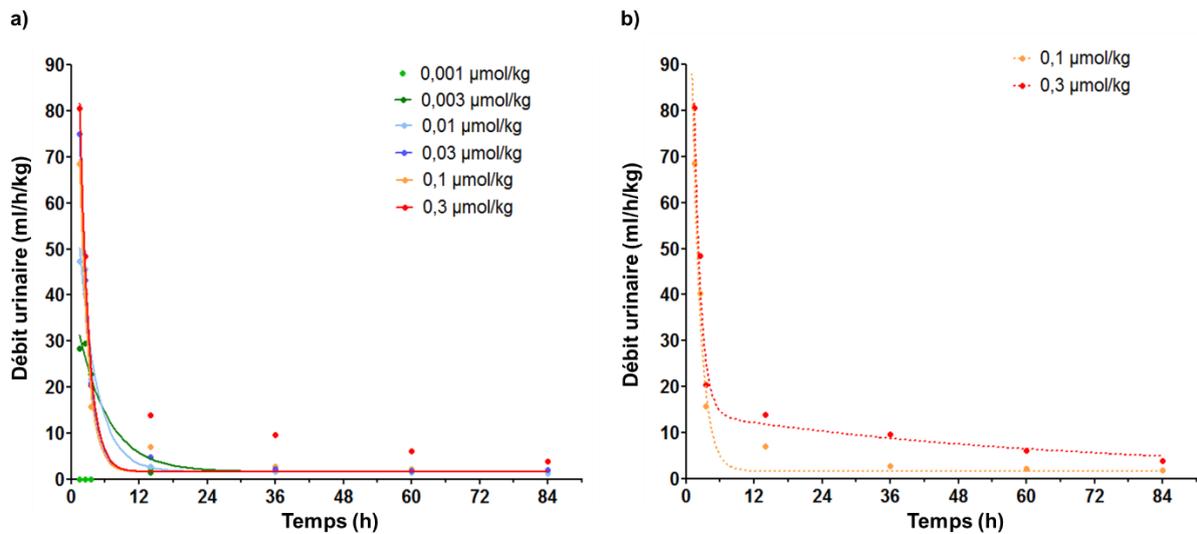


Figure 30 – Modélisation de la décroissance du débit urinaire en fonction du temps après une injection IP unique de MQ-1 à différentes doses. Chaque point représente la valeur médiane du débit urinaire et est placé au temps médian de la plage horaire qu'il représente. Le débit urinaire minimum est fixé à 1,56 $\mu\text{mol/h/kg}$, ce qui correspond au débit urinaire basal. **a)** Modélisation par décroissance exponentielle à une pente. La dose 0,001 $\mu\text{mol/kg}$ ne permettait pas de modélisation. **b)** Modélisation par décroissance exponentielle à deux pentes.

La diminution de l'effet biologique d'une molécule selon deux phases est généralement attribuée à une première étape de distribution dans plusieurs compartiments avant l'étape d'élimination. Il peut être supposé qu'à forte dose, MQ-1 répond à un métabolisme différent, comme par exemple l'accumulation dans un tissu qui relâcherait ensuite progressivement la toxine dans la circulation. D'autre part, nous ne savons pas comment MQ-1 est éliminée mais étant de poids moléculaire inférieur à 60 kDa, elle passe très probablement à travers la membrane de filtration glomérulaire et, à forte concentration, pourrait être réabsorbée au niveau de TCP.

B. Administration répétée

L'objectif final de MQ-1 étant son développement thérapeutique pour une maladie chronique, nous avons cherché à savoir quel était son effet lors d'une administration répétée. Pour cela, nous avons choisi la plus faible dose active connue, 0,003 $\mu\text{mol/kg}$. Cette dose nous permettait à la fois d'observer un effet cumulatif, s'il existait, tout en maintenant le débit urinaire à un niveau compatible avec un développement thérapeutique, défini par une augmentation du débit urinaire qui ne soit pas supérieure à trois fois le débit basal. Nous avons injecté les rats par voie IP une fois par jour à heure fixe pendant cinq jours, ce qui était une période minimum pour pouvoir observer un effet cumulatif. Nous avons relevé l'urine aux temps 1 h, 2 h, 3 h, 4 h et 24 h après chaque injection. En parallèle, nous avons également observé un groupe témoin qui recevait dans les mêmes conditions une injection IP de NaCl 0,9 %. Ce groupe placebo n'a montré

aucune modification du débit urinaire, de l'osmolalité ou de l'excrétion osmolaire d'un jour sur l'autre.

Dans le groupe traité, nous avons d'abord regardé les valeurs médianes par jour. Le débit urinaire était supérieur à celui du groupe placebo tous les jours mais de façon statistiquement significative seulement à partir du deuxième jour (Figure 31-a). Le débit urinaire médian a augmenté pendant quatre jours mais non le cinquième (Tableau 5). L'osmolalité urinaire était inférieure à celle du groupe placebo tous les jours, mais de façon statistiquement significative seulement à partir du second jour, comme pour le débit urinaire (Figure 31-b). Elle a diminué continuellement pendant quatre jours (Tableau 5). Suite à des problèmes logistiques, l'osmolalité urinaire n'a pas pu être mesurée à la fin du cinquième jour de traitement et nous n'avons pas pu établir l'osmolalité urinaire médiane pour ce jour-là. L'excrétion osmolaire dans les urines n'était pas statistiquement différente de celle du groupe placebo tout au long du traitement (Tableau 5). MQ-1 a donc induit un effet aquarétique qui s'est amplifié pendant les quatre premiers jours de traitement puis a semblé se stabiliser.

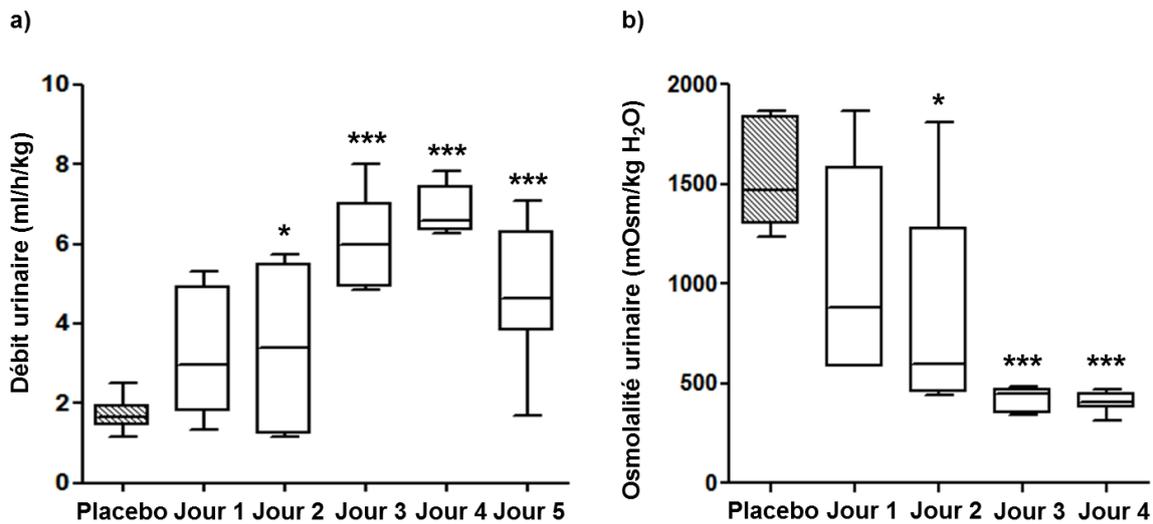


Figure 31 – Débit et osmolalité urinaires par jour après une injection IP quotidienne de MQ-1 à 0,003 $\mu\text{mol/kg}$. a) Débit urinaire. b) Osmolalité urinaire. Chaque groupe est composé de six animaux. Chaque boîte représente Q1, la médiane et Q3 ainsi que les valeurs minimale et maximale. L'analyse statistique a été réalisée par un test post-hoc de Dunnett en prenant le groupe placebo comme référence : * pour $p =]0,05-0,01]$, *** pour $p < 0,001$.

Tableau 5 – Paramètres urinaires par jour après une injection IP quotidienne de MQ-1 à 0,003 $\mu\text{mol/kg}$. Les valeurs des cinq jours ont été groupées pour le groupe placebo. L'analyse statistique a été réalisée par un test post-hoc de Dunnett en prenant le groupe placebo comme référence. Nd : no data.

	n	Débit urinaire (ml/h/kg)			Osmolalité urinaire (mOsm/kg H ₂ O)			Excrétion osmolaire ($\mu\text{Osm/h/kg}$)		
		Médiane	[min-max]	pvalue	Médiane	[min-max]	pvalue	Médiane	[min-max]	pvalue
Placebo	6	1,64	1,16-2,52	-	1472	1236-1472	-	2283	2141-2562	-
Jour 1	6	2,99	1,34-5,32	0,05	878	583-1868	0,10	2856	2438-3186	0,11
Jour 2	6	3,39	1,17-5,75	0,02	598	444-1812	0,01	2246	877-2684	0,85
Jour 3	6	5,99	4,85-7,99	<0,001	450	345-484	<0,001	2588	2169-2892	0,62
Jour 4	6	6,72	6,27-7,82	<0,001	407	316-468	<0,001	2737	2230-3003	0,26
Jour 5	6	4,62	1,68-7,08	<0,001	nd			nd		

Nous nous sommes ensuite intéressés à l'évolution du débit urinaire et de l'osmolalité urinaire au cours des quatre premières heures suivant chaque injection. Nous avons constaté une importante hétérogénéité interindividuelle les jours 1, 2 et 5 pour ces deux paramètres. Les deux premiers jours, deux animaux n'ont pas uriné au cours des 4 h post-injection (Figure 32). Un débit urinaire nul ou très faible ne permettait pas de mesurer l'osmolalité urinaire. Tous les animaux ont réagi à MQ-1 seulement à partir du troisième jour de traitement. L'effet maximal survient entre 1 et 2 h, comme observé dans l'expérience précédente, excepté le premier jour pour lequel il est difficile d'établir à quel moment il se produit (Figure 32). Au jour 4, le débit urinaire maximal était de 60,17 ml/h/kg, soit comparable à celui observé aux fortes doses testées en injection unique (68,41 ml/h/kg entre 1 et 2 h avec une dose à 0,1 $\mu\text{mol/kg}$, Figure 28-a).

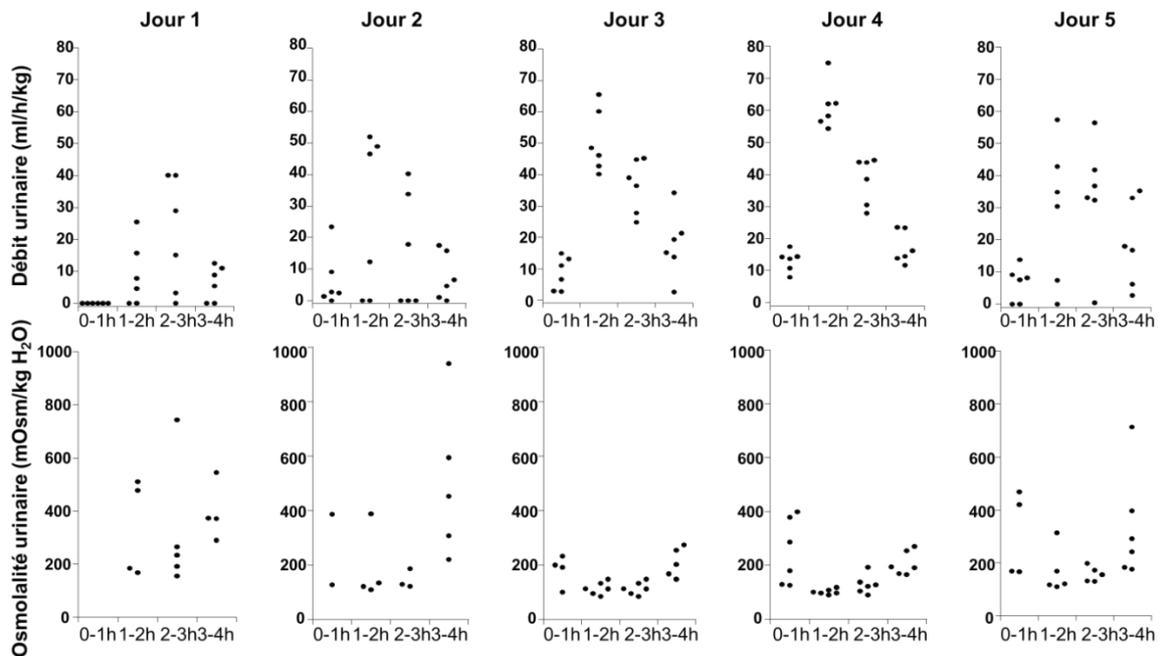


Figure 32 – Débit et osmolalité urinaires les quatre premières heures suivant une injection IP quotidienne de MQ-1 à 0,003 $\mu\text{mol/kg}$ pendant cinq jours. Chaque point représente un individu. L'osmolalité n'a pas pu être mesurée lorsque le débit urinaire était trop faible, ce qui explique un n variable pour l'osmolalité urinaire.

Les valeurs de débit et d'osmolalité urinaire relevées le premier jour de cette expérience témoignent d'un effet aquarétique moins prononcé que celui obtenu après une injection unique de MQ-1 à la même dose (débit urinaire : 2,99 contre 5,13 ml/h/kg ; osmolalité urinaire : 878 contre 503 mOsm/kg H₂O). Ce résultat peut être dû à l'importante hétérogénéité de la réponse constatée, elle-même pouvant provenir d'une erreur de manipulation lors de l'injection de la toxine. Concernant les données du cinquième jour, l'hypothèse d'une mauvaise injection peut aussi être retenue, mais elles peuvent aussi résulter de la mise en place de systèmes de compensation de l'effet aquarétique pour pallier les pertes d'eau, tels qu'une hypersécrétion de vasopressine. Il serait intéressant de poursuivre cette étude sur une plus longue période pour savoir si l'effet aquarétique se maintient les jours suivants, avec quelle intensité et vérifier l'absence d'apparition d'une résistance au traitement. Les résultats obtenus lors de l'essai thérapeutique mené sur les souris CD1-*pcy/pcy* pendant 99 jours (Ciolek *et al.* 2017) montrent que ce n'était pas le cas sur ce modèle-là mais cela reste à être confirmé sur d'autres modèles animaux. De plus, même si l'effet de la toxine se poursuit malgré les systèmes de compensation mis en place par l'organisme, il est indispensable de les identifier et de vérifier qu'ils n'induisent pas d'effets délétères secondaires pour l'individu traité.

L'effet cumulatif de MQ-1 a déjà été décrit chez les souris CD1-*pcy/pcy* traitées par une dose équivalente de MQ-1 injectée IP quotidiennement pendant six jours (Ciolek *et al.* 2017). Malgré la dispersion des données lors de notre expérience, nous observons une nette progression de l'effet aquarétique au cours des quatre premiers jours. Nous avons vu avec les injections uniques qu'en dessous d'une dose limite, située entre 0,001 et 0,003 $\mu\text{mol/kg}$, nous n'observons plus d'effet aquarétique. Vingt-quatre heures après l'injection, MQ-1 n'est peut-être pas totalement éliminée mais sa concentration circulante seulement trop faible pour induire une activité quantifiable. Lors de l'injection suivante, la quantité de MQ-1 administrée s'ajouterait donc à celle résiduelle et provoquerait ainsi un effet supérieur à celui de la veille. D'autre part, il est possible que l'augmentation de l'effet soit due à une désensibilisation du récepteur par la toxine liée à son activité agoniste inverse, qui sera décrite dans la partie IV.C.3 des Résultats et discussion.

II. Découverte de nouvelles toxines aquarétiques

*A. Criblage des venins des autres *Dendroaspis**

La première toxine antagoniste du récepteur de type 2 à la vasopressine (V2R) a été découverte dans le venin du mamba vert (*Dendroaspis angusticeps*). Cependant, il existe trois autres mambas (*D. viridis*, *D. polylepis* et *D. jamesoni*) susceptibles de contenir des toxines analogues.

Un gramme de chacun des trois venins a été fractionné en fonction du point isoélectrique sur résine échangeuse d'ions. Le venin de *D. viridis* a généré 35 fractions dites « mères », celui de *D. polylepis* en a généré 33 et celui de *D. jamesoni* a généré 26 fractions. Toutes ont été refractionnées par chromatographie liquide en phase inverse, ce qui a permis d'obtenir respectivement 501, 435 et 340 fractions « filles ». Leur capacité à inhiber la liaison de la vasopressine tritiée (³H-AVP) sur V2R a été évaluée par compétition. Les fractions actives ont été à nouveau fractionnées jusqu'à obtention d'une fraction pure. C'est ainsi qu'ont été isolées sept fractions actives sur V2R.

Nos collaborateurs de l'université de Liège (Docteur Loïc Quinton, Laboratoire de Spectrométrie de masse, Université de Liège, Belgique) ont résolu les séquences des sept toxines par techniques bottom-up et top-down avec une excellente confiance (écarts inférieurs à 10 ppm entre les masses théoriques et expérimentales). L'une des fractions actives de *D. polylepis* contenait deux séquences homologues inséparables par HPLC, différant uniquement par leur position 24, occupée soit par une alanine, soit par une sérine. Une toxine de *D. viridis* avait la particularité de ne compter que 56 résidus au lieu de 57 pour toutes les autres. Les toxines ont été nommées mambaquarétine (MQ) et numérotées en fonction de leur pourcentage de similarité de séquence avec MQ-1, qui varie de 70,2 à 98,2 % (Tableau 6). Les deux toxines indissociables ont été nommées MQ-7/MQ-8 et sont représentées en proportion 60-40 % dans la fraction naturelle. Deux groupes se distinguent : les toxines partageant plus de 90 % de similarité de séquence, de MQ-2 à MQ-6, et les suivantes qui ont une similarité autour de 70 %. En tout, ce sont donc huit nouvelles toxines affines pour V2R qui ont été identifiées.

Tableau 6 – Nouvelles toxines de mambas affines pour V2R. Noms des mambaquarétines (MQ) d'après la nomenclature de King (King *et al.* 2008). Les cystéines (C) des séquences sont notées en rouge et en gras. La position 24, qui différencie les MQ-7 et MQ-8, est notée en gras, ces deux séquences ne pouvant être séparées. La similarité de séquences par rapport à MQ-1 a été calculée par le programme en ligne EMBOSS Needle et la matrice BLOSUM90 (Rice *et al.* 2000). Qté : quantité ; Th. : théorique ; Exp. : expérimentale ; ppm : partie par million ; *D.* : *Dendroaspis* ; Sim : similarité de séquence.

Toxine	Criblage		Masse monoisotopique			Alignement	
	Espèce	Qté dans venin (%)	Th. (Da)	Exp. (Da)	Δ Th/Exp (ppm)	Séquence	Sim. (%)
MQ-1	<i>D. angusticeps</i>	0,15	6366,9430	6366,9410	0,3	RPSEFCNLVVKPGPCNGFFSAFYYSQKTNKCHSFTYGGCKGNANRFSTIEKCRRTC	CVG
MQ-2	<i>D. viridis</i>	0,05	6395,8968	6395,8528	6,9	RPSEFCNLVVKPGPCNGFFSAFYYSQKTNKCHSFTYGGCRGNANRFSTIEECRRTC	CVG 98,2
MQ-3	<i>D. polylepis</i>	0,8	6394,938	6394,8839	8,4	RPSEFCNLVVKPGPCNGFFSAFYYSQKKNKCHSFTYGGCKGNANRFSTIEECRRTC	CVG 96,5
MQ-4	<i>D. viridis</i>	0,5	6423,9394	6423,9870	7,4	RPSEFCNLVVKPGPCSGFFSAFYYSQKTNKCHSFTYGGCRGNANRFSTIEECRRTC	CVG 93,0
MQ-5	<i>D. jamesoni</i>	0,2	6453,9499	6453,9321	2,8	RPSEFCNLVVKPGPCSGFFSAFYYSQKTNKCHSFTYSGCRGNANRFSTIEECRRTC	CVG 91,2
MQ-6	<i>D. viridis</i>	0,2	6406,9492	6406,8608	13,7	RPSEFCNLVVKPGPCSGFFSAFYYSQKTNKCHSFTYGGCRGPNRFRSTIEECRRTC	CVG 91,2
MQ-7/	<i>D. polylepis</i>	0,1	6465,0123	6465,0055	1,1	RPYACELIVAAGPCMFFFISAFYYAKGANKCYPFTYSGCRGNANRFKTIIEECRRTC	CVV 71,9
MQ-8			6481,0073	6480,9941	2	RPYACELIVAAGPCMFFFISAFYYSKGANKCYPFTYSGCRGNANRFKTIIEECRRTC	CVV 71,9
MQ-9	<i>D. viridis</i>	0,15	6202,8117	6202,8485	5,9	RPYACELTVAAGPCLRFSAFYYSKGANQCYPFNYSGCGGNANRFSTNQKCRRTC	CVV 70,2

La quantité que représente chaque toxine par rapport à l'ensemble du venin est toujours inférieure à 1 % (Tableau 6). À de telles quantités, les MQ ne sont probablement pas directement impliquées dans la toxicité première des venins de mambas. Leur fonction dans le venin est difficile à établir mais pourrait être le fruit de l'évolution de toxines qui

ont perdu ou sont en train d'acquérir d'autres fonctions, plus importantes pour l'hôte. Le cas des MQ illustre parfaitement la diversité fonctionnelle des toxines et l'intérêt de cribler les venins à large échelle afin de trouver des activités originales qui seront exploitables dans un but thérapeutique ou comme outil de recherche.

B. Arbre phylogénétique

Devant cet ensemble de toxines Kunitz portant une nouvelle activité originale, nous nous sommes intéressés à la place qu'il occupe dans la phylogénie des toxines Kunitz. Avec l'aide du Docteur Ricardo Rodriguez de la Vega (Centre national de Recherche Scientifique, Laboratoire d'Écologie, Systématique et Évolution, Orsay), nous avons obtenu un arbre phylogénétique ancré à partir de trois séquences de BPTI et qui présente 50 toxines Kunitz (Figure 33). Toutes les toxines proviennent de vipéridés ou d'élapidés, comme décrit dans la littérature.

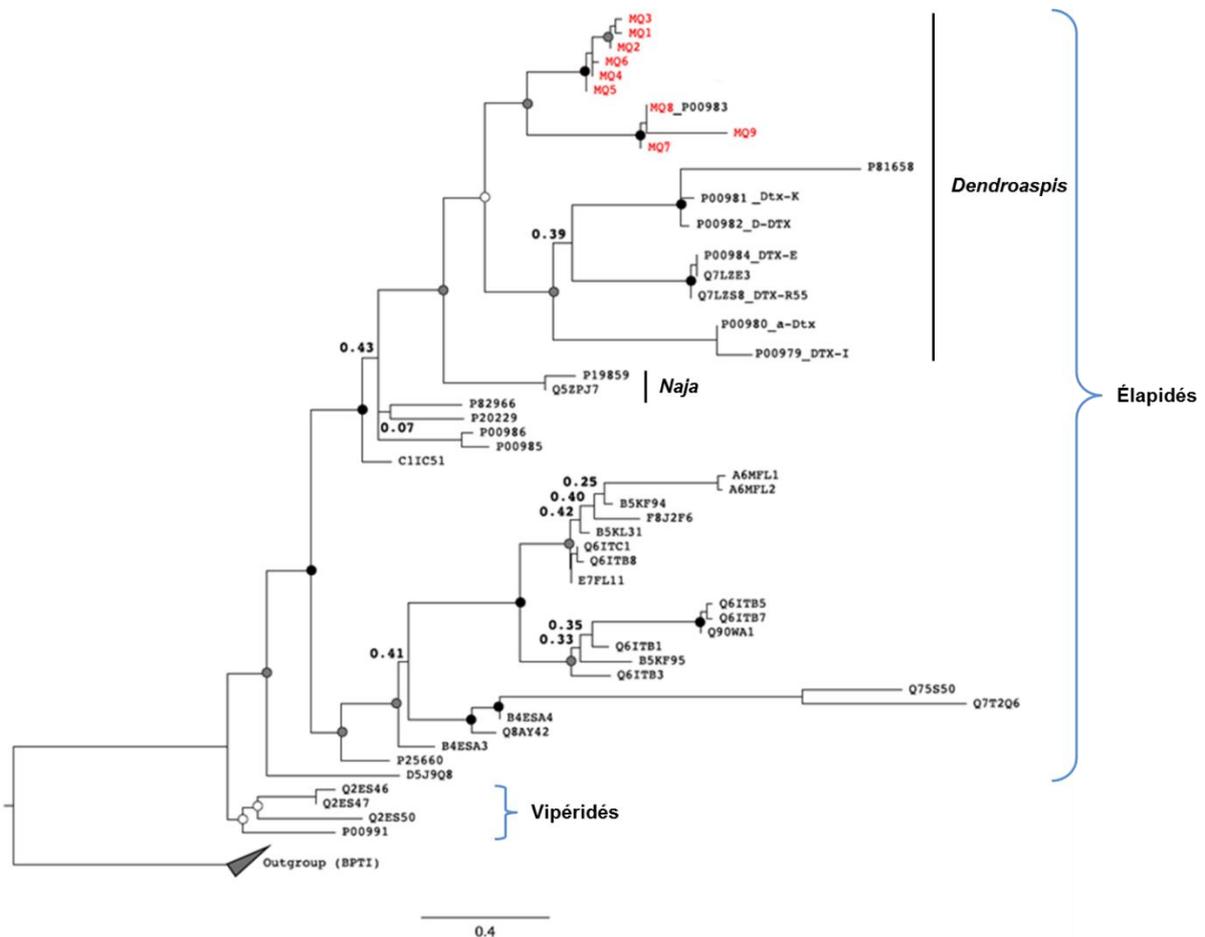


Figure 33 – Arbre phylogénétique des toxines Kunitz proches de MQ-1. La couleur des nœuds est représentative de leur fréquence d'apparition parmi les 3000 arbres les mieux soutenus sur les 4 millions générés. Blanc : 50 à 70 % ; gris : 70 à 90 % ; noir : 90 à 100 %. En rouge : les mambaquarétines (MQ). Les toxines de l'arbre sont identifiées par leur identifiant issu de la base de données UniProt (Bateman *et al.* 2017).

- Toutes les MQ appartiennent à une même branche de l'arbre. Elles se divisent en deux groupes : les MQ-1 à 6 d'une part et la MQ-7/MQ-8 et MQ-9 d'autre part. Cette division est cohérente avec les pourcentages de similarité de séquences par rapport à MQ-1, le premier groupe correspondant aux MQ qui partagent plus de 90 % de similarité de séquence et le second groupe à celles qui partagent autour de 70 % de similarité de séquence. Il s'avère que la séquence correspondant à MQ-8 était déjà répertoriée dans les bases de données sous le numéro P00983 sans qu'aucune activité biologique ne lui soit associée.
- La branche suivante regroupe les autres toxines Kunitz issues de venins de mambas. Certaines ont déjà été caractérisées pharmacologiquement : les dendrotoxines (Dtx) qui bloquent différents sous-types de Kv1 (Dtx-K, δ -Dtx, α -Dtx et Dtx-I), et la calcicludeine qui bloque un canal calcique. Les trois autres toxines, ϵ -Dtx, ϵ -Dtx-R55 et Q7LZE3, sont très probablement des inhibiteurs de la trypsine d'après leurs séquences qui présentent le doublet Lys-Ala aux positions 15-16.
- Vient ensuite une branche regroupant deux toxines de cobra (*Naja*), P19859 et Q5ZPJ7. Toutes deux possèdent dans leurs séquences les résidus caractéristiques des inhibiteurs spécifiques de chymotrypsine (respectivement en P1-P'1 Phe-Gly et Phe-Ala) et cette activité a été démontrée pour Q5ZPJ7 (Shafqat *et al.* 1990; Zhou *et al.* 2004).
- Les branches suivantes sont composées de toxines issues de divers élapidés. Enfin, la branche la plus éloignée regroupe quatre toxines issues de différentes espèces de vipéridés.

C. Découvertes de nouvelles toxines inhibitrices de V2R

De la même façon que les toxines Kunitz qui bloquent les Kv existent dans plusieurs espèces venimeuses, nous nous sommes demandé si d'autres toxines antagonistes de V2R pouvaient se trouver parmi celles figurant dans l'arbre phylogénétique généré. Cette interrogation est d'autant plus légitime que la majorité des séquences répertoriées dans les bases de données n'ont jamais été caractérisées expérimentalement et qu'une activité biologique ne leur est attribuée que par homologie de séquence.

Nous nous sommes d'abord intéressés à la branche la plus proche de celle des MQ qui regroupe des dendrotoxines de mamba. Comme démontré par Ciolek *et al.*, la présence du doublet Lys-Ala aux positions P1-P'1 n'est pas compatible avec une activité sur V2R. Nous avons donc écarté de la suite de l'étude les trois toxines possédant cette séquence (ϵ -Dtx, ϵ -Dtx-R55 et Q7LZE3). En revanche, nous avons vérifié l'affinité pour V2R des cinq autres dendrotoxines. Les quatre inhibiteurs de Kv peuvent être groupés par deux selon la longueur et les similitudes de leur séquence : les toxines à 57 résidus Dtx-K et δ -Dtx, respectivement issues des venins de *D. polylepis* et *D. angusticeps*, partagent respectivement 61,4 et 63,2 % de similarité de séquence avec MQ-1. Les toxines à 59 résidus ou 60 résidus Dtx-I et α -Dtx, également issues des venins de *D. polylepis* et *D.*

angusticeps, partagent environ 58 % de similarité de séquence avec MQ-1 (Tableau 7). La calcicludeine, toxine de *D. angusticeps*, partage 55 % de similarité de séquence avec MQ-1.

Tableau 7 – Masse, séquence et similarité de séquence avec MQ-1 des toxines Kunitz testées sur V2R. Les cystéines des séquences sont notées en rouge et en gras afin de faciliter la lecture. La similarité de séquences des toxines par rapport à MQ-1 a été calculée avec l'aide du programme en ligne EMBOSS Needle et la matrice BLOSUM90 (Rice *et al.* 2000). Les masses monoisotopiques ont été calculées par le programme en ligne PROTEIN CALCULATOR v3.4 (Gasteiger *et al.* 2005). th. : théorique. Abréviations des nom d'espèces : *D.* : *Dendroaspis* ; *N.* : *Naja* ; *W.* : *Walterinnisia* ; *B.* : *Bungarus* ; *D.* : *Drysdelia* ; *P.* : *Pseudechis*.

Toxine	Espèce	Masse monoisotopique th. (Da)	Alignement	
			Séquence	Similarité (%)
MQ-1	<i>D. angusticeps</i>	6366,9430	RPSF C NLPVKPG P CNGFFSAFYYSQKTNK C HSFTYGG C KGNANRFSTIEK C RR T CVG	-
Calcicludeine	<i>D. angusticeps</i>	6975,4614	WQPPWY C KPEVRIG S CKKQFSSFYFKWTAKK C LPFLFSG C GGNANRFQ T IG E CR R K C LGK	55,0
Dtx-K	<i>D. polylepis</i>	6555,3154	AAKY C KLPLRIG P CKRKIPSFYKWKAKQ C LPFDYSG C GGNANRFK T IE E CR R T C VG	61,4
δ-Dtx	<i>D. angusticeps</i>	6563,2720	AAKY C KLPVRYG P CKKKIPSFYKWKAKQ C LPFDYSG C GGNANRFK T IE E CR R T C VG	63,2
α-Dtx	<i>D. angusticeps</i>	7060,4634	QPRR L C ILHRN P GR C YDKIPAFYFNQKKQ C ERFDW S G C GGNSNR F K T IE E CR R T C IG	57,6
Dtx-I	<i>D. polylepis</i>	7144,5933	QPLR L C ILHRN P GR C YQKIPAFYFNQKKQ C EGFTW S G C GGNSNR F K T IE E CR R T C IRK	58,3
P19859	<i>N. naja</i>	6497,8936	RPR F C ELAPSAG S CFGFVSSYYNRY S NT C HSFTYSG C KGNANRF R T I DE C NR T CVV	66,7
Q5ZPJ7	<i>N. atra</i>	6380,7292	RPR F C ELAPSAG S CFGFVPSYYNQ S NT C HSFTYSG C GGNANRF R T I DE C NR T CVG	66,7
C1IC51	<i>W. aegyptia</i>	6373,8835	RPR L C ELPAESGL C NAYIPSFYFNPHSHK C QKFM Y GG C GGNAN N F K T I VE C HR T CVG	61,4
D5J9Q8	<i>B. flaviceps</i>	6377,9243	RPKY C NLPPE P GP C HGRKFAYFYHPAS N CK E FV Y GG C GGND N FN F TK D K C Q R AC S G	64,9
B4ESA3	<i>B. multicinctus</i>	6390,9754	RPP F C NLLPE P GR C NAIVRAFYYNSR P R K C LEFP Y GG C GGNAN N F K T I EE C Q R T C AG	63,2
F8J2F6	<i>D. coronoides</i>	6473,1025	RP H F C HL P AD P GR C NAL S EAFYFN P VQ R K C L K F R Y G G C KANAN T F K T I DE C K R T C AA	59,6
E7FL11	<i>P. rossignolii</i>	6739,2200	KDRPR F C EL P AD P GP C NGL F QAFYFN P VQ R K C L K F R Y G G C KGN P NT F K T IE E C K R T C AA	62,7

Nous avons testé les deux toxines de cobra se trouvant sur la branche suivante : P19859 (*Naja naja*) et Q5ZPJ7 (*Naja atra*). Elles partagent toutes les deux 66,7 % de similarité de séquence avec MQ-1 (Tableau 7).

Nous avons ensuite exploré les branches plus éloignées de l'arbre et pour cela nous avons sélectionné cinq séquences issues de diverses espèces pour tester leur affinité sur V2R : C1IC51 (*Walterinnisia aegyptia*), D5J9Q8 (*Bungarus flaviceps*), B4ESA3 (*Bungarus multicinctus*), F8J2F6 (*Drysdelia coronoides*) et E7FL11 (*Pseudechis rossignolii*). Leurs similarités de séquence varient de 59,6 à 64,9 % (Tableau 7).

D. Caractérisation pharmacologique des toxines actives sur V2R

1) Synthèse chimique des toxines

Les MQ ont été synthétisées chimiquement au laboratoire selon un protocole de synthèse et de purification bien établi. Le repliement a été contrôlé par dichroïsme circulaire (Figure 34). Les conditions de repliement classiques n'étaient pas efficaces pour MQ-7/MQ-8 et MQ-9. Après de nombreux essais, la séquence correspondant à MQ-8 n'a pu être oxydée correctement qu'une seule fois et avec un faible rendement. Par la suite,

pour les tests *in vitro*, nous avons utilisé soit la toxine synthétique MQ-8, soit la fraction naturelle contenant un mélange MQ-7/MQ-8. Le repliement de MQ-9 n'a pas fonctionné et tous les tests la concernant ont été réalisés sur la fraction naturelle de venin. Ces difficultés techniques ont limité la quantité de peptides disponible pour les tests de caractérisation qui suivent.

Concernant les toxines issues de l'arbre phylogénétique, les fractions naturelles des cinq dendrotoxines étaient disponibles au laboratoire et les sept autres séquences retenues ont été synthétisées chimiquement et repliées au laboratoire (Figure 34).

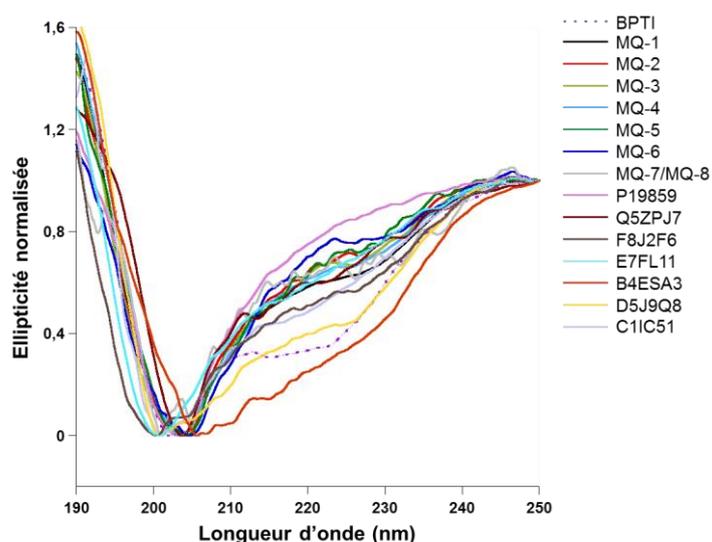


Figure 34 – Dichroïsme circulaire des toxines synthétiques. Spectres de dichroïsme circulaire des toxines synthétiques représentés par l'ellipticité normalisée sur les longueurs d'onde de 190 à 250 nm. Le spectre du BPTI, obtenu dans les mêmes conditions, est utilisé comme référence. Le minimum à 220 nm pour le spectre du BPTI s'explique par la longueur de l'hélice α en N-terminal, plus longue dans le BPTI que dans les MQ.

2) Affinité pour V2R

L'affinité pour V2R des nouvelles toxines a été déterminée par un test de liaison par compétition avec une quantité connue de ^3H -AVP. Toutes les MQ synthétiques et la fraction naturelle correspondant à MQ-9 se liaient à V2R avec des affinités variant de 3 à 45 nM (Figure 35 et Tableau 8). Deux MQ avaient une affinité inférieure à celle de MQ-1 de façon statistiquement significative : MQ-6 ($K_i = 21$ nM, $p = 0,003$) et MQ-9 ($K_i = 45$ nM, $p = 0,001$, Tableau 8).

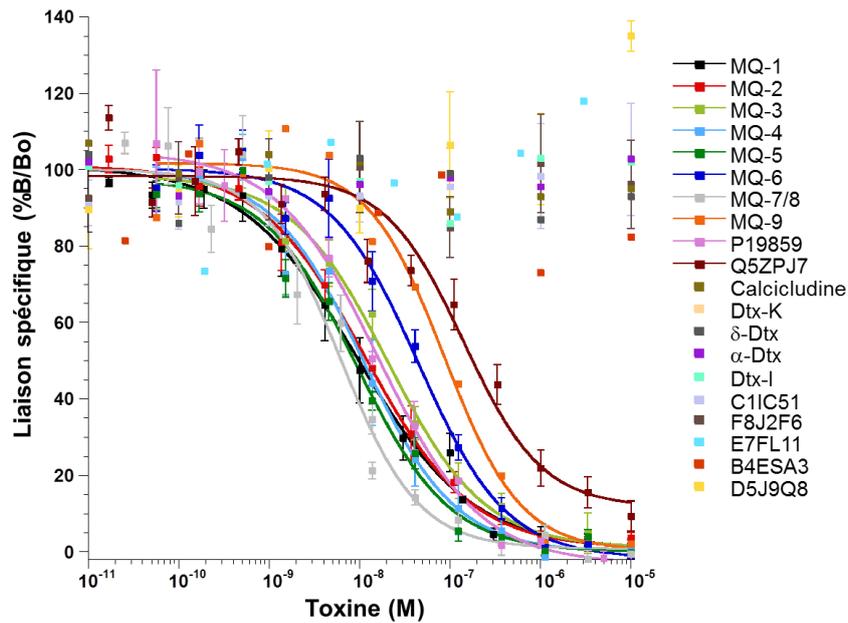


Figure 35 – Liaison de l’AVP tritié sur des membranes de CHO-hV2R en présence de toxines synthétiques ou naturelles. Courbes moyennes de deux ou trois expériences indépendantes, les barres d’erreur correspondent au SEM pour chaque concentration de toxine.

Tableau 8 – Affinité des toxines synthétiques ou des fractions naturelles sur V2R. Les K_i correspondent à la moyenne des valeurs obtenues pour chaque toxine sur deux ou trois expériences indépendantes. Le pK_i correspond à l’inverse du log du K_i en M et permet de réaliser une analyse statistique. L’analyse statistique a été effectuée par un test post-hoc de Dunnett en prenant MQ-1 comme référence. x : n = 2, ne permet pas de calculer un SEM.

Toxine	K_i (nM)	pK_i	SEM	p value	Toxine	K_i (nM)	pK_i
MQ-1	5	8,4	0,1	-	Calcicludeine	> 1000	< 5
MQ-2	8	8,2	0,1	0,55	Dtx-K	> 1000	< 5
MQ-3	13	7,9	0,1	0,06	δ-Dtx	> 1000	< 5
MQ-4	7	8,7	0,2	0,96	α-Dtx	> 1000	< 5
MQ-5	4	8,6	0,3	0,96	Dtx-I	> 1000	< 5
MQ-6	21	7,8	0,2	0,002	C1IC51	> 1000	< 5
MQ-7/ MQ-8	3	8,5	0,08	1,00	F8J2F6	> 1000	< 5
MQ-9	45	7,4	x	<0,001	E7FL11	> 1000	< 5
P19859	8	8,1	0,08	0,51	D5J9Q8	> 1000	< 5
Q5ZPJ7	112	7,0	0,08	<0,001	B4ESA3	> 1000	< 5

L’affinité pour V2R des douze toxines issues des bases de données a été étudiée dans les mêmes conditions que pour les MQ synthétiques (Figure 35). Seules les deux toxines de cobra ont montré un K_i inférieur à 10 μ M (concentration maximale testée). P19859 avait une affinité similaire de celle de MQ-1 ($K_i = 8$ nM, $p = 0,51$) et celle de Q5ZPJ7 était statistiquement moins bonne que celle de MQ-1 ($K_i = 112$ nM, $p < 0,001$) (Tableau 8). Les dix autres toxines n’ont montré aucune affinité pour le récepteur aux

concentrations testées (Figure 35). Nous ne sommes pas allés plus loin dans la caractérisation des ces toxines non affines.

Cette expérience met en évidence l'importante méconnaissance que nous avons du monde des toxines. Alors que toutes les toxines testées ou ayant servi à la construction de l'arbre phylogénétique sont répertoriées en tant qu'inhibiteurs de trypsine par homologie avec le BPTI, peu d'entre elles présentent les caractéristiques structurales de cette activité et leur réelle activité biologique n'est pas connue.

3) Caractérisation fonctionnelle *in vitro*

Pour tester l'activité cellulaire des nouvelles toxines affines pour V2R, leur effet sur la formation d'AMPc dans des cellules CHO-hV2R stimulées par une concentration fixe d'AVP a été évalué par compétition. La concentration d'AVP utilisée correspondait à sa concentration efficace 80 (EC80) déterminée au préalable par une courbe dose-réponse (Figure 36). L'EC80 de l'AVP était de 1,77 nM.

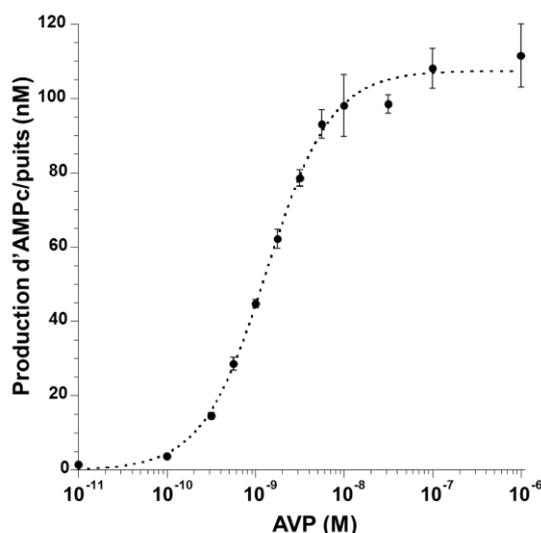


Figure 36 – Production d'AMPc en présence d'AVP dans des cellules CHO-hV2R. Courbe représentative de trois expériences indépendantes, les barres d'erreur correspondent au SEM pour chaque concentration d'AVP testée trois fois.

Testées jusqu'à 10 μ M, toutes les MQ ainsi que les deux toxines de cobra inhibaient la production d'AMPc avec des IC₅₀¹⁰ variant de 23 à 570 nM (Figure 37). En l'absence d'AVP, les toxines n'avaient aucun effet sur la formation d'AMPc. L'efficacité des MQ-3 et MQ-6 était statistiquement inférieure à celle de MQ-1 (respectivement, IC₅₀ = 453 et 570 nM, $p < 0,001$ pour les deux valeurs, Tableau 9) alors que les toxines MQ-4 et MQ-5

¹⁰ Le choix d'exprimer les résultats des tests de fonction en IC₅₀ et non en K_i est expliqué dans la partie Matériel et méthodes (II.C.4).

étaient statistiquement plus efficaces (respectivement, $IC_{50} = 26 \text{ nM}$, $p = 0,003$ et $IC_{50} = 23 \text{ nM}$, $p < 0,001$, Tableau 9). Comme MQ-1, toutes sont donc des antagonistes de V2R.

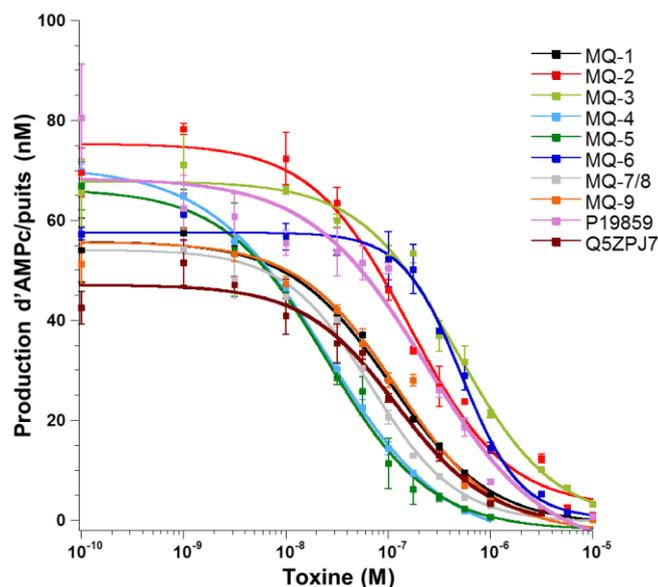


Figure 37 – Production d’AMPC par les cellules CHO-hV2R stimulées par 1,77 nM d’AVP en présence de toxines synthétiques ou naturelles. Courbes représentatives de trois expériences indépendantes, les barres d’erreur correspondent au SEM pour chaque concentration de toxine testée trois fois.

Tableau 9 – Activité des toxines synthétiques ou des fractions naturelles sur V2R. Les IC_{50} correspondent à la moyenne des valeurs obtenues pour chaque toxine sur trois expériences indépendantes. Le pIC_{50} correspond à l’inverse du log de l’ IC_{50} en M et permet de réaliser une analyse statistique. L’analyse statistique a été effectuée par un test post-hoc de Dunnett en prenant MQ-1 comme référence.

Toxine	IC_{50} (nM)	pIC_{50}	SEM	p value
MQ-1	101	7,0	0,04	-
MQ-2	224	6,7	0,1	0,14
MQ-3	453	6,4	0,1	< 0,001
MQ-4	26	7,6	0,1	0,003
MQ-5	23	7,8	0,3	< 0,001
MQ-6	570	6,3	0,2	< 0,001
MQ-7/ MQ-8	58	7,3	0,2	0,35
MQ-9	111	7,0	0,1	1,00
P19859	208	6,7	0,1	0,14
Q5ZPJ7	97	6,9	0,1	0,74

4) Modélisation de la structure tertiaire des nouvelles toxines aquarétiques

La structure tertiaire des MQ-2 à 9 ainsi que celle de P19859 et de Q5ZPJ7 ont été modélisées et alignées avec la structure cristallographique de MQ-1 par le Docteur Enrico

Stura (Service d'Ingénierie Moléculaire des Protéines – SIMOPRO, CEA Saclay, Gif-sur-Yvette) (Figure 38-a). Les squelettes peptidiques des 11 toxines se superposent parfaitement, à l'exception de celui de la boucle 1 de MQ-9 qui est plus courte d'un résidu dans cette région. Par modélisation, le C α de Leu de MQ-9 est proche de celui de Asn15 de MQ-1, le C α de Arg est proche de celui des Phe17 des autres toxines et la Phe de MQ-9 recouvre parfaitement la Phe18 des MQ-1 à 6 (Figure 38-b). La délétion de MQ-9 peut être supposée au niveau de la position 16 par rapport aux autres toxines. Cependant, il ne s'agit que d'un modèle prédictif. L'organisation spatiale différente de la boucle 1 de MQ-9 explique probablement son affinité pour V2R significativement inférieure à celle de MQ-1.

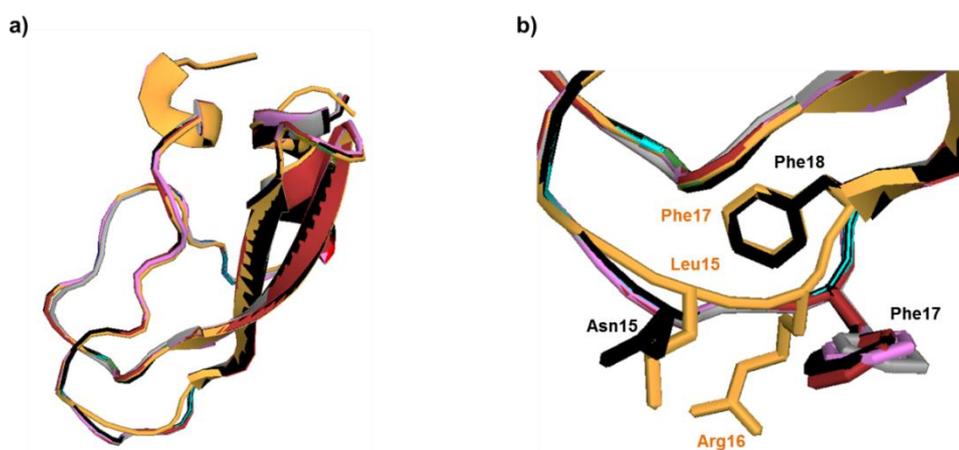


Figure 38 – Comparaison des structures tertiaires modélisées des nouvelles toxines actives sur V2R avec la structure cristallographique de MQ-1. a) Superposition des structures tertiaires des 11 toxines. b) La chaîne latérale de la Phe17 de MQ-9 (orange), qui a un résidu en moins dans cette région, se superpose avec la chaîne latérale de la Phe18 des autres toxines. MQ-1 : noir ; MQ-2 : rouge ; MQ-3 : vert clair ; MQ-4 : bleu clair ; MQ-5 : vert foncé ; MQ-6 : bleu foncé ; MQ-7/MQ-8 : gris ; P19859 : rose ; Q5ZPJ7 : marron.

5) Caractérisation fonctionnelle *in vivo*

Après avoir caractérisé *in vitro* les MQ, nous avons voulu savoir si elles étaient efficaces *in vivo* et si elles engendraient un effet aquarétique semblable à celui de MQ-1. En nous basant sur l'étude de la relation dose-activité de MQ-1, nous avons choisi d'injecter une dose intermédiaire, 0,03 $\mu\text{mol/kg}$, qui nous permettait d'apprécier aussi bien un effet supérieur qu'inférieur. Le V2R du rat partage 88 % d'homologie de séquence avec celui humain. La majorité des différences se situe dans les boucles extracellulaires, première zone d'interaction avec les ligands. Il conviendra de tenir compte de cette information pour comparer les résultats obtenus ici avec ceux obtenus *in vitro* sur un V2R humain.

L'étude pharmacodynamique a été menée suivant le même protocole que pour MQ-1 : des groupes de six rats Sprague-Dawley mâles, âgés de huit semaines et de poids moyen 250 ± 15 g, ont reçu une injection IP unique d'une des MQ. Les quantités de MQ-

7/8 naturelles disponibles n'étaient pas suffisantes pour les tests *in vivo*. Concernant MQ-9, que nous n'avons pas pu produire chimiquement, nous avons décidé d'injecter directement une dose plus élevée, 0,1 $\mu\text{mol/kg}$, étant donné sa faible affinité pour V2R par test de liaison ($K_i = 45 \text{ nM}$) et bien que son efficacité *in vitro* soit comparable à celle de MQ-1 ($p = 1,00$). Disposant de peu de toxine, seulement deux animaux ont été injectés.

Considérant le débit et l'osmolalité urinaire des vingt-quatre heures suivant l'injection, MQ-2, MQ-3 et MQ-5 ont montré un effet aquarétique similaire à celui de MQ-1 (Figure 39). L'augmentation du débit urinaire provoquée par MQ-4 était statistiquement supérieure à celle provoquée par MQ-1 (respectivement, 14,17 contre 10,45 ml/h/kg, $p = 0,04$) mais ce groupe de seulement cinq animaux présentait une importante hétérogénéité concernant le volume urinaire, ce qui peut expliquer le résultat de l'analyse statistique. La différence d'osmolalité urinaire n'était pas statistiquement significative pour ce groupe. Nous considérerons donc que MQ-4 a un effet aquarétique comparable à celui de MQ-1. Les relevés intermédiaires aux quatre premières heures post-injection n'ont pas montré de différence de cinétique d'action par rapport à MQ-1. Parmi ces toxines, MQ-3, MQ-4 et MQ-5 n'ont pas montré de corrélation entre leur efficacité *in vitro* (par rapport à MQ-1, $p < 0,001$ pour MQ-3 et MQ-5, $p = 0,003$ pour MQ-4, Tableau 9), et leur effet *in vivo* (pas de différence significative avec MQ-1, Tableau 10).

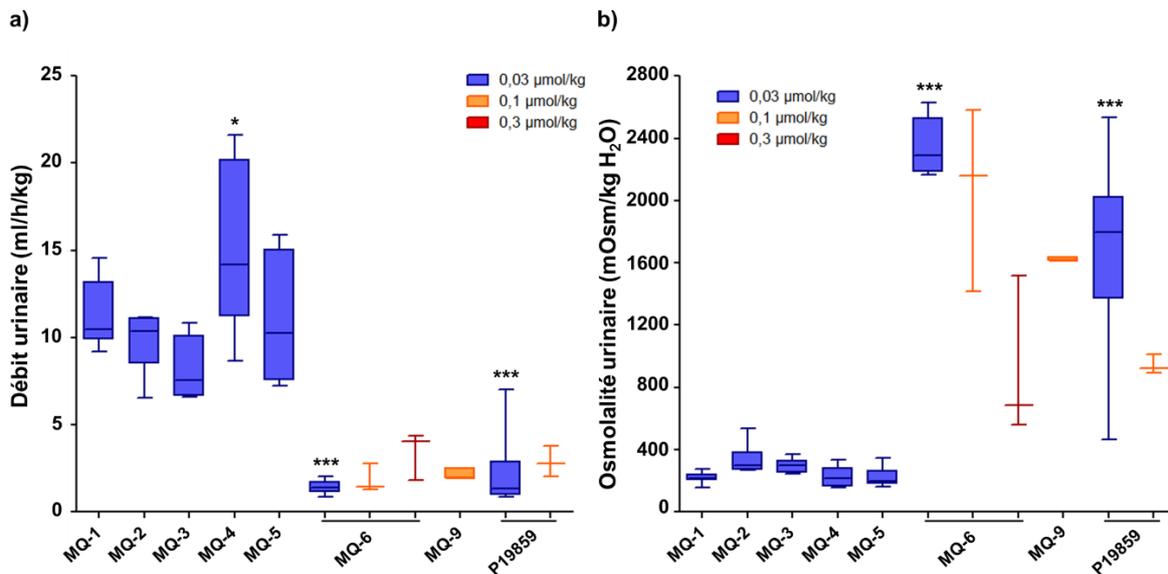


Figure 39 – Débit et osmolalité urinaires sur les vingt-quatre heures après une injection IP unique de toxine. a) Débit urinaire. b) Osmolalité urinaire. Chaque boîte représente Q1, la médiane et Q3, les barres d'erreur correspondent aux valeurs minimales et maximales, excepté pour MQ-9 pour laquelle chaque extrémité de la boîte représente un individu. L'analyse statistique a été réalisée pour la dose 0,03 $\mu\text{mol/kg}$ par un test post-hoc de Dunnett en prenant le groupe placebo comme référence : * pour $p =]0,05-0,01]$, *** pour $p < 0,001$.

Tableau 10 – Paramètres urinaires sur 24 h suivant une injection IP unique de toxine. L'analyse statistique a été réalisée par un test post-hoc de Dunnett en prenant le groupe MQ-1 comme référence, uniquement sur les groupes ayant reçu 0,03 $\mu\text{mol/kg}$ de toxine. Grisé : groupes pour lesquels le nombre d'animaux est inférieur à six et qui n'ont pas été soumis à une analyse statistique. *Italique* : médiane ou moyenne car $n = 2$.

Toxine	Dose ($\mu\text{mol/kg}$)	n	Débit urinaire (ml/h/kg)			Osmolalité urinaire (mOsm/kg H ₂ O)			Excrétion osmolaire ($\mu\text{Osm/h/kg}$)		
			Médiane	[min-max]	pvalue	Médiane	[min-max]	pvalue	Médiane	[min-max]	pvalue
MQ-1	0,03	11	10,45	9,17-14,54	-	214	154-275	-	2280	1900-3082	-
MQ-2	0,03	6	10,36	6,53-11,18	0,65	296	269-534	0,88	3036	2781-3415	0,07
MQ-3	0,03	6	7,55	6,59-10,82	0,08	298	246-368	0,98	2084	1984-2515	0,75
MQ-4	0,03	5	14,17	8,65-21,59	0,04	217	158-336	1,00	3053	2873-3588	0,08
MQ-5	0,03	6	10,25	7,23-15,88	1,00	195	164-348	1,00	2408	1251-3391	1,00
MQ-6	0,03	6	1,41	0,86-2,05	<0,001	2290	2168-2632	<0,001	3221	2271-4434	0,01
MQ-6	0,1	3	1,45	1,26-2,79		2160	1416-2584		3250	3127-3954	
MQ-6	0,3	3	4,02	1,80-4,36		687	560-1515		2695	2486-2850	
MQ-9	0,1	2	2,21	1,92-2,50		1625	1614-1636		3611	3006-4216	
P19859	0,03	6	1,34	0,84-7,01	<0,001	1798	462-2536	<0,001	2411	1841-3073	1,00
P19859	0,1	3	2,77	2,04-3,77		922	891-1013		2781	1852-3432	

La toxine MQ-6 n'a pas montré d'effet aquarétique à 0,03 $\mu\text{mol/kg}$ (Figure 39). Le débit urinaire des vingt-quatre heures post-injection était comparable à celui du groupe placebo des études précédentes. La valeur d'osmolalité urinaire était statistiquement supérieure (respectivement, 2290 et 1228 mOsm/kg H₂O, $p < 0,001$) ce qui n'est pas compatible avec un effet aquarétique. Il est à noter que l'excrétion osmolaire du groupe MQ-6 était également statistiquement supérieure à celle du groupe MQ-1 ($p = 0,01$, Tableau 10). Cette différence pourrait être le reflet d'un apport en osmoles par la nourriture et la boisson supérieur dans ce groupe, ce qui expliquerait l'augmentation de l'osmolalité urinaire. L'absence d'effet aquarétique *in vivo* de MQ-6 corrobore son efficacité moindre déjà montrée *in vitro* par rapport à MQ-1 ($p < 0,001$, Tableau 9).

Nous avons cherché à savoir si un effet aquarétique apparaissait en multipliant la dose de MQ-6 par 3 (0,1 $\mu\text{mol/kg}$). Le débit et l'osmolalité urinaires étaient comparables à ceux obtenus précédemment avec la dose 0,03 $\mu\text{mol/kg}$ (Figure 39). Nous avons à nouveau augmenté la dose pour atteindre 0,3 $\mu\text{mol/kg}$. Le débit urinaire était alors augmenté d'un facteur 2,8 (4,02 ml/h/kg) et l'osmolalité urinaire était diminuée d'un facteur 3,1 (687 mOsm/kg H₂O, Tableau 10). L'excrétion osmolaire restait similaire à celle des autres groupes ayant reçu une des MQ, ce qui démontre donc un effet aquarétique. Si nous comparons avec les doses de MQ-1, la dose 0,3 $\mu\text{mol/kg}$ de MQ-6 provoque un effet se rapprochant de la dose 0,003 $\mu\text{mol/kg}$ de MQ-1 (débit urinaire = 5,13 ml/h/kg et osmolalité urinaire = 503 mOsm/kg H₂O, Tableaux 3 et 10), soit une efficacité *in vivo* de MQ-6 100 fois inférieure à celle de MQ-1. Il est intéressant de constater que la séquence de MQ-6 diffère de celle de MQ-5 seulement en deux résidus (aux positions 36 et 41) mais qui suffisent à modifier radicalement son activité. Si l'alignement des séquences montre que la position 36 peut-être occupée soit par une Gly soit par une Ser (Ser pour MQ-5, Gly

pour MQ-6), la Pro en 41 est spécifique de MQ-6 (Tableau 6). Ce résidu sera discuté dans l'exploration du pharmacophore de MQ-1 (partie III.A.3 des Résultats et discussion).

L'injection de 0,1 $\mu\text{mol/kg}$ de MQ-9 à deux animaux n'a pas montré d'effet aquarétique comparable à celui de MQ-1 à la même dose (Tableaux 3 et 10), ni même à une dose trois fois inférieure (Figure 39). Le très petit nombre d'individus ne permettait pas de réaliser une analyse statistique. Si nous comparons les chiffres bruts, le débit urinaire induit par MQ-9 est très proche de celui induit par MQ-6 à la même dose (Tableau 10) et l'osmolalité urinaire est du même ordre de grandeur mais la très importante variabilité de ce paramètre dans le groupe MQ-6 à 0,1 $\mu\text{mol/kg}$ limite fortement la comparaison. Nous n'avons pas pu poursuivre notre étude de MQ-9 *in vivo* pour les raisons évoquées dans la partie II.D.1 des Résultats et discussion. De toute évidence, sauf erreur de manipulation, l'efficacité *in vivo* de MQ-9 n'est pas corrélée à sa capacité à inhiber la production d'AMPc *in vitro* puisque son IC50 était identique à celle de MQ-1 ($p = 1,00$, Tableau 9). Les nombreuses différences de séquence (70,2 % d'identité de séquence avec MQ-1, un résidu en moins dans la boucle 1) pourraient être à l'origine d'une prise en charge différente dans l'organisme, réduisant son efficacité sur V2R.

Concernant les toxines de cobra, Q5ZPJ7 n'a pas pu être caractérisée *in vivo* suite à des difficultés rencontrées lors de sa production mais P19859 a bien été testée dans les mêmes conditions que les autres MQ : une injection unique IP de toxine à 0,03 $\mu\text{mol/kg}$ sur un groupe de 6 rats Sprague-Dawley mâles. Dans les vingt-quatre heures suivant l'injection, le débit et l'osmolalité urinaires de P19859 étaient statistiquement très différents de ceux de MQ-1 (1,34 contre 10,45 ml/h/kg pour le débit urinaire et 1830 contre 314 mOsm/kg H₂O pour l'osmolalité urinaire, $p < 0,001$ pour les deux paramètres, Figure 39). En revanche, le débit urinaire était similaire à celui obtenu pour le groupe placebo (1,34 et 1,56 ml/h/kg, $p = 0,99$) et l'osmolalité urinaire était statistiquement supérieure (1798 et 1228 mOsm/kg H₂O, $p = 0,02$). Ainsi, P19859 n'induit aucun effet aquarétique à la dose 0,03 $\mu\text{mol/kg}$. Étonnamment, ce résultat ne corrobore pas l'efficacité démontrée *in vitro* pour cette toxine ($p = 0,37$ par rapport à MQ-1). L'injection de 0,01 $\mu\text{mol/kg}$ de toxine à trois rats a montré un débit urinaire augmenté d'un facteur 2 (2,77 ml/h/kg) et une osmolalité urinaire diminuée d'un facteur 2 (922 mOsm/kg H₂O, Tableau 10). L'excrétion d'osmoles n'était pas modifiée (2781 $\mu\text{Osm/h/kg}$). Ces valeurs se rapprochent de celles obtenues avec MQ-1 à la dose 0,001 $\mu\text{mol/kg}$ (Tableau 3), soit une différence non significative statistiquement par rapport au groupe placebo. Nous n'avons pas suffisamment de toxine pour tester une dose supérieure. Néanmoins, nous pouvons conclure que P19859 est moins efficace que MQ-1 *in vivo* contrairement à ce que montrent les résultats *in vitro*. P19859 ne partage que 66,7 % d'identité de séquence avec MQ-1 et se situe à deux embranchements de la famille des MQ dans l'arbre phylogénétique (Figure 33). Il est envisageable qu'elle subisse un métabolisme différent de celui des MQ qui expliquerait son activité *in vivo* diminuée.

III. Exploration du pharmacophore de la mambaquarétine-1

Les interactions protéines-protéines régissent l'ensemble des processus cellulaires. Savoir les prédire est un enjeu majeur pour comprendre le vivant. Plus spécifiquement, l'étude des relations structure-activité d'un couple ligand-récepteur est indispensable pour la compréhension des interactions entre ces deux partenaires. Il en découle de nombreuses applications comme par exemple l'amélioration des connaissances du fonctionnement moléculaire des récepteurs tels que les récepteurs couplés aux protéines G (RCPG) ou l'ingénierie des ligands dans le cadre d'un développement thérapeutique. Le terme « pharmacophore » désigne « l'ensemble des caractéristiques structurales d'une molécule reconnues par un site du récepteur et qui sont responsables de l'activité biologique de cette molécule » (Gund 1977).

La méthode de choix pour l'étude du pharmacophore d'une molécule est la co-cristallisation du couple ligand-récepteur. Malheureusement, la cristallisation des RCPG est particulièrement complexe, notamment à cause de leur grande flexibilité. Un effort particulier est réalisé par nos collaborateurs de l'équipe du Docteur Bernard Mouillac (Institut de Génomique Fonctionnelle, Montpellier) pour mettre au point la co-cristallisation du complexe mambaquarétine-1-récepteur de type 2 à la vasopressine (MQ-1-V2R), sans succès à l'heure actuelle. Pour pallier ces difficultés, la bioinformatique, à travers ses méthodes de modélisation toujours plus prédictives associées à une puissance de calcul en pleine expansion, représente un outil très performant.

A. Étude comparative des séquences

1) Description des séquences Kunitz naturelles

La première stratégie pour comprendre quels sont les résidus importants pour la liaison des toxines affines au V2R était de comparer l'ensemble des séquences actives entre elles puis de les comparer avec un ensemble de 100 séquences homologues répertoriées dans la base de données UniProt et sélectionnées par l'outil de recherche basique d'alignement local (BLAST) à partir de la séquence de MQ-1 (Bateman *et al.* 2017). Le logiciel en ligne WebLogo nous a permis de représenter la fréquence d'apparition des résidus en fonction de leur emplacement dans la séquence (Figure 40). Étant plus courte d'un résidu dans la boucle 1, la séquence de MQ-9 a été exclue de l'alignement et sera discutée plus tard. D'autre part, Ciolek *et al.* a démontré que la partie N-terminale située en amont de la première cystéine n'est pas en contact avec le récepteur, aussi nous n'étudierons pas la variabilité de cette région. Il en va de même pour la région C-terminale à partir de Cys51.

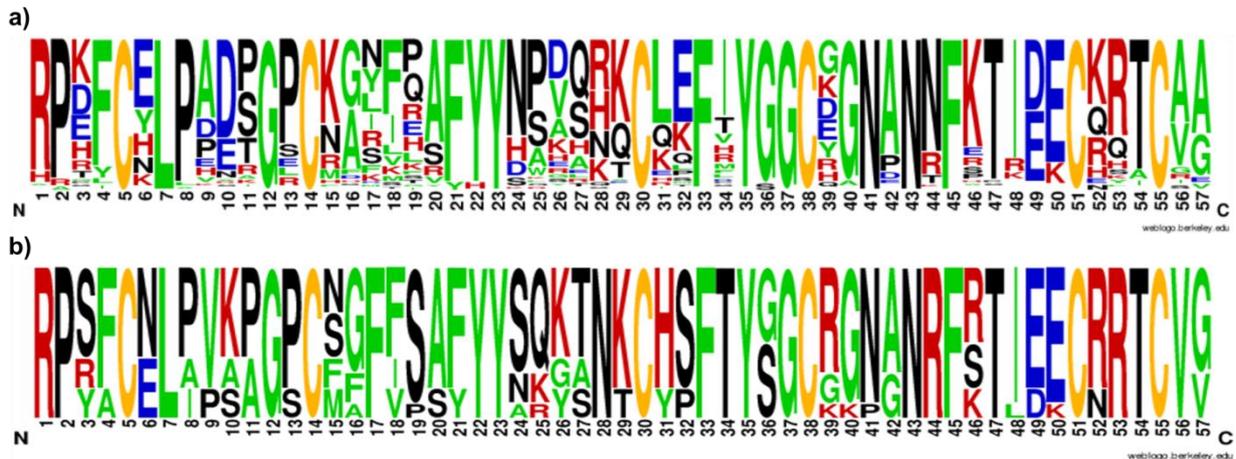


Figure 40 – Alignements de séquences des toxines Kunitz. a) Représentation graphique de l'alignement des 100 séquences de toxines Kunitz les plus proches de MQ-1 issues des bases de données. b) Représentation graphique de l'alignement de 10 séquences de toxines Kunitz actives sur V2R (MQ-9 exclue). La taille des lettres est représentative de la fréquence d'apparition de l'acide aminé correspondant parmi les séquences alignées, la position dans la séquence est indiquée en-dessous des lettres. N et C : extrémité N-terminale et extrémité C-terminale, respectivement. Rouge : acides aminés chargés positivement ; bleu : acides aminés chargés négativement ; orange : cystéines ; vert : acides aminés hydrophobes ; noir : autres. Représentation réalisée grâce au logiciel en ligne WebLogo (Crooks *et al.* 2004).

Si nous regardons l'alignement des séquences de toxines affines pour V2R dans leur ensemble, les six cystéines sont bien alignées et strictement conservées, tout comme les positions 23, 33, 35 et 43 qui participent au maintien de la structure Kunitz (Hanson *et al.* 2003). La position 44, également décrite comme impliquée dans la structure, est néanmoins moins conservée et sera discutée plus bas (Figure 40-b). D'autre part, les toxines aquarétiques possèdent de nombreux résidus chargés : dix positions préférentiellement chargées positivement (résidus 1, 10, 26, 29, 31, 39, 44, 46, 52 et 53), et deux chargées négativement (positions 49 et 50) (hors charges terminales). Le nombre de résidus chargés positivement et leur distribution tout au long de la séquence laissent imaginer une grande complémentarité entre MQ-1 et le récepteur qui possède lui-même huit charges négatives dans sa partie extracellulaire.

Si nous inspectons maintenant de façon plus détaillée la séquence, une première différence ressort sur la position 10 qui est très majoritairement occupée par un acide aminé chargé négativement dans l'ensemble des Kunitz (Asp ou Glu), alors que chez les toxines aquarétiques, elle est occupée soit par un acide aminé chargé positivement (Lys), soit par un petit acide aminé (Ala ou Ser). Il a été décrit précédemment que la position 15 (ou P1) ne peut pas être occupée par une charge positive (Ciolek *et al.* 2017). En accord avec ce résultat, l'alignement des séquences actives sur V2R montre que cette position est occupée plutôt par des acides aminés hydrophobes, plus ou moins volumineux, mais en aucun cas chargés, contrairement à l'alignement des Kunitz non actifs qui montre une prédominance d'un acide aminé à charge positive. Alors que les positions 17 à 20 des

Kunitz en général sont particulièrement versatiles, cette région des toxines aquarétiques semble répondre à des règles bien définies. La position 17 est strictement conservée avec une Phe, la position 18 est peu variable et toujours occupée par un acide aminé hydrophobe (Phe, Ile ou Val) et les positions 19 et 20 sont toujours remplies par un petit acide aminé (Ala, Ser, Pro). Les positions 25 et 26, particulièrement variables chez les Kunitz, sont principalement occupées par un acide aminé chargé positivement dans les séquences de toxines affines pour V2R mais jamais par un résidu chargé négativement. La position 28 est strictement conservée avec une Asn, alors qu'il y a souvent un résidu chargé positivement à cet emplacement dans les séquences de Kunitz. La position 32 est, comme 19 et 20, toujours occupée par un petit résidu (Ser ou Pro) contrairement aux autres toxines Kunitz. La position 39, variable chez la plupart des Kunitz, est majoritairement occupée par un acide aminé chargé positivement (Arg ou Lys) pour les toxines actives sur V2R. De façon très intéressante, alors que la position 41 de l'ensemble des Kunitz est parfaitement conservée (Asn), ce n'est pas le cas chez les Kunitz actifs sur V2R. En effet, il peut également y avoir une Pro à cet emplacement, qui correspond en réalité à une seule séquence parmi les 11 alignées : MQ-6. La position 44 est strictement conservée avec une Arg pour les toxines aquarétiques, alors qu'elle est le plus souvent occupée par une Asn pour les autres toxines. Enfin, la position 50 est occupée par un résidu chargé positivement ou négativement parmi les toxines actives sur V2R, laissant supposer qu'elle n'est pas engagée dans une interaction ionique, en accord avec son positionnement à proximité de la région C-terminale.

2) Choix des variants

Remplacer un résidu par une Ala est une technique classiquement utilisée, appelée alanine-scanning, pour évaluer l'importance des caractéristiques physico-chimiques du résidu muté pour son interaction avec la molécule partenaire. Dans un premier temps, nous avons donc choisi d'étudier l'impact de la mutation en alanine sur un nombre restreint de résidus. Le variant Asn15Ala nous permettra de définir si c'est la perte d'Asn ou l'ajout d'une charge positive qui est responsable de l'importante perte d'affinité observée avec le variant Asn15Lys. Nous venons de décrire que les positions 17, 18 et 19 paraissent très conservées chez les toxines aquarétiques par rapport à l'ensemble des Kunitz, c'est pourquoi nous avons choisi de synthétiser les variants Ala correspondant. Pour tester l'importance de la charge positive, nous l'avons supprimée des résidus Lys10, Lys26, Lys29 et Arg44. Enfin, nous avons muté la position 41 qui est suspectée d'être responsable de la différence d'affinité et d'activité de MQ-6. Pour investiguer les interactions ioniques, il est classique d'inverser la charge des résidus impliqués afin de créer une répulsion entre les acides aminés, ce qui doit théoriquement se traduire par une importante perte d'affinité. Nous avons utilisé cette stratégie sur les positions 10, 26 et 44 que nous avons substituées par un Glu.

L'ensemble des variants a été synthétisé et leur repliement a été vérifié par dichroïsme circulaire (CD) (Figure 41). Tous les spectres CD sont superposables à celui de MQ-1.

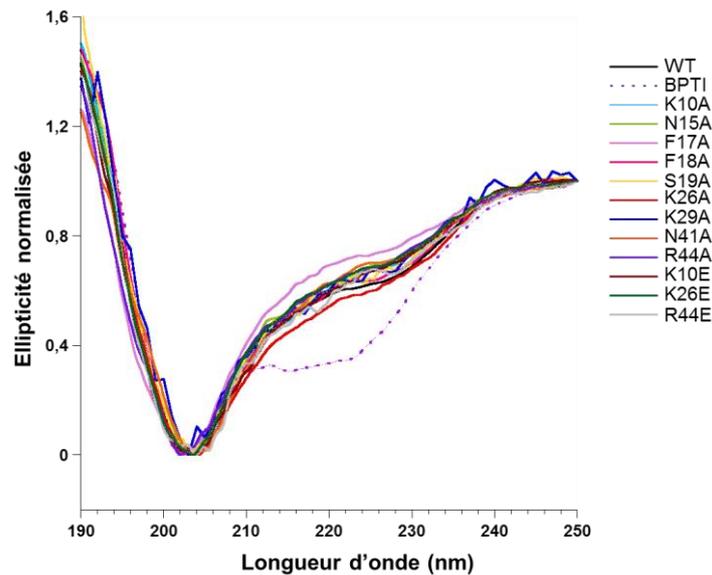


Figure 41 – Dichroïsme circulaire des variants synthétiques de MQ-1. Spectres de dichroïsme circulaire des variants synthétiques représentés par l'ellipticité normalisée sur les longueurs d'onde de 190 à 250 nm. Le spectre du BPTI, obtenu dans les mêmes conditions, est utilisé comme référence. WT : MQ-1 non mutée.

3) Affinité des variants synthétiques de MQ-1 pour V2R et corrélation avec l'affinité des variants naturels

L'affinité des variants générés a été évaluée par test de liaison sur des membranes CHO-hV2R en compétition avec ^3H -AVP et comparée à celle de MQ-1 non mutée. Concernant la boucle 1 de MQ-1, il a été démontré précédemment que la double mutation Asn15Lys/Gly16Ala entraînait une perte d'affinité d'un facteur 1000 ($K_i = 4073$ nM). Ici, le simple variant Asn15Ala n'a pas occasionné de perte d'affinité ($K_i = 4,45$ nM, $p = 1,00$), ce qui laisse supposer que ce n'est pas tant l'Asn qui est importante pour l'interaction entre MQ-1 et V2R mais plutôt la présence d'une charge positive à cet emplacement qui est défavorable. En effet, la majorité des toxines aquarétiques ne possèdent pas d'Asn, mais des résidus de nature chimique variée et non chargés (Ser, Met, Leu, Phe) (Figure 42). L'observation des séquences des autres toxines aquarétiques permet de mettre en évidence que cet emplacement est assez permissif pour ce qui est du volume, étant occupé par une Phe chez MQ-7/8 (Figure 42). Dans le prolongement de la boucle 1 de la toxine, la mutation en Ala de Phe17, strictement conservée chez les toxines actives V2R, a engendré une perte d'affinité d'un facteur 1000 ($K_i = 6685$ nM, $p < 0,001$), démontrant l'importance majeure de ce résidu. La présence d'une Phe spécifiquement à cet emplacement paraît d'autant plus primordiale lorsque nous comparons les séquences de toxines actives avec celles des toxines non actives sur V2R : aucune toxine inactive n'a de Phe en position 17 (Figure 42). La mutation de la position 18, un peu moins conservée chez les toxines

aquarétiques, a provoqué une perte d'affinité d'un facteur 30 ($K_i = 152,4$ nM, $p < 0,001$, Figure 43). Cette position est également importante pour la liaison au récepteur mais plus permissive que la position 17 pour d'autres résidus hydrophobes (Ile pour MQ7/8 et Val pour les deux toxines de *Naja*). À l'exception de D5J9Q8, toutes les autres toxines non actives testées possèdent également un résidu hydrophobe à cet emplacement. La mutation en Ala de Ser19 n'a pas montré de variation significative de l'affinité pour V2R ($K_i = 3,25$ nM, $p = 1,00$), laissant supposer qu'un résidu un peu plus hydrophobe peut être toléré à cet emplacement. C'est une position très conservée chez les toxines aquarétiques, à l'exception de Q5ZPJ7 qui possède une Pro à la place (Figure 42).

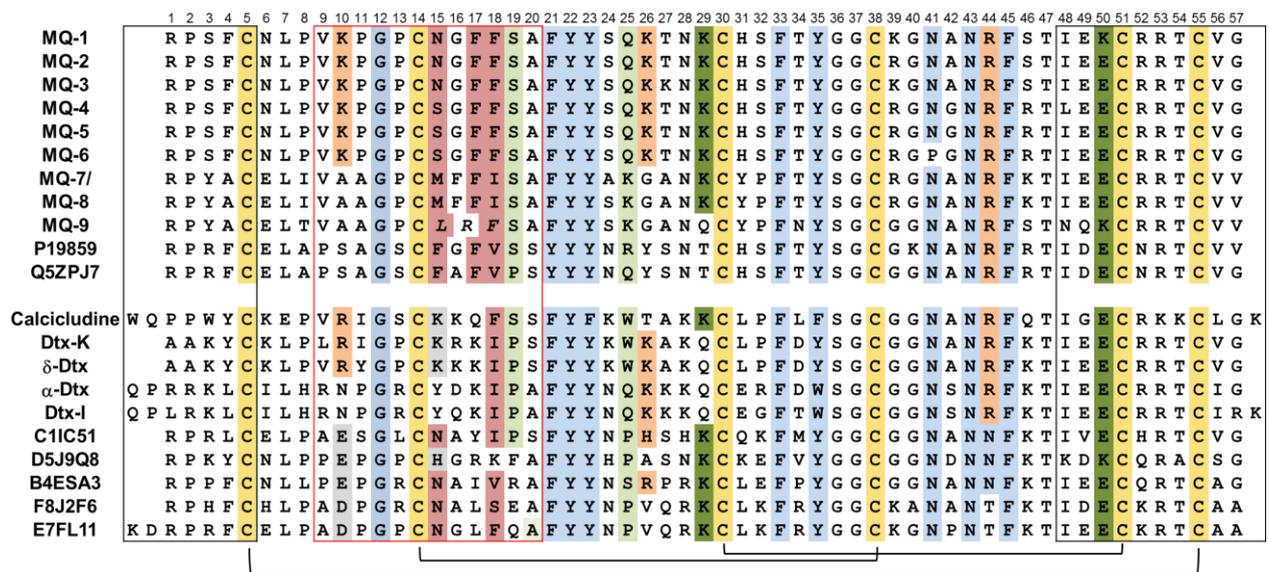


Figure 42 – Alignement de séquences des toxines dont l'affinité a été testée sur V2R. La première moitié du tableau regroupe les toxines qui sont affines pour V2R et la deuxième moitié, les toxines qui ne le sont pas. En *italique* : la boucle 1 de MQ-9, plus courte d'un résidu, n'est pas strictement alignée avec les autres séquences. Encadré en noir : extrémités N- et C-terminales. Encadré en rouge : boucle 1 des toxines. Jaune : cystéines formant les ponts disulfure ; bleu : résidus très conservés chez les toxines Kunitz ; vert clair : positions probablement pas impliquées dans la liaison au récepteur ; vert foncé : positions dont la charge positive n'est pas indispensable à la liaison ; orange : résidus dont la charge positive n'est pas indispensable à la liaison mais ne peut être inversée ; rouge : positions dont la nature du résidu est strictement définie pour la liaison au récepteur ; gris : résidus incompatibles avec la liaison au V2R.

La suppression des charges positives aux positions 10, 26, 29 et 44 n'a pas permis de mettre en évidence une perte d'affinité des variants pour le récepteur (respectivement, $K_i = 7,67$ nM, $p = 0,99$; $K_i = 4,05$ nM, $p = 1,00$; $K_i = 2,50$ nM, $p = 0,95$; $K_i = 15,26$ nM, $p = 0,12$, Tableau 11). En revanche, l'inversion de la charge pour les positions 10, 26 et 44 a provoqué une diminution nette de l'affinité pour deux d'entre elles (10 et 44) et moins marquée pour la troisième (26) (respectivement, $K_i = 570,1$ nM, $p < 0,001$; $K_i = 15,79$ nM, $p = 0,027$; $K_i = 99,25$ nM, $p < 0,001$, Tableau 11) ce qui corroborent l'hypothèse selon laquelle ces résidus sont impliqués dans des interactions ioniques avec V2R (Figure 44). Pour les positions 10 et 26, l'alignement des séquences des toxines testées confirme que

l'absence de charge positive ne s'oppose pas à la liaison au récepteur, les MQ-7/MQ-8 et MQ-9 possédant une Ala en position 10 et une Gly en position 26, et les deux toxines de *Naja* ayant une Ser en position 10 et une Tyr en position 26 (Figure 42). Pour ce qui est de Arg44, elle est strictement conservée chez les toxines aquarétiques mais existe également chez certaines toxines inactives (les quatre dendrotoxines et la calcicludine). La charge positive de cette position n'est donc pas caractéristique des toxines actives sur V2R. La présence de plusieurs points d'interaction forts entre MQ-1 et V2R peut expliquer que la suppression d'une seule de ces interactions (monomutation en alanine) ne suffise pas à affecter significativement l'affinité du variant. En revanche, l'inversion de la charge, même unique, suffirait à créer une répulsion entre les deux partenaires.

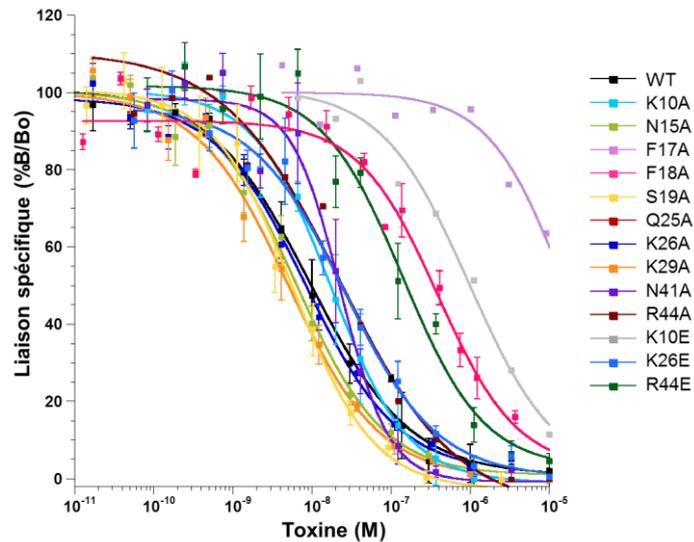


Figure 43 – Liaison de l'AVP tritié sur des membranes de CHO-hV2R en présence des variants synthétiques de MQ-1. Courbes moyennes de deux ou trois expériences indépendantes, les barres d'erreur correspondent au SEM pour chaque concentration de variant. WT : MQ-1 non mutée.

Tableau 11 – Activité des variants synthétiques de MQ-1 sur V2R. Les K_i correspondent à la moyenne des valeurs obtenues pour chaque variant sur deux ou trois expériences indépendantes. Le pK_i correspond à l'inverse du log du K_i en mol/l et permet de réaliser une analyse statistique. L'analyse statistique a été effectuée par un test post-hoc de Dunnett en prenant MQ-1 non mutée comme référence. x : n = 2, ne permet pas de calculer un SEM ; WT : MQ-1 non mutée.

Variant	K_i (nM)	pK_i	SEM	p value	Variant	K_i (nM)	pK_i	SEM	p value
WT	5,02	8,44	0,10	-	K29A	2,50	8,66	0,16	0,95
K10A	7,67	8,24	0,23	0,99	N41A	8,49	8,08	0,06	0,52
N15A	4,45	8,38	0,08	1,00	R44A	15,3	7,83	x	0,12
F17A	6700	5,17	x	< 0,001	K10E	570	6,24	x	< 0,001
F18A	152	6,85	0,10	< 0,001	K26E	15,8	7,80	0,06	0,027
S19A	3,25	8,51	0,10	1,00	R44E	99,3	7,07	0,08	< 0,001
K26A	4,05	8,40	0,05	1,00					

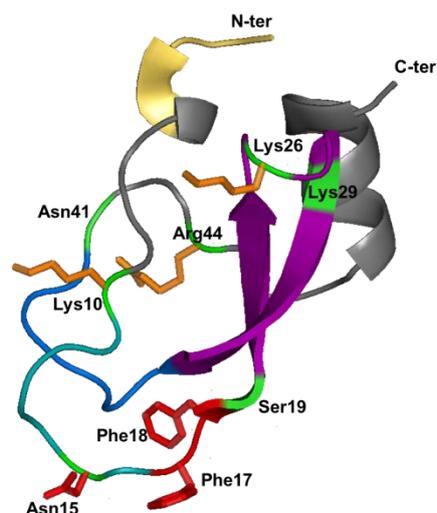


Figure 44 – Résidus mutés sur MQ-1 pour les tests de liaison sur V2R. Modélisation à partir de la structure cristallographique de MQ-1. Couleurs de la chaîne peptidique : bleu clair : boucle 1 ; bleu foncé : boucle 2 ; violet : feuillet β ; jaune : résidus pouvant être supprimés sans modifier l'affinité ; vert : résidus dont la mutation en alanine ne modifie pas l'affinité. Couleurs des chaînes latérales : rouge : résidus dont la mutation en alanine diminue fortement l'affinité ; orange : résidus dont l'inversion (Lys10, Lys26 et Arg44) ou l'ajout (Asn15) d'une charge ionique diminue fortement l'affinité.

Enfin, Asn41 est strictement conservée chez toutes les toxines Kunitz, affines ou non pour V2R, à l'exception de MQ-6 (Figure 40). Le changement en Ala n'a pas montré de modification significative de l'affinité ($K_i = 8,49$ nM, $p = 0,52$) ce qui montre que ce n'est pas la présence d'une Asn en particulier qui est indispensable à cet emplacement. Si nous comparons la séquence de MQ-6 avec celle de MQ-5, elles diffèrent en seulement deux positions : 36 et 41. Par alignement de séquences, il apparaît que la position 36 peut être occupée indifféremment par une Ser ou une Gly. Nous pouvons donc conclure que cette variation n'a pas de conséquence. Ce serait donc Pro41 chez MQ-6 qui justifierait la différence d'affinité et d'activité *in vitro* comme *in vivo* de cette toxine par rapport à MQ-5. Se trouvant à proximité de résidus très conservés indispensables au repliement Kunitz (Phe33, Asn43), il peut être supposé que la présence d'une Pro modifie l'orientation des chaînes latérales des résidus de son environnement, bien que son spectre de dichroïsme circulaire ne montre pas de différence particulière par rapport à celui de MQ-1 (Figure 41).

Cette analyse apporte des éléments de réflexion autour de l'alignement de la boucle 1 de MQ-9. La modélisation de sa structure alignait l'unique Phe avec la position 18 des autres toxines actives sur V2R. Cependant, nous venons de voir que la position Phe17 semble être particulièrement conservée. Il est plus probable que l'organisation spatiale de cette zone de MQ-9 soit différente de celle des autres toxines aquarétiques et il n'est pas possible de les aligner strictement. Seule la cristallisation de cette toxine permettrait de répondre.

B. Modèles d'interaction entre MQ-1 et V2R

En parallèle de l'étude des séquences, nous avons initié une collaboration avec l'équipe de Modélisation Moléculaire du Docteur Nicolas Floquet (Institut des Biomolécules Max Mousseron, Montpellier). Cette équipe a mis au point une méthode de modélisation dynamique des complexes ligand peptidique-récepteur tout à fait innovante permettant de minimiser les calculs tout en optimisant la fiabilité des prédictions. Cette approche a été validée sur deux structures résolues de couples ligand peptidique-RCPG : NTSR1-NTS et CXCR4-CVX15. La modélisation obtenue *ab initio* de ces deux complexes s'approchait de la structure obtenue par cristallisation avec un écart quadratique moyen inférieur à 3 Å (Delort *et al.* 2017). De plus, il est connu que les parties extracellulaires des RCPG sont particulièrement flexibles et peuvent s'organiser de différentes manières en fonction du ligand rencontré. La modélisation dynamique offre l'opportunité d'apprécier le déroulement de ces réarrangements au cours de l'interaction et en fonction du ligand concerné. Le complexe MQ-1-V2R a été l'occasion d'utiliser cette stratégie *ab initio*. En retour, c'est aussi pour nous la possibilité de cibler au mieux les variants de la toxine les plus pertinents à explorer.

MQ-1 a été modélisée à partir de la structure cristallographique du variant Asn15Lys/Gly16Ala. V2R a été modélisé par homologie à partir de la structure de δ -OR, de la famille *Rhodopsine* des RCPG comme V2R, avec lequel il partage 33 % d'identité de séquence. La partie N-terminale n'est pas possible à modéliser de par son importante flexibilité. Aussi, le modèle présenté est tronqué des 35 premiers acides aminés et la séquence débute avec Leu36. Afin d'avoir un aperçu de la fréquence de contact entre les résidus du récepteur avec ceux de la toxine, jusqu'à 14800 trajectoires de dynamique de 20 micro-secondes ont été réalisées pour chaque modèle. Nous avons ainsi obtenu un pourcentage représentatif du temps que deux résidus passent à moins de 5,5 Å l'un de l'autre pour 300 à 400 paires de résidus et pour chacun des modèles. L'analyse qui suit est basée sur ces pourcentages. La modélisation *ab initio* du complexe MQ-1-V2R a généré quatre modèles différents, qui néanmoins peuvent être groupés par deux en fonction du positionnement de la toxine sur le récepteur. Il avait été démontré précédemment que la boucle 1 était en contact avec le récepteur, alors que les parties N- et C-terminales ne l'étaient pas (Ciolek *et al.* 2017). Les quatre modèles étaient spontanément conformes à cette orientation de MQ-1 sur V2R.

Pour décrire les modèles, nous nous intéresserons d'abord à l'orientation globale de MQ-1 par rapport à V2R puis nous détaillerons les positions précédemment définies comme importantes pour la liaison au récepteur.

1) Modèles 1 et 2

Dans les modèles numérotés 1 et 2, MQ-1 s'oriente de telle façon que l'hélice α en C-terminale de la toxine est à proximité des sommets des TM5 et 6, et à l'opposé, la Cys14

de la boucle 1 de MQ-1 est située en face de la partie N-terminale du récepteur (Figure 45). La position 17 est dans les deux modèles le résidu qui entre le plus profondément à l'intérieur du récepteur. Les deux modèles diffèrent principalement au niveau de l'orientation des chaînes latérales des résidus, notamment ceux que nous avons étudiés précédemment.

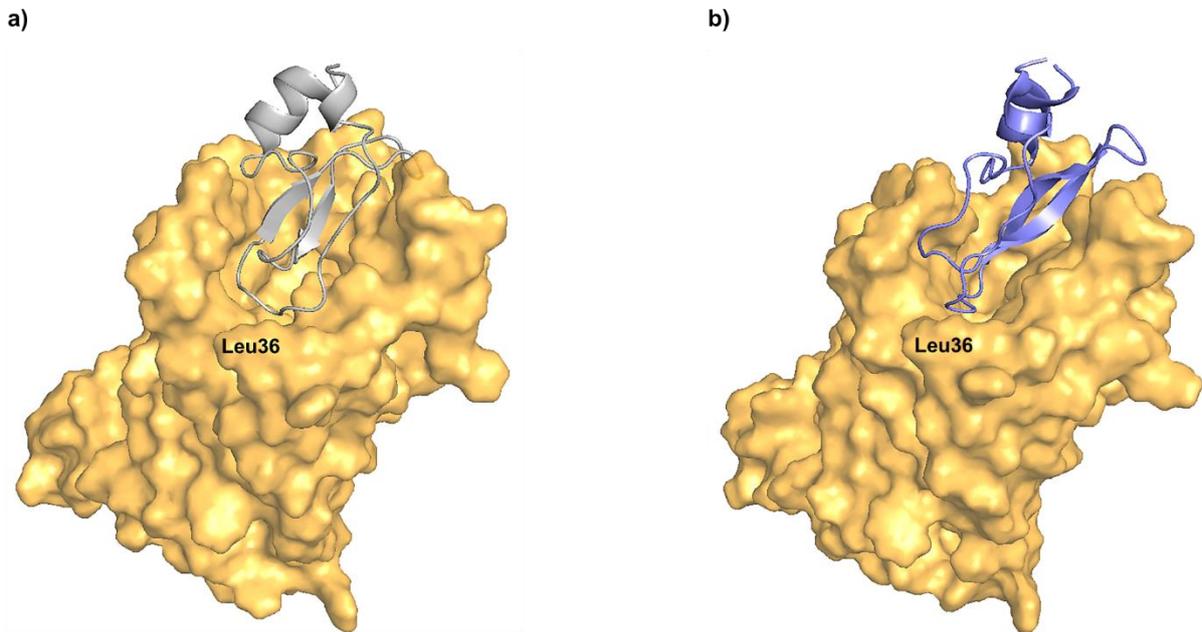


Figure 45 – Modèles 1 et 2 du complexe MQ-1-V2R. Le récepteur (orange) est représenté en surface et la position du premier résidu modélisé Leu36 est indiquée. **a)** Modèle 1. MQ-1 (gris) est représentée en cartoon. **b)** Modèle 2. MQ-1 (bleu) est représentée en cartoon.

Concernant les résidus de la boucle 1 dans le modèle 1, les deux Phe sont logées dans un environnement hydrophobe. Phe17 est tournée en direction de TM7 du récepteur alors que Phe18 est beaucoup plus exposée et coincée entre les Pro298 et 301 (ECL3) (Figure 46-a). Dans le modèle 2, les chaînes latérales des deux Phe pointent en direction du centre du récepteur et elles sont entourées par de nombreux résidus hydrophobes répartis entre TM2, 5, 6 et 7 ainsi que ECL2 et 3 (Figure 46-b).

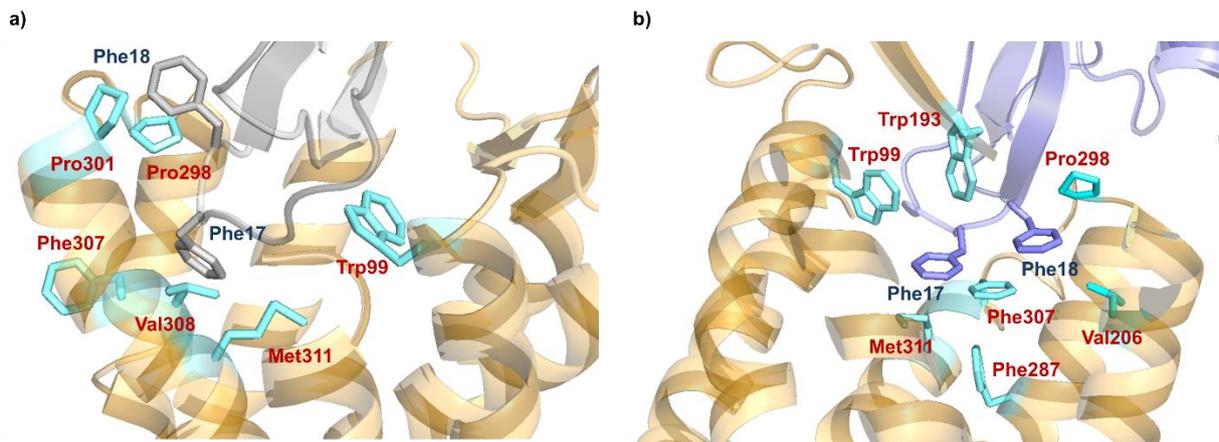


Figure 46 – Cœur hydrophobe autour de la boucle 1 de MQ-1 selon les modèles 1 et 2. Représentation en cartoon de V2R (orange). Représentation en stick des chaînes latérales des résidus hydrophobes (bleu clair) à proximité des Phe17 et Phe18 de MQ-1. **a)** Modèle 1. MQ-1 en gris. **b)** Modèle 2. MQ-1 en bleu.

Pour ce qui est des résidus de MQ-1 chargés positivement, dans le modèle 1, trois d'entre eux sont situés à proximité de résidus portant une charge négative : Glu184 (ECL2) pour Lys10, Glu198 (ECL2) pour Lys29 et Glu299 (ECL3) pour Arg44, ce qui est favorable à l'établissement d'interactions ioniques entre la toxine et le récepteur (Figure 47-a). Les Lys26, 39 et 50 sont exposées au solvant. Dans le modèle 2, à nouveau trois résidus chargés positivement sont à proximité de résidus du récepteur chargé négativement : Lys26 vers Glu184 (ECL2), Lys39 à côté de Glu299 (ECL3) et Arg44 qui est entourée par Asp297 et Glu299 (ECL3). Les Lys10, 29 et 50 sont totalement exposées au solvant (Figure 47-b). Enfin, quel que soit le modèle, l'Asn15 se trouve dans le proche environnement de Lys100, située à la jonction de TM2 et ECL1 de V2R, ce qui pourrait expliquer l'effet de la mutation Asn15Lys sur l'affinité de la toxine pour le récepteur, par répulsion des charges.

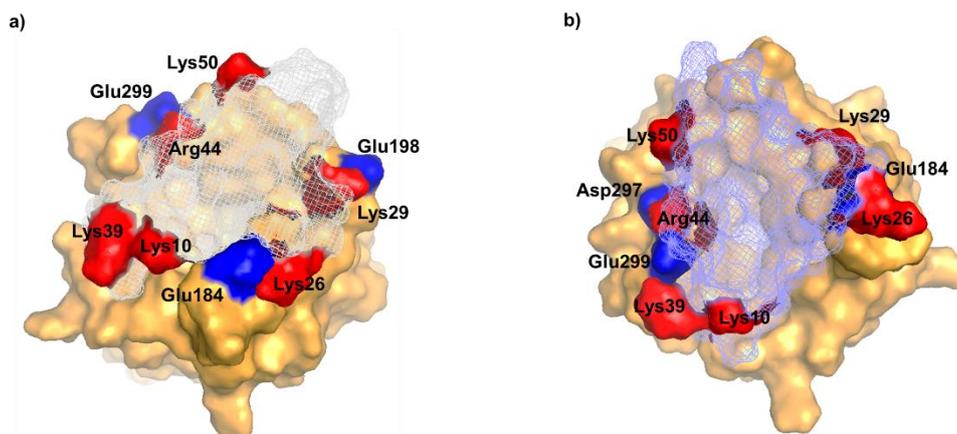


Figure 47 – Complémentarité ionique entre MQ-1 et V2R selon les modèles 1 et 2. Représentation en surface de V2R (orange). Représentation en surface des résidus de V2R portant une charge négative (bleu) à proximité de MQ-1 et des résidus de MQ-1 portant une charge positive (rouge). **a)** Modèle 1. MQ-1 (gris) est représentée en mesh. **b)** Modèle 2. MQ-1 (bleu) est représentée en mesh.

2) Modèles 3 et 4

Dans les modèles numérotés 3 et 4, MQ-1 adopte une orientation générale sur V2R à l'opposé de celle des modèles 1 et 2 : la Cys14 qui est située en vis-à-vis du sommet des TM5 et 6, et l'hélice α en C-terminale de la toxine se trouve au-dessus de TM2 du récepteur et à proximité d'une partie de ECL2. De plus, le modèle 4 se distingue des trois autres par la localisation très en surface de MQ-1 sur V2R (Figure 48).

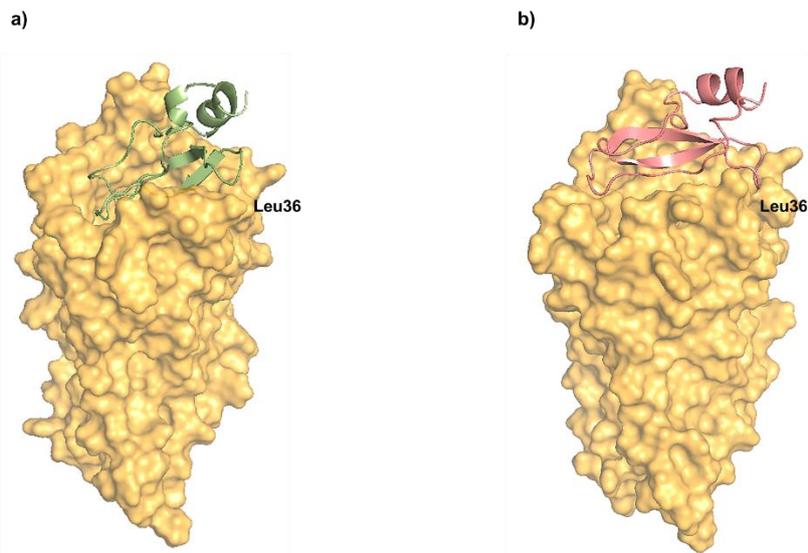


Figure 48 – Modèles 3 et 4 du complexe MQ-1-V2R. Le récepteur (orange) est représenté en surface, la position du premier résidu modélisé Leu36 est indiquée. **a)** Modèle 3. MQ-1 (vert) est représentée en cartoon. **b)** Modèle 4. MQ-1 (rouge) est représentée en cartoon.

Dans le modèle 3, les chaînes latérales des Phe17 et 18 sont diamétralement opposées. D'une part, Phe17 est orientée vers le fond du récepteur et se trouve au cœur d'un réseau hydrophobe formé par sept acides aminés répartis entre TM2, 3 et 4 et ECL2, et qui implique le pont disulfure conservé entre TM3 et ECL2. D'autre part, Phe18 est entourée de trois résidus hydrophobes situés sur ECL2 uniquement (Figure 49-a). Dans le modèle 4, Phe17 est loin du haut des TM, et se trouve dans une poche hydrophobe délimitée par six résidus de ECL2 alors que Phe18 est exposée au solvant, loin du récepteur (Figure 49-b).

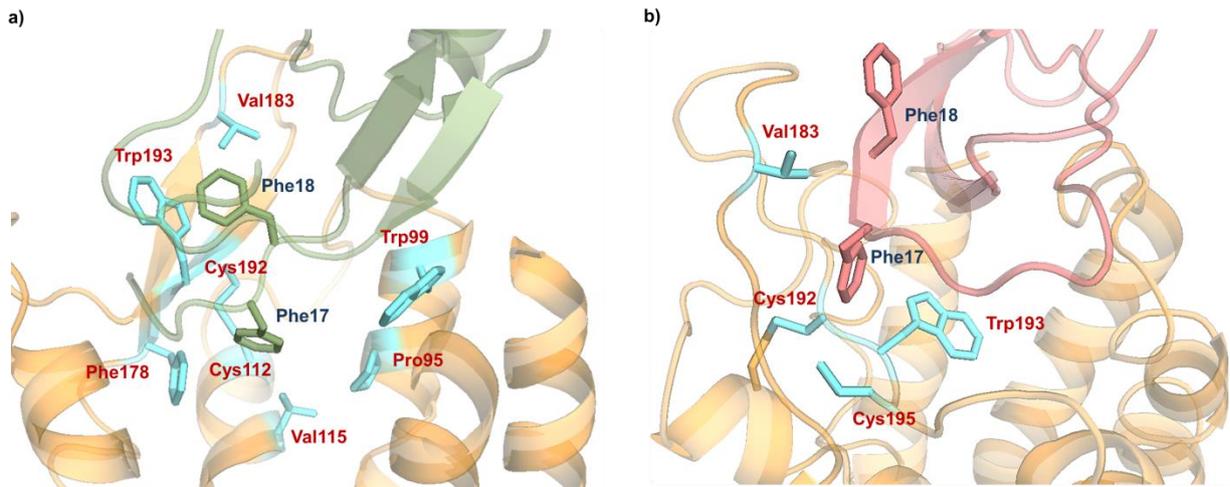


Figure 49 – Cœur hydrophobe autour de la boucle 1 de MQ-1 selon les modèles 3 et 4. Représentation en cartoon de V2R (orange). Représentation en stick des chaînes latérales des résidus hydrophobes (bleu clair) à proximité des Phe17 et Phe18 de MQ-1. **a)** Modèle 3. MQ-1 en vert. **b)** Modèle 4. MQ-1 en rouge.

Les résidus chargés positivement de MQ-1 sont situés dans des environnements similaires dans les deux modèles. Lys10 se trouve en face des deux résidus Asp297 et Glu299 (ECL3), et Lys26 est à proximité de Glu303 (ECL3) ce qui est tout à fait en faveur d'une liaison ionique entre les deux partenaires (Figure 50). En revanche, les Lys29, 39 et 50 ainsi que Arg44 sont toutes situées loin de V2R dans ces deux modèles. Dans le modèle 3, la chaîne latérale de Arg44 est tournée vers l'intérieur de la toxine, et dans le modèle 4, elle est au contraire très exposée au solvant (Figure 50-b). Pour finir, les résidus de V2R proches de Asn15 sont compatibles avec l'impossibilité d'une charge positive à cet emplacement. Dans le modèle 3, elle est entourée de Lys116 (TM3) et des deux Arg202 et 203 (TM5) et dans le modèle 4, elle est très proche de Arg202 (TM5).

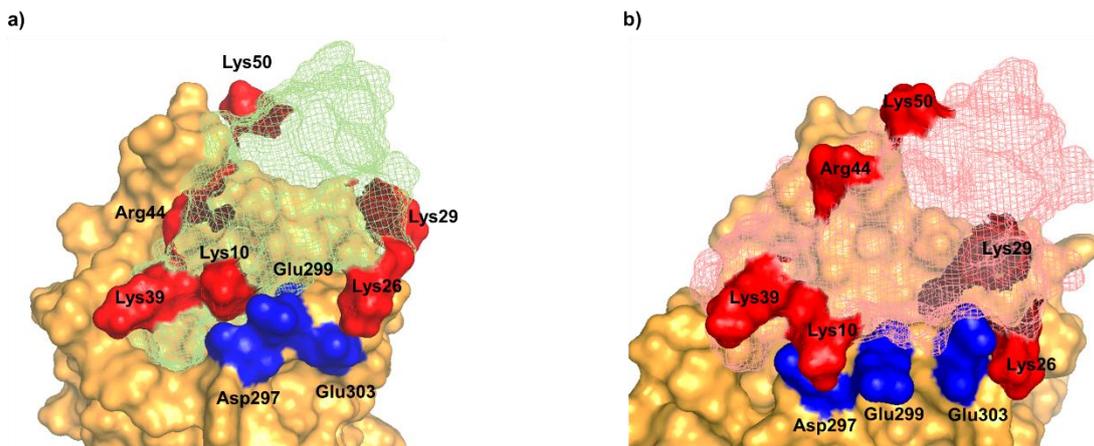


Figure 50 – Complémentarité ionique entre MQ-1 et V2R selon les modèles 3 et 4. Représentation en surface de V2R (orange). Représentation en surface des résidus de V2R portant une charge négative (bleu) à proximité de MQ-1 et des résidus de MQ-1 portant une charge positive (rouge). **a)** Modèle 3. MQ-1 (vert) est représentée en mesh. **b)** Modèle 4. MQ-1 (rouge) est représentée en mesh.

C. Comparaison entre données expérimentales et modélisation

Les alignements de séquences et tests de liaison avaient mis en évidence la nécessité de la présence d'une Phe en position 17 de la toxine afin qu'elle se lie à V2R. Tous les modèles sont compatibles avec cette hypothèse et, à l'exception du modèle 4, placent ce résidu dans un réseau hydrophobe profond et faisant intervenir plusieurs TM du récepteur. La position 18 semble participer également à cet environnement hydrophobe, toujours excepté dans le modèle 4, mais avec un nombre moins important d'interactions, ce qui est cohérent avec la perte d'affinité moins importante du variant Phe18Ala. Il peut être supposé que la position 18 aide Phe17 à se maintenir au centre du récepteur. Si le site orthostérique de V2R n'a pas encore été précisément défini, celui de V1aR a été modélisé à environ 15 Å de la surface extracellulaire du récepteur dans un espace délimité par les TM et certains résidus impliqués dans la liaison de l'AVP sur V1aR et V1bR ont été identifiés (Mouillac *et al.* 1995; Rodrigo *et al.* 2007). Par homologie de séquence, il est accepté que tous les récepteurs de la famille AVP/ocytocine adoptent un site orthostérique similaire. Les modèles 1, 2 et 3 positionnent la boucle 1 de MQ-1 au niveau de ce site orthostérique supposé, expliquant le caractère compétitif de la toxine. Le modèle 4, en revanche, montre MQ-1 peu enfouie dans le récepteur et sa boucle 1 reste très en surface, ce qui est peu compatible avec l'importante perte d'affinité observée avec le variant Phe17Ala. Les modèles 1 et 2 sont d'autant plus en adéquation avec l'hypothèse d'une proximité de la boucle 1 de MQ-1 avec le site orthostérique du récepteur qu'ils montrent un pourcentage de temps de contact entre Lys100 et Asn15 particulièrement élevé (respectivement, 90 et 68 %). Or, Lys100 correspond à une position occupée par Asp^{2.35} dans la séquence des récepteurs vasopressine de type 1a et 1b, qui est reconnue comme participant au site orthostérique (Rodrigo *et al.* 2007).

L'importante complémentarité ionique entre ligand et récepteur a déjà été décrite pour plusieurs RCPG sensibles aux peptides (Krumm & Grisshammer 2015). MQ-1 dispose de dix résidus chargés positivement et un seul chargé négativement. Cinq d'entre eux étaient supposés loin du récepteur car ils se situent dans les parties N- et C-terminales de la toxine (Arg1, Glu49, Lys50, Arg52 et Arg53). Les variants correspondants n'avaient pas été générés et les analyses de trajectoires de dynamique confirmaient cette hypothèse. À l'exception de la position 39, toutes les autres charges positives ont été mutées individuellement en Ala sans que cela n'affecte l'affinité de MQ-1 pour le récepteur. En supposant une importante complémentarité ionique, une seule mutation n'est peut-être pas suffisante pour altérer la liaison du complexe et donc les résultats expérimentaux ne sont pas contradictoires avec cette hypothèse. De façon surprenante, l'analyse des modèles ne prédit jamais plus de trois résidus positifs de MQ-1 impliqués dans des interactions ioniques. Expérimentalement, seule la charge des positions 10, 26 et 44 a été inversée ce qui a démontré l'effet délétère de charges négatives à ces emplacements. Aucun des modèles n'est totalement en accord avec ce résultat. Le modèle 1 prédit une faible interaction entre Lys26 et Glu184 (ECL2), le modèle 2 exclut Lys10 d'une possible

interaction ionique en situant sa chaîne latérale loin des boucles extracellulaires du récepteur et il en va de même pour les modèles 3 et 4 avec Arg44. Cependant, les modèles 1 et 2 ne peuvent pas pour autant être rejetés. D'après l'analyse des trajectoires de dynamique du modèle 1, Glu184 (ECL2) est à proximité de Lys10 de MQ-1 dans 84 % des cas et proche de Lys26 dans seulement 15 % des cas. Expérimentalement, la perte d'affinité liée à l'inversion de la charge en position 26 était faiblement significative ($p = 0,027$) comparée à l'effet de l'inversion de charge aux positions 10 et 44 ($p < 0,001$) (Tableau 11). En supposant que Glu184 interagit préférentiellement avec Lys10, il peut être supposé que la présence d'une charge négative en 26 provoque une gêne ionique. De plus, sur la Figure 47-a, Glu184 semble plutôt être en proche contact avec Lys26 que Lys10, ce qui illustre parfaitement à la fois la grande flexibilité de ECL2, la plus longue boucle extracellulaire de V2R (22 résidus), mais aussi l'intérêt d'une étude dynamique. Concernant le modèle 2, Lys10 se positionne en face de la partie N-terminale de V2R, la région non modélisée du récepteur. Or, cette partie très flexible possède trois charges négatives (Glu26, Asp30 et Asp33) susceptibles d'interagir avec Lys10 et de corroborer la perte d'affinité du variant Lys10Glu.

L'analyse dynamique prédit Phe33 comme un point d'interaction important dans les quatre modèles (vers ECL1 et 2 dans les modèles 1 et 2, vers ECL3 dans le modèle 3 et vers l'intérieur du récepteur dans le modèle 4). Phe33 est une position extraordinairement conservée et elle est décrite dans la littérature comme l'acide aminé pivot du réseau hydrophobe maintenant la structure tertiaire des peptides Kunitz (Hanson *et al.* 2003). Sa position prédite par modélisation est donc très surprenante. La mauvaise orientation de quelques chaînes latérales avait été soulignée dans les travaux de mise au point de la stratégie de modélisation utilisée ici (Delort *et al.* 2017). Nous avons synthétisé le variant Phe33Ala mais le repliement s'est avéré impossible, en accord avec son rôle structural décrit. Contraindre l'orientation de la chaîne latérale de ce résidu dans les modèles pourrait amener à modifier le positionnement global de MQ-1 par rapport à V2R. Cet exemple illustre l'importance de multiplier les techniques d'étude des relations structure-activité.

IV. Développement thérapeutique de la mambaquarétine-1

Un des objectifs de l'étude de la mambaquarétine-1 (MQ-1) est de développer un médicament efficace pour lutter contre la progression de la polykystose rénale afin d'apporter aux patients une meilleure qualité de vie.

A. Place du tolvaptan dans le traitement des PKRAD en France

À l'heure actuelle, il n'existe qu'un seul médicament spécifique pour traiter la polykystose rénale autosomique dominante (PKRAD) : le tolvaptan, une molécule chimique qui possède le même mécanisme d'action que MQ-1. Le tolvaptan, commercialisé sous le nom de Jinarc® (Otsuka), est disponible en France depuis le milieu de juillet 2016, suite à l'avis favorable publié par la commission de transparence de la haute autorité de santé (HAS). Son usage est restreint à des patients atteints de PKRAD répondant aux critères suivants : un débit de filtration glomérulaire inférieur à 30 ml/min/1,73 m², accompagné d'une néphromégalie importante associée à un risque de perte de fonction rénale, ainsi que des signes d'évolution rapide de la maladie (Haute Autorité de Santé 2016). Il est soumis à prescription initiale hospitalière et peut être prescrit ou renouvelé uniquement par un spécialiste en néphrologie. Une surveillance particulière est portée au risque de survenue d'une atteinte hépatique. Un dosage sanguin des transaminases hépatiques est mis en place à l'initiation du traitement puis un suivi régulier, d'abord mensuel puis tous les trois mois, doit être observé.

Le service médical rendu du Jinarc® est modéré du fait qu'il ne fait que ralentir la progression de la maladie, que la sécurité d'emploi sur le long terme n'est pas encore connue et qu'il n'est prescriptible que pour une proportion restreinte de la population de malades, estimée à 20 % (Haute Autorité de Santé 2016). Aussi, son taux de remboursement est fixé à 30 %. L'HAS considère qu'il n'apporte qu'une amélioration du service médical rendu mineure, bien qu'il soit le premier médicament spécifique dans son indication, mais encore une fois son importance dans l'arsenal thérapeutique est limitée par le faible nombre de patients pouvant en bénéficier. De plus, le Jinarc® est inscrit sur la liste des médicaments d'exception, qui regroupe les spécialités particulièrement coûteuses et à indication précise (comme ici, la prescription initiale hospitalière). En effet, le prix actuel est fixé à 1228,48 euros pour 28 jours de traitement, soit 15970 euros par an. Par ailleurs, afin d'obtenir un maximum de données sur la tolérance du Jinarc®, il fait l'objet d'un plan de gestion des risques au niveau européen, ce qui implique que tout néphrologue souhaitant le prescrire doit au préalable suivre une formation, assurée par les laboratoires Otsuka, lui permettant d'être certifié et autorisé à la prescription de ce médicament. Avec 80 % des patients ne pouvant bénéficier d'un traitement spécifique, la PKRAD reste donc une maladie majoritairement orpheline.

B. Point de vue industriel autour du développement thérapeutique de la mambaquarétine-1

MQ-1 a été brevetée en 2012 et son brevet européen d'application a été publié en 2014 sous le numéro 2 708 235 A1. Un brevet protège une invention pendant 20 ans. Or,

le développement thérapeutique d'une molécule jusqu'à sa mise sur le marché peut durer 10 à 20 ans. La recherche de partenaires industriels pour le développement de MQ-1 a donc été initiée dès 2013. Pour des raisons de confidentialité, ces sociétés ne seront pas citées.

Deux sociétés se sont montrées intéressées par le développement thérapeutique de MQ-1 contre la PKRAD. La première était spécialisée en développement thérapeutique mais ne disposait pas de fonds propres. L'autre était spécialisée dans le conditionnement de médicaments injectables. Elle n'avait jamais fait de développement thérapeutique mais souhaitait initier cette activité. C'est cette deuxième société qui a été retenue pour établir une collaboration car elle disposait d'une bonne assise financière et que les négociations se déroulaient directement avec le président-directeur général. Lorsque j'ai débuté ma thèse, les négociations avec cette société étaient en cours et j'ai eu l'opportunité d'assister à plusieurs réunions.

La première préoccupation de cette entreprise a porté sur le coût de production de la toxine. Leur étude pharmaco-économique se basait sur une dose journalière individuelle de 40 mg de MQ-1, ce qui correspondait à une production annuelle supérieure à une tonne, incompatible avec la synthèse chimique. La production par expression recombinante paraissait alors plus adaptée. Le premier objectif de rendement a été fixé à un minimum de 300 mg de toxine par litre de culture. En faisant appel à une de leurs filiales spécialisée dans la production de protéines recombinantes, il s'est avéré que MQ-1 ne s'exprimait correctement que dans *Escherichia coli* et sous forme de corps d'inclusion. Un taux de rendement proche de celui ciblé a pu être atteint après de longs mois de mise au point avec un processus de fabrication assez compliqué.

Le deuxième point soulevé par cette entreprise pharmaceutique a concerné le potentiel d'immunogénicité de MQ-1. En effet, la prise chronique d'un médicament peptidique est un facteur de risque de survenue d'une réponse immunogène de la part de l'hôte. Pour évaluer ce potentiel, nous avons mis en place deux techniques complémentaires qui seront présentées dans le chapitre suivant. Néanmoins, la société visait une déimmunisation complète. Il s'agit d'un procédé complexe qui peut prendre du temps sans garantie de succès. Face à cette difficulté, la société n'a pas souhaité continuer d'investir dans ce projet.

Depuis, des discussions avec d'autres partenaires industriels ont été initiées. Il apparaît que MQ-1 serait également un bon candidat thérapeutique dans le traitement de l'hyponatrémie¹¹ consécutive au syndrome de sécrétion inappropriée d'hormone antidiurétique (SIADH). Il s'agit d'un syndrome aux étiologies multiples (iatrogènes, cancéreuses, pulmonaires, *etc.*). La première prise en charge consiste à traiter l'origine du

¹¹ Les valeurs normales de natrémie sont comprises entre 135 et 145 mmol/l. L'hyponatrémie se définit donc par une valeur de natrémie inférieure à 135 mmol/l. En-dessous de 115 mmol/l, l'hyponatrémie est qualifiée de sévère.

syndrome mais un traitement plus spécifique de l'hyponatrémie hypoosmolaire euvolémique retrouvée dans ce syndrome peut être mis en place lorsque celle-ci devient chronique. Le premier traitement consiste en une restriction hydrique, avec des résultats très variables d'un individu à l'autre. Il existe un médicament aquarétique dans cette indication en France : la déméclocycline (Alkonatrem[®], Primius Lab), un antibiotique du groupe des tétracyclines qui empêche la production d'AMPc suite à l'activation de V2R. Dans cette même indication, le tolvaptan (Samsca[®], Otsuka) a obtenu une autorisation d'utilisation temporaire nominative en France suite à une rupture de stock de l'Alkonatrem[®] mais est utilisé couramment dans d'autres pays, dont le Royaume-Uni et les États-Unis, sous surveillance renforcée justifiée par son hépatotoxicité. Le développement thérapeutique de MQ-1 dans l'hyponatrémie présenterait l'avantage d'être moins long, les essais cliniques nécessitant seulement quelques semaines de traitement contre plusieurs années pour la PKRAD.

C. Études complémentaires de la mambaquarétine-1 pour son développement thérapeutique

1) Immunogénicité de MQ-1

Le pouvoir immunogène d'une protéine se définit par sa capacité à déclencher une réponse immunitaire de l'hôte contre elle. La solubilité, la dose et la prise répétée d'un médicament sont autant de facteurs de risque d'apparition d'une telle réponse, qui est donc potentialisée au cours d'un traitement chronique. Une réponse immunitaire dirigée contre un peptide, sous forme d'anticorps antimédicament (ADA), peut conduire à une perte d'efficacité de ce dernier, mais peut aussi engendrer l'apparition d'une réaction allergique aux conséquences beaucoup plus graves pour l'hôte. Le risque immunogène de MQ-1 a été une des principales préoccupations de la société pharmaceutique avec laquelle nous avons engagé une collaboration (partie IV.B. des Résultats et discussion).

Une première étude de l'immunogénicité de MQ-1 a été réalisée sur un modèle murin. Nous avons immunisé trois souches de souris congénitales mâles : BALB/c, C57BL/6 et CBA/J, par trois injections sous-cutanées de 10 µg de MQ-1 à quinze jours d'intervalle. Le sérum a été récupéré quinze jours après la dernière injection. Pour chaque souche, quatre souris étaient immunisées par MQ-1 seule et quatre souris étaient immunisées par un mélange 1:1 de MQ-1 et d'alum utilisé comme adjuvant. Ce dernier permettait d'augmenter la réponse immunitaire et est couramment utilisé pour la production d'anticorps. Les ADA étaient recherchés dans les sérums de souris par un test d'immuno-absorption enzymatique (ELISA).

Après optimisation des conditions du test ELISA, tous les sérums ont été testés individuellement à huit concentrations différentes dans le but d'établir le titre¹² d'anticorps. Tous les sérums des souris immunisées par MQ-1 associée à l'adjuvant ont généré un signal positif. Aucun des sérums provenant des souris BALB/c et CBA/J immunisées par la MQ-1 seule n'induisait un signal positif. En revanche, un seul sérum issu des souris C57BL/6 s'est avéré positif (Figure 51). Ce sérum était titré à 5120.

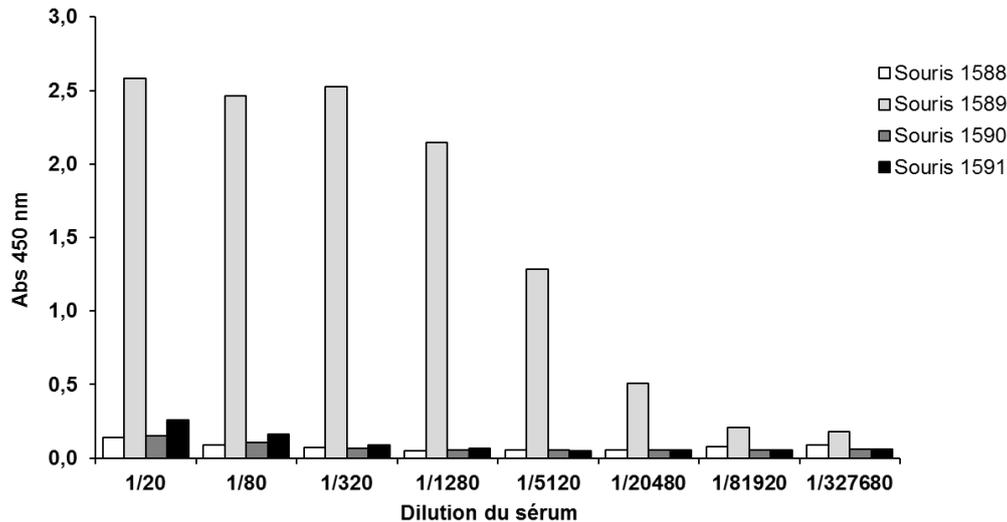


Figure 51 – Titrage des anticorps anti-MQ-1 dans le sérum des souris C57BL/6 immunisées sans adjuvant. Détection des ADA par test ELISA après trois injections de 10 µg de MQ-1 sans adjuvant. Puits tapissés par MQ-1. Chaque barre représente le sérum d'une seule souris à la dilution indiquée. L'absorbance inférieure à 0,5 est considérée comme non spécifique.

En parallèle, nos collègues de l'équipe du Docteur Bernard Maillère (Service d'Ingénierie Moléculaire des Protéines – SIMOPRO, CEA Saclay, Gif-sur-Yvette) ont évalué le potentiel immunogène de MQ-1 chez l'humain par quantification des lymphocytes T CD4 préexistants sensibles à la toxine par technique ELISPOT. Parmi les huit donneurs, dont la diversité des systèmes HLA était représentative de la population européenne, deux donneurs n'ont pas répondu, trois avaient une réponse forte comparable à celle induite par des molécules considérées immunogènes et les trois autres avaient une réponse intermédiaire (Figure 52). Une étude des peptides de MQ-1 les plus susceptibles d'être reconnus par le complexe majeur d'histocompatibilité humain a été réalisée. Quatre régions immunogènes ont été identifiées. Deux d'entre elles ne se trouvent pas à proximité du pharmacophore supposé et pourront donc être modifiées facilement. En revanche, une autre des régions est au niveau de la boucle 1, et la dernière englobe des résidus importants pour la structure de MQ-1. Des expériences sont en cours pour modifier les séquences concernées sans toucher à l'activité biologique.

¹² Le titrage des anticorps correspond au dosage des anticorps circulants. Le titre est déterminé classiquement par l'inverse de la dernière dilution de sérum donnant un signal positif.

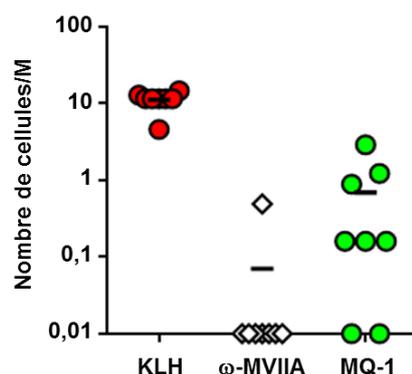


Figure 52 – Estimation du nombre de lymphocytes T CD4 préexistant spécifiques pour KLH, ω -MVIA et MQ-1 en nombre de cellules par million. Chaque point représente un donneur. Contrôles : KLH (keyhole limpet hemocyanin) est une protéine hautement immunogène utilisée comme adjuvant pour la production d'anticorps ; ω -MVIA est une conotoxine non immunogène, également appelée ziconotide, actuellement commercialisée sous le nom de Prialt® (Eisai) dans le traitement de la douleur sévère chronique.

Ces premiers résultats montrent que l'immunogénicité de MQ-1 est faible dans les modèles étudiés. Cependant, la souris n'est pas un modèle prédictif de la réponse immunitaire chez l'être humain et une réponse positive unique sur 12 individus issus de 3 souches différentes n'est pas suffisante pour tirer des conclusions. Le risque immunogène a été jugé trop important par notre partenaire industriel qui n'a pas souhaité attendre les résultats du plan de déimmunisation de MQ-1.

2) Voie d'administration

Si la voie intrapéritonéale (IP) permet une rapidité d'action, elle est mal tolérée par les patients. Dans l'optique d'un potentiel développement thérapeutique de MQ-1, nous avons testé la voie orale, beaucoup mieux tolérée, et d'autant plus dans le cadre d'un traitement chronique.

La biodisponibilité des peptides par voie orale est très mauvaise, voire nulle. En effet, l'estomac contient de nombreuses endopeptidases qui clivent les peptides avant leur absorption dans la circulation générale, les rendant ainsi inactifs. D'autre part, un efficace système d'efflux limite leur absorption au niveau de l'estomac. Enfin, certains peptides qui peuvent passer ces premières barrières sont pris en charge par les cytochromes lors du premier passage hépatique avant leur arrivée dans la circulation. À l'heure actuelle, la recherche de nouvelles formes galéniques qui permettraient la prise par voie orale de peptides ou protéines thérapeutiques est particulièrement active, principalement pour le cas des traitements chroniques. L'exemple le plus connu est celui de l'insuline utilisée dans le traitement du diabète de type 1.

Nous avons testé l'efficacité de MQ-1 par voie orale en administrant, à l'aide d'une sonde de gavage, la plus forte dose efficace par voie IP : 0,3 $\mu\text{mol/kg}$. Nous n'avons pas

observé d'effet aquarétique. En considérant que la biodisponibilité par voie IP est proche de 100 % et en comparant les résultats entre les deux voies d'administration, nous pouvons estimer la biodisponibilité par voie orale de MQ-1 inférieure à 1 %. S'il pourrait être scientifiquement intéressant de rechercher si une dose plus importante serait efficace, elle ne serait jamais acceptée dans le cadre d'un développement thérapeutique car le coût de production serait beaucoup trop élevé. Nous ne sommes donc pas allés plus loin sur cette question.

3) MQ-1, agoniste inverse de V2R

MQ-1 a été décrite comme un antagoniste compétitif de V2R, capable d'empêcher la liaison de l'AVP et l'activation consécutive du récepteur (Ciolek *et al.* 2017). Depuis quelques années, la flexibilité des RCPG est de plus en plus souvent décrite, remettant en cause la théorie très schématique d'un fonctionnement « on-off ». Ainsi, la possibilité d'une auto-activation en l'absence d'agoniste, responsable d'une activité constitutive, émerge, et avec elle la notion d'agoniste inverse. Un agoniste inverse se définit par sa capacité à inhiber l'activation constitutive d'un récepteur en l'absence d'agoniste.

Pour étudier l'éventuelle fonction agoniste inverse de MQ-1, nous avons utilisé des cellules exprimant suffisamment fortement V2R pour que la production basale d'AMPC soit quantifiable par nos tests. Nous avons observé une inhibition de la formation constitutive d'AMPC en présence de MQ-1 (Figure 53). Donc MQ-1 n'est pas seulement un antagoniste de V2R mais également un agoniste inverse.

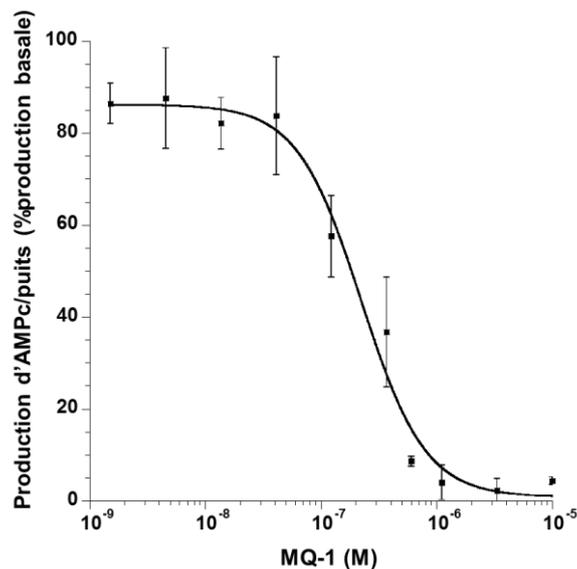


Figure 53 – Inhibition de la production basale d'AMPC par MQ-1 dans des cellules CHO-hV2R surexprimant le récepteur. Courbe moyenne de trois expériences indépendantes. Les barres d'erreur correspondent au SEM pour chaque concentration de MQ-1 testée.

Nous avons ici mis en évidence cet effet dans un système non physiologique avec un clone cellulaire surexprimant le récepteur. La démonstration de cette nouvelle

propriété de MQ-1 pourra être complétée sur un récepteur muté qui possède une forte activité constitutive. C'est par exemple le cas du mutant Asp136^{3.49}Ala déjà décrit dans l'introduction de cette thèse (Morin *et al.* 1998).

Ces dernières années, de nombreuses molécules utilisées dans l'arsenal pharmaceutique et considérées seulement comme antagonistes ont été requalifiées après la mise en évidence de leur propriété d'agoniste inverse, comme par exemple les antihistaminiques. Cependant, cette propriété est encore peu exploitée au niveau clinique car beaucoup de molécules ont été développées dans le but d'inhiber l'effet d'un agoniste. Cette propriété est pourtant particulièrement intéressante dans le cadre des pathologies dues à l'activation constitutive du récepteur suite à une mutation, comme c'est le cas dans le diabète insipide néphrogénique. Concernant V2R, peu de littérature existe sur ses agonistes inverses. Cette activité a été démontrée pour quelques vaptans (tolvaptan, mozavaptan, satavaptan), sans que l'intérêt thérapeutique potentiel de cette propriété n'ait été développé (Serradeil-Le Gal 2001; Takahashi *et al.* 2012). Dans le cadre du traitement de la PKRAD, l'utilisation d'un agoniste inverse permettrait de réduire la concentration d'AMPc dans les cellules principales, même en l'absence d'AVP circulante, mais également de renforcer l'état inactivé du récepteur, même en présence de son agoniste naturel.

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

I. Effet et devenir *in vivo* de la mambaquarétine-1 chez le rat

Mon objectif était de comprendre la pharmacodynamie de la mambaquarétine-1 (MQ-1) chez des rats sains Sprague-Dawley. En tant qu'antagoniste du récepteur de type 2 à la vasopressine (V2R), il était attendu un effet aquarétique *in vivo*, ce qui correspond à une augmentation du volume urinaire sans perte d'osmoles. Pour cela, j'ai réalisé une étude de la relation dose-activité de MQ-1 et observé l'effet d'une administration répétée sur cinq jours.

Si l'activité aquarétique *in vivo* de MQ-1 a déjà été décrite chez la souris (Ciolek *et al.* 2017), l'administration de MQ-1 chez le rat a permis de vérifier qu'il en était de même dans une autre espèce de rongeur. L'injection unique par voie intrapéritonéale (IP) d'une gamme de six doses différentes (de 0,001 à 0,3 $\mu\text{mol/kg}$) a démontré qu'il existait une relation entre la dose d'une part et l'augmentation du débit urinaire couplée à la diminution de l'osmolalité urinaire d'autre part. Cependant, le protocole expérimental présentait des écueils ne permettant pas de vérifier strictement l'absence de modification de l'excrétion urinaire. Cette expérience a démontré que les doses égales ou inférieures à 0,001 $\mu\text{mol/kg}$ de MQ-1 n'entraînaient plus d'effet *in vivo* mesurable après une injection unique, mettant en évidence une efficacité de MQ-1 à des doses faibles provoquant une augmentation modérée du volume urinaire (facteur 3 pour la plus faible dose efficace testée). Ce critère est particulièrement important pour le développement pharmaceutique de la toxine dans le cadre d'un traitement chronique aussi bien en ce qui concerne le coût de production de la molécule que pour l'acceptation du médicament par le patient.

Quelle que soit la dose utilisée, l'effet aquarétique atteint un maximum 2 heures après injection puis est suivi d'une rapide diminution avec un temps de demi-vie biologique variant de 1 à 4 heures en fonction de la dose. Pour la plus forte dose testée (0,3 $\mu\text{mol/kg}$), une seconde phase d'élimination plus lente peut être modélisée, estimant un temps de demi-vie biologique de 43 heures. Les modèles utilisés ne permettaient pas de discriminer la cinétique à une phase de celle à deux phases d'élimination à cause du faible nombre de relevés.

L'injection IP de 0,1 et 0,3 $\mu\text{mol/kg}$ de MQ-1 pourra être renouvelée en réalisant un plus grand nombre de relevés au-delà de six heures après l'injection. Pour ce faire, il conviendra de redéfinir le protocole expérimental afin d'éviter les biais liés à l'utilisation des cages métaboliques d'une part, et les fluctuations naturelles du débit urinaire liées au cycle métabolique du rat d'autre part. Par ailleurs, un suivi mieux contrôlé de la prise alimentaire et de boisson permettra d'établir un bilan entrées-sorties des osmoles primordial pour pouvoir conclure avec plus de certitudes sur l'effet aquarétique de MQ-1.

L'administration répétée de MQ-1 à 0,003 $\mu\text{mol/kg}$ pendant cinq jours a montré un effet aquarétique cumulatif se stabilisant au bout de trois jours et maintenant un débit urinaire augmenté d'un facteur 3. Cependant, les données obtenues le dernier jour de traitement montraient une importante hétérogénéité interindividuelle. L'administration répétée sur une plus longue période permettra de déterminer s'il existe bien un plateau.

Les données de pharmacocinétique sont indispensables pour le développement pharmaceutique d'une molécule. Elles évaluent la biodisponibilité, la biodistribution, le métabolisme, le temps de demi-vie plasmatique et la voie d'élimination d'une molécule. Aucune de ces informations n'est pour l'instant connue à propos de MQ-1. Pour réaliser un dosage plasmatique de la toxine, des rats cathétérisés ont reçu une injection unique de toxine à 0,3 $\mu\text{mol/kg}$ et des prélèvements sanguins ont été effectués aux temps 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 10, 12, 16, 24, 48, 72 et 96 h post-injection. Le dosage par spectrométrie de masse est en cours de mise au point par nos collègues de Liège (Docteur Loïc Quinton, Laboratoire de Spectrométrie de masse, Université de Liège, Belgique). Une MQ-1 marquée au carbone 13 et à l'azote 15, générée soit par synthèse chimique soit par expression recombinante, servira d'étalon interne. Il sera intéressant de comparer les concentrations circulantes de MQ-1 avec son activité pharmacologique.

L'effet cumulatif par injections répétées ainsi que la cinétique d'action biphasique à forte dose soulèvent des interrogations concernant la biodistribution de MQ-1. L'administration d'une toxine marquée serait un moyen de répondre à ces questions. À cette fin, le marquage de MQ-1 par des groupements chélateurs du zirconium 89 ou du technétium 99m a été réalisé. Grâce à cet outil, il sera possible d'observer, par des techniques d'imagerie de type tomographie par émission de positons ou tomographie par émission monophotonique, la distribution de MQ-1 dans les différents compartiments de l'organisme de souris vivantes et de savoir si elle s'accumule dans un tissu. Il permettra également de rechercher des traces de la toxine dans les urines et fèces afin de connaître sa voie d'élimination.

Nos collaborateurs de Montpellier (IGF, Montpellier) ont mené un essai thérapeutique sur des rats PCK, qui est un modèle orthologue de polykystose rénale autosomique dominante associée à des kystes hépatiques (Lager *et al.* 2001). Les rats ont reçu une injection IP quotidienne de MQ-1 à la dose 0,015 $\mu\text{mol/kg}$ pendant 140 jours. En parallèle, un groupe d'animaux a reçu une injection de solution saline. Les résultats sont actuellement en cours d'analyse. Ils permettront de déterminer si MQ-1 a un effet protecteur sur les reins dans ce modèle murin. L'analyse des échantillons biologiques et des organes apportera des réponses quant à une éventuelle toxicité de la toxine.

II. Initiation du développement thérapeutique de la mambaquarétine-1

Le caractère antagoniste et sélectif du récepteur de type 2 à la vasopressine (V2R) de la mambaquarétine-1 (MQ-1) en fait un excellent candidat thérapeutique pour le traitement de la polykystose rénale autosomique dominante (PKRAD), une maladie génétique héréditaire affectant une personne sur 1000 dans le monde. Son développement pharmaceutique est l'objectif final qui a orienté l'ensemble de ce travail de thèse. Les discussions avec divers interlocuteurs industriels ont mis en évidence les points critiques qui devront être résolus pour permettre à cette toxine d'atteindre le marché du médicament.

La problématique du coût de vente, qui met en balance le coût de fabrication et le prix payé par les organismes de santé, a été soulevée. Le coût de fabrication prend en compte la posologie, le prix de synthèse de la molécule et son conditionnement. Il est difficile d'évaluer ce coût actuellement. Néanmoins, nous pouvons estimer la posologie chez l'homme à partir de nos données. Nos expériences pharmacodynamiques ont montré qu'une faible dose, 0,003 $\mu\text{mol/kg}$, était efficace pour provoquer un effet aquarétique significatif chez le rat, ce qui correspondrait à 0,2 mg pour une personne de 60 kg par extrapolation allométrique¹³, loin des 40 mg estimés par nos partenaires industriels. Dans cette configuration, la production par expression recombinante n'est peut-être plus la plus pertinente par rapport à la synthèse chimique, qui permet d'obtenir des lots conformes aux bonnes pratiques de fabrication beaucoup moins chers et plus rapidement que par expression recombinante.

Un deuxième point sensible concerne l'immunogénicité de MQ-1. Une molécule destinée à un traitement chronique doit être la moins immunogène possible. Les premières expériences menées sur lymphocytes T4 de donneurs humains et sur sérums de souris préalablement immunisées ont montré une faible réponse immunitaire. Cependant, ces résultats sont peu prédictifs. La stratégie adoptée est de déimmuniser MQ-1 par ingénierie en modifiant les séquences susceptibles d'être impliquées dans la reconnaissance par le système immunitaire de l'hôte, déterminées d'après une analyse bioinformatique. Des algorithmes ont générés des centaines de séquences déimmunisées qui seront produites par expression recombinante (*E. coli* ou à la surface de levures) pour vérifier leur activité pharmacologique.

¹³ L'extrapolation allométrique est une méthode de conversion des doses entre deux espèces animales en se basant sur la différence de métabolisme. Ce calcul est une estimation et doit être corrigé en fonction des particularités pharmacocinétiques de la molécule considérée. Le facteur de conversion du rat vers l'humain est 1/7^{ème}.

Enfin, la question de la voie d'administration devra être approfondie. Actuellement, il existe un médicament dans l'indication du traitement de la PKRAD qui partage le mécanisme d'action de MQ-1 : le tolvaptan (Jinarc®, Otsuka). Il s'agit d'une petite molécule chimique qui s'administre par voie orale sous forme de comprimé. Par sa nature peptidique, MQ-1 ne peut pas être prise par voie orale car elle est dégradée avant d'atteindre la circulation générale. Il conviendra donc de trouver la meilleure forme injectable qui sera bien tolérée par le patient et qui permettra d'espacer les prises, par exemple avec une injection par semaine. Plusieurs stratégies sont envisagées et en cours d'expérimentation : le greffage d'un groupement polyéthylène glycol pour diminuer la filtration glomérulaire, l'adsorption sur l'albumine pour augmenter le temps de demi-vie plasmatique et l'ajout d'un acide gras pour permettre l'accumulation de la toxine dans un tissu adipeux et son relargage progressif dans la circulation. À long terme, le développement d'une forme galénique compatible avec la voie orale serait idéal.

Récemment, nous avons trouvé un variant de MQ-1, avec une meilleure affinité, qui sera breveté prochainement après optimisation de son immunogénicité. Nous sommes en discussion avec deux sociétés pharmaceutiques. D'une part, une industrie biotechnologique qui souhaite débiter une activité de développement thérapeutique de toxines, d'autre part, une petite industrie pharmaceutique, spécialisée en néphrologie et maladies rares, qui s'intéresse à MQ-1 pour le traitement de l'hyponatrémie consécutive au syndrome de sécrétion inappropriée d'hormone antidiurétique (SIADH). L'initiation du développement pharmaceutique de MQ-1 dans un contexte de SIADH sera plus rapide à mettre en place et la preuve de concept pourra être réalisée sur un modèle murin d'hyponatrémie.

III. Découverte d'un groupe de toxines Kunitz antagonistes du récepteur de type 2 à la vasopressine

Le criblage sur V2R du venin des quatre mambas (*Dendroaspis angusticeps*, *polylepis*, *jamesoni* et *viridis*) a révélé l'existence d'un ensemble de neuf toxines homologues, nommées mambaquarétines (MQ) à structure Kunitz. Toutes possèdent une activité antagoniste sur V2R et se lient avec des affinités variant de 3 à 45 nM. Une étude phylogénétique de ce groupe de toxines avec d'autres peptides Kunitz issus de venins de serpents a conduit à l'élaboration d'un arbre robuste qui désigne les mambaquarétines comme appartenant à une même branche. L'exploration de cet arbre a permis de mettre en évidence l'activité antagoniste sur VR2 de deux toxines de cobra, P19859 et Q5ZPJ7, aux affinités respectives de 7 et 112 nM. C'est donc une nouvelle famille réunissant onze membres porteurs d'une activité originale encore jamais décrite pour le repliement Kunitz qui a été mise à jour. Sept d'entre elles ont été administrées par voie IP à des rats. Si les MQ-2 à 5 ont un effet aquarétique comparable à celui de MQ-1, les toxines MQ-6, MQ-9

et P19859 se sont avérées beaucoup moins efficaces et dans des proportions non corrélées à leur capacité à inhiber la production d'AMPC *in vitro*. Les MQ-7/MQ-8, non séparables, et Q5ZPJ7 n'ont pas pu être injectées par manque de produit, ces trois toxines s'étant révélées particulièrement difficiles à replier.

Une première perspective sera donc d'optimiser la synthèse et le repliement de ces toxines afin de disposer de suffisamment de produit pour pouvoir mener à bien les expériences de caractérisation pharmacologique. Par ailleurs, les trois toxines dont l'efficacité *in vitro* et *in vivo* ne s'accordent pas soulèvent des questions concernant leur mode d'action. Les variations dans leurs séquences pourraient être à l'origine d'une prise en charge différente par l'organisme. Les outils qui vont être conçus pour le dosage de MQ-1 pourront être appliqués aux autres mambaquarétines pour apporter des réponses. Enfin, seul l'effet sur la voie de signalisation de l'AMPC a été testé chez les nouvelles toxines affines pour V2R. Leur activité sur les autres voies de signalisation β -arrestine et phosphorylation des ERK devra être vérifiée pour savoir si elles sont des antagonistes totaux comme MQ-1 ou des antagonistes biaisés.

IV. Relations structure-activité de la mambaquarétine-1 sur le récepteur de type 2 à la vasopressine

Déterminer les relations structure-activité entre une molécule et sa cible est une étape essentielle dans le développement d'un candidat pharmaceutique. La connaissance des interactions mises en jeu permet de modifier par ingénierie cette molécule dans l'optique d'améliorer certaines de ces caractéristiques et de synthétiser des dérivés aux propriétés similaires ou inverses. Notre étude structure-fonction de MQ-1 sur V2R est basée sur la combinaison de trois approches complémentaires : l'exploration de la diversité structurale naturelle, l'étude de l'affinité de mono-variants synthétiques et la modélisation *ab initio* du complexe MQ-1-V2R.

Il avait déjà été établi que la boucle 1 de MQ-1 était en contact avec V2R mais pas sa partie N-terminale (Ciolek *et al.* 2017). Il en avait été déduit qu'elle utilisait la même stratégie de liaison que les protéines Kunitz inhibitrices de protéases à sérine, par opposition aux Kunitz bloqueurs de canaux potassiques qui interagissent avec leur cible par leur extrémité N-terminale. Nos travaux ont permis de faire ressortir un certain nombre de caractéristiques nécessaires pour qu'une toxine se fixe sur V2R. Au niveau de la boucle 1, la position 15 ne peut pas être occupée par un résidu chargé positivement, la position 17 doit être une Phe et la position 18 doit être un résidu hydrophobe. La position 16 est en revanche particulièrement permissive, autant sur le volume que sur le niveau d'hydrophobicité du résidu qui l'occupe (Gly, Phe). Concernant les résidus chargés positivement, ceux qui se trouvent dans les deux extrémités terminales n'interagissent pas

avec le récepteur. Les positions 10, 26 et 44 ne sont pas nécessairement chargées positivement mais une charge négative à ces emplacements est délétère pour la liaison à V2R. Les quatre modèles générés du complexe MQ-1-V2R sont en accord sur l'importance de la boucle 1 pour la liaison. Excepté pour l'un des modèles, elle se situerait assez profondément entre les TM du récepteur, à proximité de l'emplacement supposé du site orthostérique de V2R. En revanche, il subsiste une incertitude sur l'orientation générale de la toxine dont la boucle 1 peut être tournée soit vers le TM1 de V2R dans deux modèles, soit à l'opposé vers les TM5 et 6 dans les deux autres. Une analyse de proximité des paires de résidus toxine-récepteur pour chaque modèle ne permet pas de valider ou d'exclure définitivement l'un d'entre eux. Cependant, cette approche est un outil extrêmement informatif pour définir les mutants les plus pertinents à générer pour obtenir le pharmacophore complet de MQ-1 sur V2R.

Afin de valider totalement une interaction supposée, il conviendra de produire des mutants correspondants du récepteur et de réaliser des cycles de double-mutants. Les modèles 1 et 2 se différencient principalement par l'interaction ionique entre Lys29 de MQ-1 et Glu198 de V2R qui est présente uniquement dans le modèle 1 alors que ces deux mêmes résidus sont prédits comme ne faisant pas d'interaction dans le modèle 2. L'inversion de charge de chacun de ces résidus permettra de tester les mutants correspondants séparément puis ensemble pour déterminer s'il existe réellement une interaction.

La connaissance des relations structure-activité de MQ-1 permettra d'envisager l'ingénierie moléculaire de la toxine sans altérer son activité, et ce dans deux optiques : i) mettre au point un marquage fluorescent ou radioactif de MQ-1 afin d'en faire un outil de recherche pertinent et d'approfondir nos connaissances sur son comportement *in vivo* (biodistribution, voie d'élimination), ii) modifier ses caractéristiques pharmacocinétiques pour modifier sa voie de dégradation ou d'élimination, augmenter son temps de résidence, ou encore la déimmuniser.

Nos collaborateurs de Montpellier travaillent depuis plusieurs années sur la cristallisation de V2R. L'une des difficultés principales réside dans l'importante flexibilité du récepteur. L'une des solutions envisagées est de cristalliser V2R en complexe avec MQ-1 pour le stabiliser. La connaissance des interactions fortes entre les deux partenaires permettra de définir le complexe le plus stable et donc le plus favorable à la résolution de la structure de V2R lié à MQ-1.

V. Publications à venir

Le projet autour de la mambaquarétine-1 (MQ-1) est et sera valorisé par trois publications. La première publication, « Green mamba peptide targets type-2 vasopressin receptor against polycystic kidney disease », a été publiée dans le journal *Proceedings of the National Academy of Sciences* en juin 2017 (Ciolek *et al.* 2017). Elle relate la découverte de MQ-1 suite au criblage du venin du mamba vert, sa caractérisation pharmacologique sur le récepteur de type 2 à la vasopressine (V2R), la résolution de sa structure cristallographique et son efficacité à ralentir la formation des kystes dans un modèle murin hétérologue de polykystose rénale (Annexe).

Une deuxième publication, intitulée provisoirement « Deciphering the structure-activity relationship of a novel Kunitz peptide family on vasopressin type 2 receptor », dont je serai premier auteur, présentera la découverte de la première famille de toxines Kunitz actives sur V2R, grâce au criblage des autres venins de mambas ainsi que l'exploration des toxines homologues issues des bases de données. La caractérisation pharmacologique *in vitro* et *in vivo* de ces toxines sera décrite. L'ensemble des travaux de modélisation du complexe MQ-1-V2R sera détaillé et confronté aux résultats expérimentaux obtenus à partir des variants naturels et synthétiques de MQ-1. Les dernières expériences permettant de valider définitivement l'un des modèles sont en cours d'acquisition et nous souhaitons soumettre ce travail dans les quelques mois à venir au journal *Nature Chemical Biology*.

Une troisième publication portant sur la pharmacocinétique et la pharmacodynamie de MQ-1 est prévue pour le début de l'année 2018, à laquelle je participerai en tant que premier auteur. Toutes nos expériences *in vivo* étant réalisées chez le rat, nous caractériserons l'affinité et l'activité pharmacologique de MQ-1 sur le V2R du rat. Les résultats de pharmacodynamie de MQ-1 issus des travaux de cette thèse seront présentés. L'expérience d'injections quotidiennes d'une faible dose de MQ-1 sera réitérée et optimisée afin de consolider les résultats déjà acquis et de connaître les effets de la toxine suite à une administration répétée. Nous avons réalisé des prélèvements sanguins chez le rat suite à une injection intrapéritonéale de MQ-1 à 0,3 $\mu\text{mol/kg}$. Grâce à la mise au point d'une technique de dosage par spectrométrie de masse en cours de finalisation, nous serons en mesure de décrire la pharmacocinétique de la toxine. Enfin, les outils de marquage développés nous permettront de réaliser l'imagerie de la biodistribution de MQ-1 sur animaux vivants par technique de tomographie par émission de positons ou par émission monophotonique.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

I. Production des toxines et variants

A. Fractionnement des venins

Le fractionnement du venin consiste en une succession de chromatographies liquides afin de séparer les toxines et ainsi obtenir des fractions de plus en plus pures, jusqu'à ce que chaque fraction ne contienne qu'une seule toxine d'intérêt. Le même protocole a été appliqué à chacun des trois venins de mambas.

La première étape est une chromatographie en phase liquide sur colonne échangeuse d'ions. Un gramme de venin en solution dans un solvant A est injecté sur une colonne Akta 100 purifier, 2,6 x 36,5 cm, volume de la colonne (CV) de 200 ml (Pfizer, Québec, Canada) chargée avec une résine cationique Source 15S fonctionnalisée par des ions SO_3^- (GE Healthcare). Le solvant A est composé d'HCl 1,25 mM, d'acétonitrile (ACN) 10 % et d'acide formique 20 mM pour maintenir le pH à 3. Le solvant B est composé de NaCl 1 mM, d'ACN 10 % et d'acide formique 10 mM, pH = 3. Le gradient d'élution retenu pour avoir une bonne séparation des pics est de 1 à 2 %/CV selon les venins, au débit de 20 ml/min. Un spectromètre ultraviolet (UV) en sortie de colonne permet de suivre l'élution des composés par mesure de la densité optique à 280 nm. Chaque fraction est recueillie séparément (Figure 54-a).

La deuxième étape du fractionnement est réalisée par chromatographie liquide à haute performance (HPLC) en phase inverse (Waters 600). Les fractions « mères » sont injectées sur une colonne préparative ou semi-préparative C18 Sunfire, 30 x 250 mm ou 10 x 250 mm respectivement (Vydac, Sigma-Aldrich, Saint Quentin Fallavier, France). La fraction est chargée sur la colonne dans un solvant A composé d' H_2O et d'acide trifluoroacétique (TFA) 0,1 %. Les sous-fractions sont éluées par un solvant B, formé d'ACN et de TFA 0,1 %, selon un gradient variant de 10 à 50 % en 80 min puis de 50 à 100 % en 25 min, au débit de 20 ou 5 ml/min selon le type de colonne utilisée. Les fractions « filles » sont détectées en sortie de colonne par mesure de la densité optique (DO) à 280 nm par un détecteur UV (Figure 54-b).

Chaque fraction recueillie est lyophilisée (lyophilisateur Christ Alpha 2-4 LD Plus), remise en suspension dans H_2O et dosée par mesure de son absorbance à 280 nm en spectromètre UV.

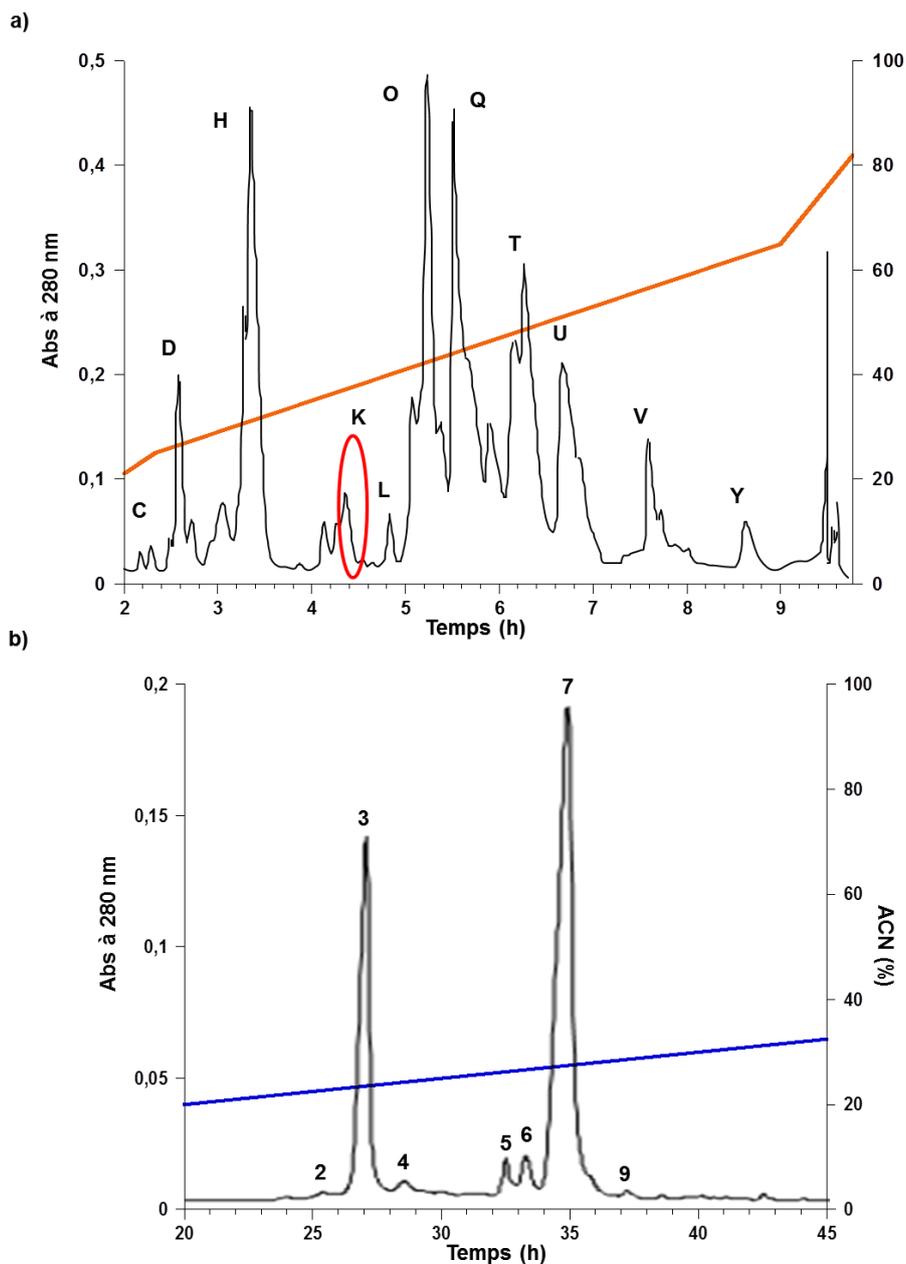


Figure 54 – Exemple du fractionnement du venin de *Dendroaspis viridis*. a) Fractionnement d'un gramme de venin sur résine échangeuse d'ions. Chaque fraction « mère », identifiée par une lettre majuscule, est recueillie séparément. Le gradient de solvant B (NaCl) au cours du temps est représenté par le tracé orange. b) Fractionnement de la fraction K par HPLC en phase inverse. Les fractions « filles », annoté par un chiffre, sont recueillies séparément pour être criblées sur V2R. Le gradient de solvant B (ACN) au cours du temps est représenté par le tracé bleu.

B. Synthèse des peptides

Toutes les toxines et variants ont été produits par synthèse chimique en phase solide selon un protocole développé au laboratoire décrit dans Blanchet *et al.* 2013. La

synthèse s'effectue par couplage covalent des acides aminés depuis l'extrémité C-terminale vers l'extrémité N-terminale. La fonction amine des acides aminés est protégée par un groupement Fmoc (Fluorénylméthoxycarbonyle) et la chaîne latérale est protégée par un groupement stable en milieu basique et labile en milieu acide.

La synthèse des peptides intègre des pseudo-prolines. Ce sont des dipeptides artificiels qui minimisent les phénomènes d'agrégation durant la synthèse peptidique en phase solide par rigidification de la chaîne principale. À la fois, elles servent de groupement protecteur temporaire et elles favorisent la solvatisation et le rendement de couplage. Au moment de la déprotection, les deux résidus initiaux retrouvent leur structure classique. Deux sortes de pseudo-prolines ont été utilisées pour la synthèse des toxines et variants : les oxazolidines à sérine ou à thréonine, qui comportent une structure cyclique de type proline. Elles étaient le plus souvent disposées ainsi dans la séquence (ici exemple de MQ-1, pseudo-prolines représentées en rouge) :

RPSFCNLVPVKPGPCNGFFSAFY**YS**QKTNKCHS**FT**YGGCKGNANRF**ST**IEKCRRTC VG

Les peptides ont été synthétisés sur un synthétiseur Prelude® (Protein Technologies) à partir d'une résine HMPB ChemMatrix ou Fmoc-X-WANG (Novabiochem) fonctionnalisée avec le dernier acide aminé de la séquence à synthétiser. Les différentes étapes de la synthèse sont la déprotection de la fonction amine du dernier acide aminé ajouté à la chaîne peptidique en cours de synthèse, l'activation du résidu suivant et son couplage au résidu précédemment déprotégé et la déprotection des chaînes latérales et le clivage de sa résine une fois la synthèse terminée. Chaque étape de couplage est répétée plusieurs fois afin d'assurer un rendement de synthèse maximal (Figure 55). En effet, un minimum de 98 % de rendement est nécessaire à chaque couplage pour obtenir un rendement final total de 34 %.

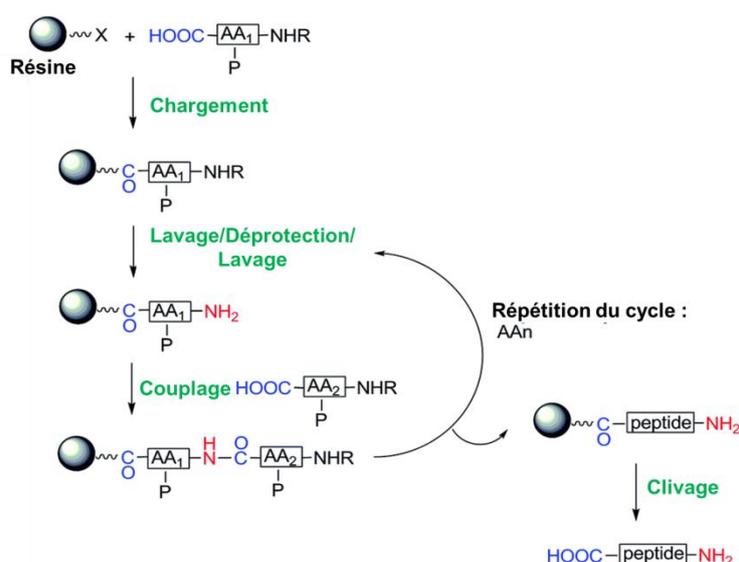


Figure 55 – Schéma de la synthèse chimique d'un peptide en phase solide.

Une fois le peptide synthétisé, il est clivé de la résine par un mélange TFA/anisole/thioanisole/triisopropylsilane dans H₂O pendant 2 h et précipité par l'éther froid. Enfin, le peptide est mis en solution dans de l'acide acétique 10 % et lyophilisé.

C. Purification et repliement des peptides

Suite à sa synthèse, le peptide est purifié par HPLC et sa masse est contrôlée. Il est oxydé afin d'obtenir sa conformation active. Le produit de repliement est purifié par HPLC, et après nouveau contrôle de sa masse, la formation des ponts disulfure est vérifiée par dichroïsme circulaire. Le produit final est quantifié par dosage UV.

1) Conditions HPLC et contrôles

Pour toutes les purifications, la fraction peptidique à purifier est en solution dans le solvant A composé par H₂O et TFA 0,1 % et la colonne est éluée par le solvant B composé par ACN et TFA 0,1 %. Le diamètre de la colonne est adapté en fonction de la quantité de produit à purifier. Dans tous les cas, il s'agit de colonne X-Bridge C18 (Waters). L'élution est réalisée par un gradient variant de 10 à 50 % de solvant B en 40 min, excepté lors de la purification finale, pour laquelle le gradient s'étend sur 80 min. L'élution des fractions d'intérêt est détectée par mesure de la DO à 280 nm par un détecteur UV et elles sont recueillies en sortie de colonne.

Le contrôle de la masse est fait par spectromètre de masse sur une colonne analytique X-Bridge C18 (Waters).

Le dosage final des peptides est réalisé par mesure spectrométrique de l'absorbance à 280 nm en utilisant la loi de Beer-Lambert :

$$C = \frac{A}{l \times \varepsilon}$$

avec C la concentration de l'échantillon en mol/l, l la longueur du trajet optique correspondant à l'épaisseur de la cuve en cm et ε le coefficient d'extinction molaire à 280 nm en l/mol/cm.

2) Oxydation des cystéines

Les cystéines possèdent un groupement thiol qui a la capacité de s'oxyder pour former un pont disulfure en s'associant à un autre groupement thiol. La réaction nécessite la présence d'un couple oxydo-réducteur en solution dans un milieu dégazé tamponné et éventuellement complété par un additif aidant la réaction. La réaction se déroule à température ambiante pendant 24 h.

La composition du milieu d'oxydation est ajustée pour chaque peptide afin d'obtenir le meilleur rendement de repliement. Le tampon à 100 mM est soit de l'HEPES à pH = 7,5, soit du Tris-HCl à pH = 8. Les couples oxydo-réducteurs utilisés sont cystéines/cystine en proportion 1/0,1 ou glutathion réduit/glutathion oxydé en proportion 1/1. Enfin, si nécessaire, les additifs peuvent être de la guanidine 0,5 M ou du glycérol 20 %.

3) Dichroïsme circulaire

Le dichroïsme circulaire (CD) est une technique spectroscopique permettant d'étudier les structures secondaires et tertiaires des peptides. Elle se base sur la différence d'absorption et de réfraction entre deux ondes polarisées circulairement droite et gauche, de même amplitude (Figure 56-a). Ces deux ondes sont émises par un faisceau monochromatique rectiligne de direction connue. Lorsqu'elles rencontrent un objet chiral¹⁴, elles sont absorbées et réfractées différemment et leur résultante forme une onde elliptique (Figure 56-b) (Niezborala 2008). La mesure de l'angle formé par le grand axe et le petit axe de la nouvelle polarisation elliptique, noté Ψ , donne l'ellipticité, différente pour chaque longueur d'onde (Figure 56-c). Le spectre CD résulte de l'ensemble des structures secondaires et tertiaires qui composent un peptide : hélices α , feuillets β et ponts disulfure.

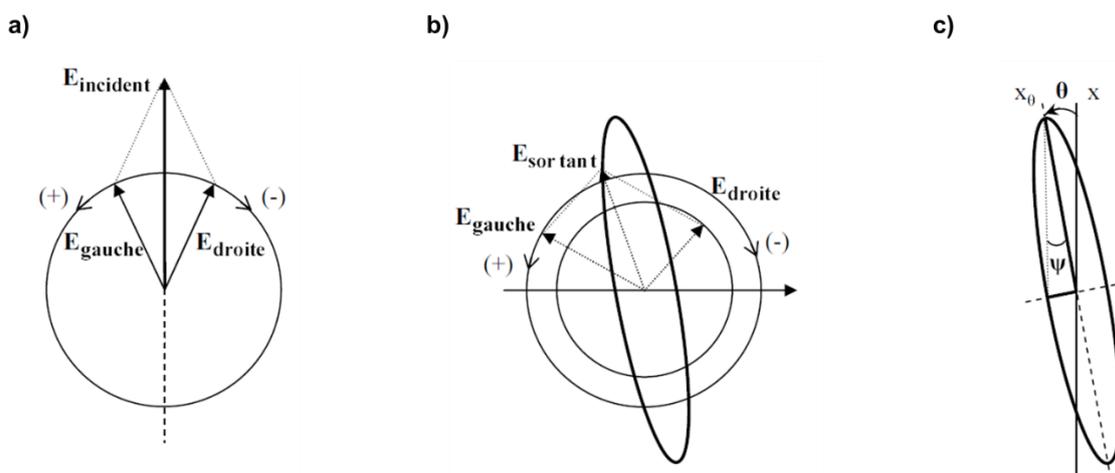


Figure 56 – Schéma de principe du dichroïsme circulaire. a) Décomposition de l'onde incidente polarisée rectilignement en deux ondes E circulaires droite et gauche de même amplitude. b) Les ondes circulaires droite et gauche sont déphasées et absorbées différemment en traversant l'échantillon et se recomposent à la sortie pour former une polarisation elliptique. c) La direction du grand axe de cette polarisation elliptique est située à un angle θ de l'axe x défini par la polarisation incidente, c'est l'angle de rotation optique. L'ellipticité de cette polarisation est donnée par l'angle Ψ .

¹⁴ Un objet est dit chiral lorsqu'il n'est pas superposable à son image dans un miroir. C'est le cas des acides aminés qui ont un carbone asymétrique (tous sauf la glycine).

Les spectres de CD ont été obtenus sur un JASCO J-815 CD Spectrometer. Le peptide était en solution à 10 μ M dans H₂O et placé dans une cuve de quartz de 1 mm de trajet optique. La mesure était répétée 3 fois à 20°C et effectuée entre 190 et 250 nm. Les données étaient enregistrées en ellipticité par le logiciel Spectra Manager™ II (JASCO) et les spectres tracés à l'aide du logiciel KaleidaGraph version 4.01 (Synergy software).

L'ellipticité a été normalisée entre 0 et 1 par la formule suivante :

$$\textit{Ellipticité normalisée} = (x - X_{min}) / (X_{max} - X_{min})$$

où x est la valeur à normaliser, X_{min} la valeur d'ellipticité minimale et X_{max} la valeur d'ellipticité maximale, à 190 nm.

II. Tests pharmacologiques

A. Culture cellulaire

1) Conditions de cultures cellulaires

Tous les produits utilisés pour la culture cellulaire ont été fournis par ThermoFisher.

Les cellules utilisées pour les tests pharmacologiques sont des cellules ovariennes de hamster chinois immortalisées (CHO) transfectées stablement avec le récepteur d'intérêt V2R. Un clone différent a été utilisé en fonction du type de test à réaliser, se différenciant par le taux d'expression du récepteur : les tests de liaison ont été réalisés avec un clone surexprimant très fortement le récepteur et les tests de fonction avec un clone exprimant modérément le récepteur. Tous ces clones nous ont été fournis par nos collaborateurs de l'IGF à Montpellier.

Les cellules sont cultivées en boîte de pétri ou en flasque dans un milieu Eagle modifié de Dulbecco (DMEM) complété par 10 % de sérum de veau fœtal, 100 unités/ml de pénicilline, 100 μ g/ml de streptomycine, 2 mM de L-glutamine, 0,25 μ g/ml d'amphotéricine B et 0,1 mM d'acides aminés non essentiels, à 37°C et sous atmosphère humide à 5 % de CO₂.

L'entretien des cellules se fait par repiquage toutes les 48 à 72 h en fonction du taux de confluence des cellules. Après aspiration du milieu, les cellules sont décollées par une solution de Versène (acide éthylène diamine tétra-acétique (EDTA) à 5 mM dans un

tampon phosphate salin (PBS) 1X à pH = 7,5) ou de trypsine puis récupérées pour être centrifugées 5 min à 1500 rpm. Après retrait du surnageant, le culot cellulaire est remis en suspension dans un volume adapté de milieu frais et les cellules remises en culture.

Pour les tests de fonction, les cellules sont ensemencées à raison de 5000 cellules par puits la veille de l'expérience dans des plaques 96 puits noire à fond plat opaque dans 100 µl de milieu DMEM complémenté.

2) Production de membranes

Les tests de compétition ont été réalisés sur des membranes de cellules CHO transfectées stablement et surexprimant le récepteur d'intérêt.

Toutes les étapes se déroulent au maximum dans la glace. Après récupération des cellules par décollement et centrifugation, le culot cellulaire est remis en suspension dans une solution dans un tampon de composition HEPES 10 mM, EDTA 1 mM et MgCl₂ 5 mM, pH = 7,2. Les cellules sont cassées mécaniquement par un broyeur de tissus Potter-Elvehjem puis centrifugées 15 min à 2000 rpm et 4°C. Le surnageant est récupéré et l'étape de broyage-centrifugation est répétée sur le culot cellulaire restant. Le nouveau surnageant obtenu est ajouté au précédent. Les surnageants sont centrifugés 30 min à 20000 rpm et à 4°C. Le culot cellulaire obtenu est remis en suspension dans un faible volume de tampon. La préparation de membranes obtenue est répartie dans des tubes, congelée dans l'azote liquide et conservée à -80°C jusqu'à utilisation.

La concentration protéique totale des préparations de membrane est mesurée par la méthode de Bradford (Bio-rad protein assay) en utilisant l'albumine sérique bovine (BSA) (Sigma) à 1 mg/ml comme standard dans le dosage.

B. Test de liaison

1) Notions théoriques sur la liaison ligand-récepteur

La liaison d'un ligand sur son récepteur est définie par l'équation suivante :



avec R pour récepteur, L pour ligand et RL pour le complexe ligand-récepteur.

Le complexe s'associe et se dissocie à des vitesses différentes. L'état d'équilibre se définit lorsque la vitesse d'association est égale à la vitesse de dissociation. On peut alors déterminer la constante de dissociation du complexe à l'équilibre, K_d, selon la formule suivante :

$$K_d = \frac{[R] \times [L]}{[RL]}$$

avec K_d , $[R]$, $[L]$ et $[RL]$ exprimés en mol/l.

2) Mode opératoire général des tests de liaison

Tous les tests de liaison ont été réalisés dans des plaques 96 puits à fond rond. La réaction se passe dans un volume total de 100 μ l, à température ambiante et en solution dans un tampon de liaison de composition HEPES 50 mM, $MgCl_2$ 5 mM, $CaCl_2$ 1 mM et BSA 0,1 %. Le radioligand utilisé est la vasopressine tritiée (3H -AVP) à une concentration proche de son K_d pour ce récepteur (1 nM). La préparation de membranes est utilisée à la concentration optimale, déterminée pour chaque lot par un test de liaison spécifique (décrit dans le paragraphe suivant). Lorsqu'il est nécessaire de déterminer la liaison non spécifique, un compétiteur non marqué est ajouté en large excès par rapport à son K_d . Le tolvaptan a été utilisé à 1 μ M. L'incubation des différents réactifs dure au moins deux heures. À la fin de l'incubation, une étape de filtration sur une plaque filtre GF/C permet de séparer le radioligand fixé sur les récepteurs du radioligand libre. La plaque filtre a été préalablement saturée par polyéthylèneimine à 0,5 % ou BSA 0,2 % afin de limiter la fixation de radioligand libre sur le filtre, appelé blank filter (BF). Après séchage des filtres, 25 μ l de microscintillant (Microscint 0) sont ajoutés par puits. Le scintillant absorbe les rayonnements β^- émis par le radioligand et émet un signal lumineux lors de sa relaxation. Cette lumière est détectée par les photomultiplicateurs d'un compteur β (TopCount, Perkin Elmer). Les résultats sont exprimés en coups par minute (CPM) et peuvent être convertis en désintégrations par minute (DPM) en tenant compte du rendement de comptage de l'appareil, qui est de 0,33. La concentration molaire de radioligand par puits est ensuite calculée par la formule suivante :

$$[C] = \frac{DPM / 2,2 \cdot 10^{-12} / AS}{v}$$

où $2,2 \cdot 10^{-12}$ correspond au facteur de conversion des DPM en Ci, AS correspond à l'activité spécifique du radioligand en Ci/mmol, v est le volume de réaction en ml et $[C]$ est exprimée en mol/l.

3) Optimisation du test de liaison

Afin de déterminer les meilleures conditions d'utilisation de chaque nouvelle préparation de membranes, la liaison de la 3H -AVP est testée sur plusieurs concentrations en duplicata (Figure 57). L'objectif est de déterminer une quantité de membranes qui permet à la fois que la liaison spécifique (BS) du radioligand soit supérieure à 90 % et que

sa liaison totale (BT) soit inférieure à 10 % de la totalité de la radioactivité proposée par puits (condition de déplétion minimale).

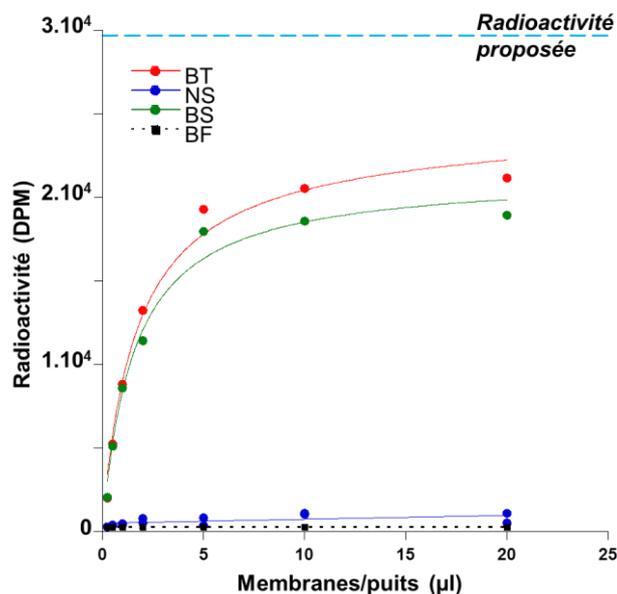


Figure 57 – Caractérisation d'un lot de préparation membranes. Schéma de principe. Courbes de liaison totale (BT), de liaison spécifique (BS) et de liaison non spécifique (NS). BF : blank filter, correspondant au bruit de fond.

La liaison spécifique est calculée selon la formule suivante :

$$BS = BT - NS$$

où NS représente la quantité de radioligand liée de façon non-spécifique.

Le pourcentage de déplétion correspond à la formule suivante :

$$\text{Déplétion} = \frac{BT - BF}{dpm \text{ proposé}} \times 100$$

où BF représente la quantité de radioligand fixée sur les filtres.

4) Tests de compétition

a) **Criblage des fractions de venin**

Chaque fraction obtenue suite à la deuxième purification par HPLC est testée une seule fois. Au mélange de préparation de membranes et de $^3\text{H-AVP}$, 5 µl d'une fraction ou d'un mélange de fractions de venin sont ajoutés. Toutes les fractions qui inhibent plus de 50 % de la liaison spécifique sont soumises à un test de compétition sur une gamme de concentrations sur 6 logs de 10 afin de confirmer leur activité et d'estimer leur K_i comme décrit dans le paragraphe suivant.

b) Détermination du Ki des toxines et des variants

Les peptides en solution dans du tampon de liaison sont testées sur une gamme de concentrations de 10 pM à 10 µM selon le mode opératoire décrit précédemment. Les résultats sont présentés en pourcentage de la liaison spécifique en présence du peptide testé (B) par rapport à la liaison spécifique en absence du peptide testé (B₀), calculé selon la formule suivante :

$$\%B/B_0 = \frac{(B - NS)}{(B_0 - NS)} \times 100$$

Les courbes de compétition sont tracées à l'aide du logiciel KaleidaGraph version 4.01 (Synergy software) en utilisant l'équation suivante :

$$\%B/B_0 = min + \frac{(max - min)}{1 + ([toxine]/IC50)^{pente}}$$

où *min* correspond à la liaison spécifique du radioligand aux fortes concentrations du peptide testé et *max* correspond à la liaison spécifique du radioligand en l'absence du peptide testé.

Ainsi, l'IC₅₀, qui correspond à la concentration de toxine déplaçant 50 % de la liaison spécifique du radioligand, peut être estimée. En utilisant le modèle de Cheng et Prusoff (Cheng & Prusoff 1973), il est possible d'en déduire la constante d'inhibition (Ki) de la toxine, lorsque l'expérience a été réalisée dans les conditions d'équilibre. Cette constante a pour avantage de s'affranchir des conditions expérimentales et permet de comparer plusieurs expériences indépendantes. Elle se calcule selon l'équation suivante :

$$Ki = \frac{IC50}{1 + ([L^*]/K_d)}$$

où L* correspond au radioligand, Ki, IC₅₀, [L*] et K_d sont exprimés en mol/l.

C. Test de fonction

1) Théorie du transfert d'énergie

Le transfert d'énergie par résonance de Förster (FRET) est une technique basée sur le transfert d'énergie entre deux fluorophores, dits donneur et accepteur. Ce couple de fluorophores est constitué de telle sorte que la longueur d'onde d'émission du donneur corresponde à la longueur d'onde d'excitation de l'accepteur. Elle permet d'étudier l'interaction entre deux molécules qui sont chacune couplée avec un des fluorophores du

couple (Figure 58-a). Ainsi, lorsque les deux molécules sont à proximité et que le donneur est excité, sa fluorescence émise va à son tour exciter l'accepteur et il sera possible de détecter la fluorescence de ce dernier (Figure 58-b). Un système FRET est défini par le rayon de Förster R_0 qui correspond à la distance pour laquelle l'efficacité du transfert est de 50 %.

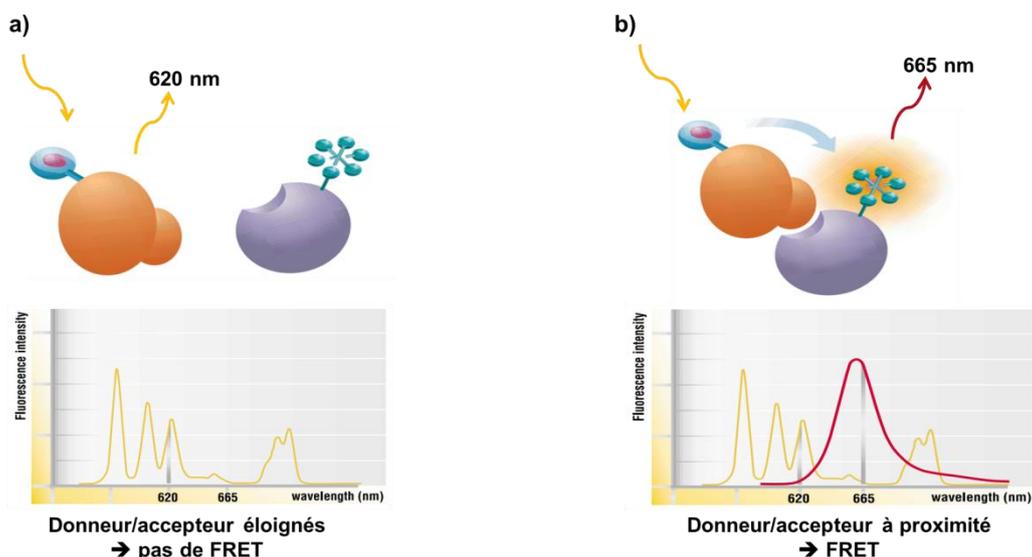


Figure 58 – Schéma de FRET. a) Lorsque les deux partenaires sont éloignés, seule la fluorescence émise par le donneur est détectée. b) Lorsque les deux partenaires sont suffisamment proches, la fluorescence émise par le donneur excite l'accepteur et la fluorescence des deux molécules peut être enregistrée. Schéma modifié d'après Cisbio.

La technologie de fluorescence homogène résolue en temps (HTRF[®]) développée par Cisbio permet de s'affranchir d'un bruit de fond qui peut gêner la mesure et qui est aléatoire selon les molécules et le milieu utilisé. Il s'agit d'une mesure dite résolue en temps, c'est-à-dire que l'enregistrement de la fluorescence est retardé de quelques µsecondes (50 à 150 µsec environ) après l'excitation du donneur de façon à ce que les courtes émissions non spécifiques soient éteintes au moment de la mesure (Figure 59). Les fluorophores HTRF[®] ont la particularité d'avoir une fluorescence prolongée, ce qui favorise une mesure spécifique et totale.

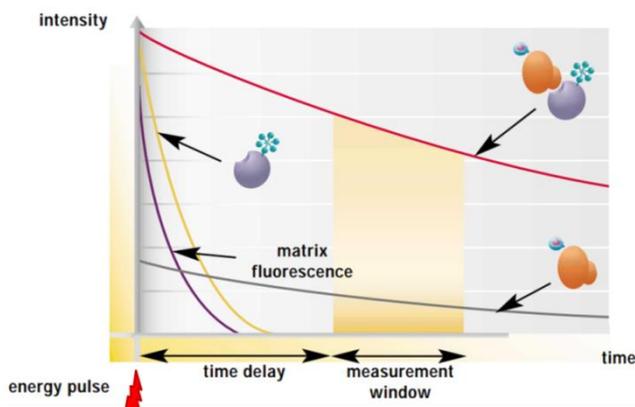


Figure 59 – Décroissance de la fluorescence dans le temps. Suite à l'excitation du donneur (energy pulse), l'enregistrement de l'émission de fluorescence (measurement window) du donneur seul (gris) et de l'accepteur (rouge) est retardé de quelques μ secondes (time delay), le temps que la fluorescence non spécifique (milieu, protéines...) (violet) et de l'accepteur seul (jaune) soit éteinte. Schéma d'après Cisbio.

2) Principe du test de fonction AMPc Cisbio

La quantification de l'AMPc par le kit Cisbio (cAMP – GS dynamic kit), repose sur un test de compétition. La première étape de stimulation consiste en l'incubation d'une quantité fixe d'agoniste naturel, ici l'AVP, avec plus ou moins d'antagoniste supposé sur des cellules exprimant le récepteur d'intérêt. Suit l'étape de compétition. Les cellules sont lysées afin de stopper la réaction et de libérer dans le milieu l'AMPc qu'elles ont produit. Alors, un mélange d'AMPc marqué avec le fluorophore accepteur et d'anticorps anti-AMPc marqué avec le fluorophore donneur est ajouté au milieu. L'AMPc produit et l'AMPc marqué entrent en compétition pour la liaison à l'anticorps. La fluorescence mesurée dans les puits de réaction est proportionnelle au phénomène de FRET créé par la liaison entre l'anticorps anti-AMPc et l'AMPc marqué. Par conséquent, le signal mesuré est inversement proportionnel à la quantité d'AMPc produit par les cellules au cours de la réaction avec les ligands (Figure 60).

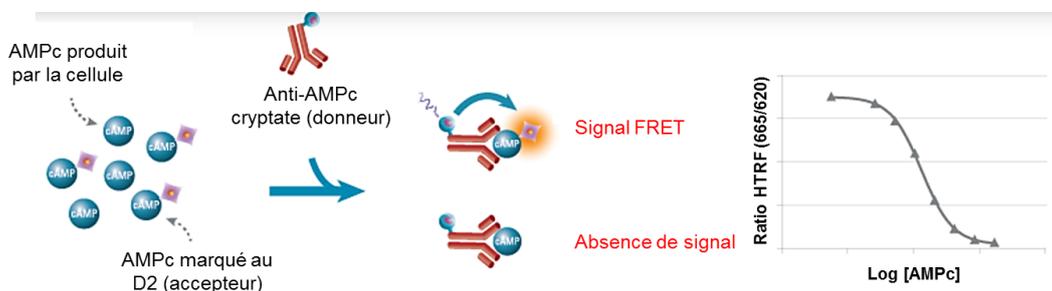


Figure 60 – Principe de la quantification de l'AMPc produit par les cellules par compétition de liaison à l'anticorps anti-AMPc. L'AMPc produit par la cellule au cours de la réaction est en compétition avec l'AMPc marqué au D2 (accepteur) pour la liaison à l'anticorps anti-AMPc marqué par un cryptate (donneur). La liaison de l'anticorps à l'AMPc produit ne donne pas lieu à un signal. Le ratio HTRF est inversement proportionnel à la quantité d'AMPc produite par les cellules. Schéma modifié d'après Cisbio.

3) Courbe dose-réponse de la vasopressine

Vingt-quatre heures après incubation des cellules CHO-hV2R dans des plaques 96 puits à raison de 5000 cellules par puits dans un milieu DMEM complété, le milieu est retiré. Cinquante microlitres des différentes concentrations d'AVP sont déposées dans les puits en solution dans un milieu DMEM, BSA 0,5 % et Ro 20-1724 0,1 mM. Le Ro 20-1724 est un inhibiteur des phosphodiesterases 4 qui dégradent l'AMPc. Ainsi, l'AMPc produit au cours de la réaction sera accumulé dans les cellules. L'étape de stimulation des cellules dure 30 minutes à 37°C. Elle est stoppée par ajout de 50 µl du couple donneur-accepteur en solution dans un tampon de lyse. L'étape de compétition se fait pendant 1 h dans le noir et à température ambiante. Le signal de FRET est mesuré au spectromètre RUBYstar (BMG Labtech) selon la formule suivante :

$$Ratio = \frac{signal\ 665\ nm}{signal\ 620\ nm} \times 10^4$$

où le signal à 665 nm correspond à l'émission de l'accepteur et le signal à 620 nm correspond à l'émission du donneur.

Grâce à la gamme étalon d'AMPc, le ratio est converti en concentration d'AMPc. Afin d'estimer l'EC50, c'est-à-dire la concentration d'agoniste permettant 50 % de la réponse totale, une courbe dose-réponse a été tracée à l'aide du logiciel Kaleidagraph version 4.01 (Synergy software) en utilisant l'équation de Hill :

$$[AMPc] = min + \frac{max - min}{1 + 10^{\log(EC50) - [AVP]}}$$

où *min* correspond à la production basale d'AMPc en absence d'AVP et *max* correspond à la production maximale d'AMPc sous effet de l'AVP.

4) Inhibition de la production d'AMPc

Le protocole expérimental est identique à celui de la dose-réponse d'AVP. Les différentes concentrations de molécules compétitrices à tester sont incubées sans le milieu DMEM, BSA, Ro 20-1724 en mélange avec une concentration fixe d'AVP correspondant à son EC80.

Afin d'estimer les IC50, c'est-à-dire la concentration de toxine capable d'inhiber 50 % de la production d'AMPc en présence d'agoniste, les courbes de compétition ont été tracées à l'aide du logiciel Kaleidagraph version 4.01 (Synergy software) en utilisant l'équation suivante :

$$[AMPc] = min + \frac{max - min}{1 + 10^{[toxine] - \log(IC50)}}$$

où *min* correspond à la production d'AMPc aux fortes concentrations d'antagoniste et *max* correspond à la production maximale d'AMPc en réponse à l'AVP à l'EC80 et en l'absence de toxine.

Contrairement aux tests de liaison, les tests de fonction n'ont pas été réalisés dans les conditions d'équilibre. Il n'est donc pas possible d'appliquer le modèle de Cheng et Prusoff pour convertir l'IC50 en Ki. Cependant, il s'agit avant tout d'une analyse comparative entre l'effet antagoniste des toxines par rapport à celui de MQ-1. Toutes les toxines ont systématiquement été testées en parallèle et MQ-1 utilisée comme contrôle interne dans chaque plaque, ce qui permet une analyse qualitative. Par ailleurs, bien que les expériences soient indépendantes, la robustesse du test était suffisamment élevée pour autoriser le calcul de moyennes.

D. Test d'immuno-absorption enzymatique ELISA

Le test ELISA indirect repose sur le principe de détection d'un anticorps primaire suite à la liaison d'un anticorps secondaire.

Afin de détecter des anticorps anti-MQ-1 dans le sérum de souris, les puits d'une plaque 96 puits MAXISORP sont tapissés par incubation pendant 1 h à 37°C d'une solution de MQ-1 à 1 µg/ml dans du PBS 1X, ou du PBS 1X seul pour les puits contrôles. Après élimination de la solution, les puits sont saturés pendant 1 h 30 à température ambiante par un mélange de BSA 0,3 % et thimérosal 0,003 % (conservateur) dans du PBS 1X. Les puits sont lavés par un mélange PBS 1X-Tween20 0,05 %. Le sérum, dilué à différentes concentrations dans un tampon de dilution (Tween20 0,05 %, BSA 0,2 % et PBS 1X), est incubé sur la nuit à 4°C. Les puits sont à nouveau lavés. Un anticorps secondaire anti-immunoglobuline G de souris couplé à une enzyme peroxydase de raifort est ensuite incubé dilué au 1/5000^{ème} dans le tampon de dilution (Anti-mouse IgG-Peroxidase antibody produced in goat, Sigma). L'anticorps secondaire est lavé puis révélé par addition de 3, 3', 5, 5'-tétraméthylbenzidine (Sigma), le substrat chromogène de la peroxydase, sous agitation pendant 10 min à température ambiante et à l'abri de la lumière. La réaction est arrêtée par ajout de H₂SO₄ à 1M. La fluorescence est détectée par un fluorimètre VICTOR™ 2D (Perkin-Elmer) à 450 nm. Une DO inférieure à 0,5 est considérée comme non spécifique.

III. *In vivo*

Toutes les expérimentations *in vivo* conduites au cours de cette thèse ont reçu l'avis favorable du comité d'éthique sous le numéro de projet 15_014.

A. Conditions d'hébergement des animaux

Les animaux sont fournis par Janvier Labs. Ils sont accueillis et hébergés à l'animalerie du CEA Saclay (numéro d'agrément : D 91 272 106) au moins une semaine avant le début d'une expérience pour qu'ils s'habituent à l'environnement.

Les rats sont des Sprague-Dawley mâles. Ils sont répartis par groupe de trois dans chaque cage.

Les souris sont des mâles issus de trois souches consanguines : BALB/c, C57BL/6 et CBA/J. Elles sont placées par groupe de quatre dans chaque cage (en fonction de la souche).

Les animaux ont libre accès à la nourriture et à la boisson. Ils sont nourris par des granulés LASQCdiet® Rod16, HiHyg (LASvendi). L'eau de boisson provient du robinet.

B. Préparation et administration des toxines

1) Chez les rats

La voie d'administration intrapéritonéale (IP) consiste en une injection de 1 ml de la toxine à la concentration souhaitée en solution dans une solution de NaCl à 0,9 % filtrée stérilement. L'injection se fait dans le cadran inférieur droit de l'abdomen pendant que l'animal est maintenu manuellement par l'opérateur.

La voie orale correspond à l'administration par gavage de 1 ml de MQ-1 en solution dans de l'eau de boisson à l'aide d'une sonde gastro-intestinale adaptée à la taille de l'animal, qui est maintenu manuellement par l'opérateur.

2) Chez les souris

MQ-1 est administrée par voie sous-cutanée sur animaux endormis à l'isoflurane. Dix microgrammes de MQ-1 sont préparées en solution dans 100 µl de PBS 1X. L'adjuvant utilisé est l'alum, mélangé en proportion 1/1. Les injections ont lieu à l'arrière du dos, en changeant d'emplacement à chaque nouvelle immunisation.

C. Suivi des animaux

1) Bien-être des animaux au cours des expériences

Afin de s'assurer du bon état de santé des animaux, ils sont pesés tous les jours. Une perte de poids supérieure à 10 % en 24 h est considérée comme un point d'arrêt de l'étude.

Les quantités de nourriture et de boisson ingérées sont mesurées quotidiennement au cours d'une étude afin de vérifier que l'animal a un comportement alimentaire normal.

Les animaux sont observés quotidiennement afin de s'assurer qu'ils ont un comportement individuel (activité physique, toilettage) et social (interaction avec le groupe) normal.

2) Évaluation de l'effet des toxines chez les rats

Afin de recueillir les urines, les rats sont placés individuellement dans des cages métaboliques Tecniplast de taille adaptée à l'animal. Un filtre est placé à l'entrée des tubes de collecte des urines afin d'éviter la présence de nourriture ou de fèces dans les urines.

Le **débit urinaire** est calculé à partir de la formule suivante :

$$\text{Débit urinaire} = \frac{\text{volume urinaire}}{\Delta\text{temps} \times \text{poids}}$$

avec le volume urinaire exprimé en ml, le temps en heure et le poids des animaux en kg.

Le volume urinaire est estimé à partir de la pesée des tubes collecteurs d'urine, en considérant que 1 g d'urine = 1 ml d'urine.

L'**osmolalité urinaire** correspond à la quantité d'osmoles de solutés contribuant à la pression osmotique d'un solvant, rapporté au poids en kg du solvant. Elle est mesurée directement en mOsm/kg H₂O par un micro-osmomètre automatique type 13 Roebling. Si besoin, l'échantillon est dilué au demi ou au quart dans H₂O.

L'osmolalité urinaire moyenne sur la journée d'un animal, lorsqu'il y a eu plusieurs relevés d'urines correspond à la moyenne pondérée par le volume urinaire correspondant.

L'**excrétion d'osmoles** dans les urines est estimée par la formule suivante :

$$\text{Excrétion osmolaire} = \frac{\text{osmolalité urinaire} \times \text{volume urinaire}}{\Delta\text{temps} \times \text{poids}}$$

avec l'osmolalité urinaire exprimée en mOsm/kg H₂O, le volume urinaire en l, le temps en h et le poids des animaux en kg.

La modélisation de la diminution du débit urinaire (DU) en fonction de la dose de MQ-1 a été réalisée avec une équation de décroissance exponentielle à une pente (1) ou à deux pentes (2) selon les formules suivantes :

$$(1) \quad DU = DU_{basal} + (DU_{max} - DU_{basal}) \times e^{(-k \times temps)}$$

$$(2) \quad DU = DU_{basal} + \alpha \times e^{(-k_{rapide} \times temps)} + \beta \times e^{(-k_{lente} \times temps)}$$

$$\alpha = (DU_{max} - DU_{basal}) \times P \text{ phase rapide}$$

$$\beta = (DU_{max} - DU_{basal}) \times P \text{ phase lente}$$

où le DU_{basal} est fixé à 1,56 ml/h/kg (d'après le groupe placebo), k (1) représente la constante de décroissance de l'effet en h⁻¹, k_{rapide} (2) est la constante de décroissance rapide de l'effet en h⁻¹, k_{lente} (2) est la constante de décroissance lente de l'effet en h⁻¹, le temps est exprimé en h et P est la proportion de chaque phase avec $P \text{ phase rapide} = 1 - P \text{ phase lente}$.

Le temps de demi-vie biologique ($t_{1/2}$), exprimé en h, est estimé selon la formule suivante :

$$t_{1/2} = \frac{\ln 2}{k}$$

Les représentations graphiques ont été réalisées à l'aide des logiciels Kaleidagraph version 4.01 (Synergy software) et GraphPad Prism® version 5.00 (GraphPad software).

3) Prélèvements sanguins chez les souris

Quinze jours après la troisième immunisation par MQ-1, les souris sont endormies par anesthésie générale terminale au pentobarbital et la totalité du sang est prélevé par ponction intracardiaque.

Le sang est collecté dans un tube non hépariné et coagule à température ambiante pendant 30 min. Il est ensuite centrifugé 10 min à 10000 rpm à 4°C et le sérum (surnageant) est collecté dans un tube propre à 4°C. Le sérum est aliquoté et conservé à -80°C.

IV. Analyse statistique

Le calcul de l'erreur standard sur la moyenne (SEM) correspond à la formule suivante :

$$SEM = \frac{\sigma}{\sqrt{n}}$$

avec σ l'écart-type et n le nombre de sujets dans l'échantillon ≥ 3 .

Les analyses statistiques ont été menées sur des petits échantillons qui ne vérifiaient pas la loi normale. Nous avons donc utilisé des tests statistiques non paramétriques.

Afin de comparer une mesure continue entre plusieurs groupes, le test de Kruskal-Wallis a été utilisé. L'hypothèse nulle de ce test est H_0 « toutes les médianes sont égales » et l'hypothèse alternative est H_a « il existe au moins un groupe pour lequel la médiane diffère des autres groupes ». Le risque de première espèce a été fixé à $\alpha = 0,05$. Si l'hypothèse nulle est rejetée, le test post-hoc de Dunnnett est effectué afin de comparer chacun des groupes à un groupe de référence. Sur les représentations graphiques, la significativité d'un test est annotée de la façon suivante : * pour $p =]0,05 ; 0,01]$; ** pour $p =]0,01 ; 0,001]$ et *** pour $p < 0,001$.

Toutes les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide du logiciel Kaleidagraph version 4.01 (Synergy software).

BIBLIOGRAPHIE

- Aguiari, G. *et al.*, 2003. Expression of polycystin-1 C-terminal fragment enhances the ATP-induced Ca²⁺ release in human kidney cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 301(3), pp.657–664.
- Ahuja, S. *et al.*, 2009. Helix movement is coupled to displacement of the second extracellular loop in rhodopsin activation. *Nature structural & molecular biology*, 16(2), pp.168–175.
- Alonso, G. *et al.*, 2009. Sustained elevated levels of circulating vasopressin selectively stimulate the proliferation of kidney tubular cells via the activation of V2 receptors. *Endocrinology*, 150(1), pp.239–250.
- Andreev, Y.A. *et al.*, 2008. Analgesic compound from sea anemone *Heteractis crispa* is the first polypeptide inhibitor of vanilloid receptor 1 (TRPV1). *Journal of Biological Chemistry*, 283(35), pp.23914–23921.
- Armstrong, S.P. *et al.*, 2013. Characterization of three vasopressin receptor 2 variants: an apparent polymorphism (V266A) and two loss-of-function mutations (R181C and M311V). *PloS one*, 8(6), p.e65885.
- Attwood, T.K. & Findlay, J.B., 1994. Fingerprinting G-protein-coupled receptors. *Protein engineering*, 7(2), pp.195–203.
- Audrézet, M.-P. *et al.*, 2012. Autosomal dominant polycystic kidney disease: comprehensive mutation analysis of PKD1 and PKD2 in 700 unrelated patients. *Human mutation*, 33(8), pp.1239–1250.
- Ballesteros, J.A. & Weinstein, H., 1995. Integrated methods for the construction of three-dimensional models and computational probing of structure-function relations in G protein-coupled receptors. *Methods in Neurosciences*, 25, pp.366–428.
- Bankir, L., 2001. Antidiuretic action of vasopressin: Quantitative aspects and interaction between V1a and V2 receptor-mediated effects. *Cardiovascular Research*, 51(3), pp.372–390.
- Barak, L.S. *et al.*, 2001. Constitutive arrestin-mediated desensitization of a human vasopressin receptor mutant associated with nephrogenic diabetes insipidus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(1), pp.93–98.
- Barile, M. *et al.*, 2005. Large scale protein identification in intracellular aquaporin-2 vesicles from renal inner medullary collecting duct. *Molecular & cellular proteomics*, 4(8), pp.1095–1106.
- Bateman, A. *et al.*, 2017. UniProt: The universal protein knowledgebase. *Nucleic Acids Research*, 45(D1), pp.D158–D169.
- Baur, B.P. & Meaney, C.J., 2014. Review of tolvaptan for autosomal dominant polycystic kidney disease. *Pharmacotherapy*, 34(6), pp.605–616.
- Bayrhuber, M. *et al.*, 2005. Conkunitzin-S1 is the first member of a new Kunitz-type neurotoxin family. *Journal of Biological Chemistry*, 280(25), pp.23766–23770.
- Bellot, G. *et al.*, 2009. Structure of the Third Intracellular Loop of the Vasopressin V2 Receptor and Conformational Changes upon Binding to gC1qR. *Journal of Molecular Biology*, 388(3), pp.491–507.
- Bhunia, A.K. *et al.*, 2002. PKD1 induces p21(waf1) and regulation of the cell cycle via direct activation of the JAK-STAT signaling pathway in a process requiring PKD2.

- Cell*, 109(2), pp.157–168.
- Bichet, D.G., 2009. V2R Mutations and Nephrogenic Diabetes Insipidus. *Progress in Molecular Biology and Translational Science*, 89(C), pp.15–29.
- Birnbaumer, M. *et al.*, 1992. Molecular cloning of the receptor for human antidiuretic hormone. *Nature*, 357(6376), pp.333–335.
- Blanchet, G. *et al.*, 2013. New α -adrenergic property for synthetic MT β and CM-3 three-finger fold toxins from black mamba. *Toxicon*, 75, pp.160–167.
- Bockaert, J., 1995. Les récepteurs à sept domaines transmembranaires : physiologie et pathologie de la transduction. *Médecine Science*, 111(3), pp.382–394.
- Bohlen, C.J. *et al.*, 2011. A heteromeric Texas coral snake toxin targets acid-sensing ion channels to produce pain. *Nature*, 479(7373), pp.410–414.
- Boletta, A. *et al.*, 2000. Polycystin-1, the gene product of PKD1, induces resistance to apoptosis and spontaneous tubulogenesis in MDCK cells. *Molecular cell*, 6(5), pp.1267–1273.
- Bondke Persson, A., 2013. G - proteins - receptors, signals and function. *Acta physiologica (Oxford, England)*, 209(2), pp.91–93.
- Bouley, R. *et al.*, 2005. Downregulation of the vasopressin type 2 receptor after vasopressin-induced internalization: involvement of a lysosomal degradation pathway. *American journal of physiology. Cell physiology*, 288(6), pp.C1390-1401.
- Bouley, R. *et al.*, 2003. Functional role of the NPxxY motif in internalization of the type 2 vasopressin receptor in LLC-PK1 cells. *American journal of physiology. Cell physiology*, 285(4), pp.C750-762.
- Bowen-Pidgeon, D. *et al.*, 2001. Arrestin effects on internalization of vasopressin receptors. *Molecular pharmacology*, 59(6), pp.1395–1401.
- Brinkert, F. *et al.*, 2013. Combined liver-kidney transplantation for children with autosomal recessive polycystic kidney disease (ARPKD): indication and outcome. *Transplant international : official journal of the European Society for Organ Transplantation*, 26(6), pp.640–650.
- Brown, D. *et al.*, 2008. Phosphorylation events and the modulation of aquaporin 2 cell surface expression. *Current opinion in nephrology and hypertension*, 17(5), pp.491–498.
- Bukanov, N.O. *et al.*, 2012. CDK inhibitors R-roscovitine and S-CR8 effectively block renal and hepatic cystogenesis in an orthologous model of ADPKD. *Cell Cycle*, 11(21), pp.4040–4046.
- Burbach, J.P.H. *et al.*, 2001. Gene regulation in the magnocellular hypothalamo-neurohypophysial system. *Physiological reviews*, 81(3), pp.1197–1267.
- Bycroft, M. *et al.*, 1999. The structure of a PKD domain from polycystin-1: Implications for polycystic kidney disease. *EMBO Journal*, 18(2), pp.297–305.
- Cadnapaphornchai, M.A. *et al.*, 2014. Effect of pravastatin on total kidney volume, left ventricular mass index, and microalbuminuria in pediatric autosomal dominant polycystic kidney disease. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology*, 9(5), pp.889–896.
- Cai, Y. *et al.*, 1999. Identification and characterization of polycystin-2, the PKD2 gene product. *Journal of Biological Chemistry*, 274(40), pp.28557–28565.

- Caldwell, H.K. *et al.*, 2008. Vasopressin: behavioral roles of an “original” neuropeptide. *Progress in neurobiology*, 84(1), pp.1–24.
- Canaud, G. *et al.*, 2010. Therapeutic mTOR inhibition in autosomal dominant polycystic kidney disease: What is the appropriate serum level? *American journal of transplantation: official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons*, 10(7), pp.1701–1706.
- Caroli, A. *et al.*, 2013. Effect of longacting somatostatin analogue on kidney and cyst growth in autosomal dominant polycystic kidney disease (ALADIN): a randomised, placebo-controlled, multicentre trial. *Lancet*, 382(9903), pp.1485–1495.
- Carpenter, B. *et al.*, 2016. Structure of the adenosine A2A receptor bound to an engineered G protein. *Nature*, 538(7626), pp.542–542.
- Casewell, N.R. *et al.*, 2013. Complex cocktails: The evolutionary novelty of venoms. *Trends in Ecology and Evolution*, 28(4), pp.219–229.
- Cheng, Y.-C. & Prusoff, W.H., 1973. Relationship between the inhibition constant (KI) and the concentration of inhibitor which causes 50 per cent inhibition (I50) of an enzymatic reaction. *Biochemical Pharmacology*, 22(23), pp.3099–3108.
- Cherezov, V. *et al.*, 2007. High-resolution crystal structure of an engineered human beta2-adrenergic G protein-coupled receptor. *Science (New York, N.Y.)*, 318(5854), pp.1258–1265.
- Chou, C.-L. *et al.*, 2000. Regulation of aquaporin-2 trafficking by vasopressin in the renal collecting duct. Roles of ryanodine-sensitive Ca²⁺ stores and calmodulin. *The Journal of biological chemistry*, 275(47), pp.36839–36846.
- Ciolek, J. *et al.*, 2017. Green mamba peptide targets type-2 vasopressin receptor against polycystic kidney disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 114(27), pp.7154–7159.
- Cisbio, cAMP - Gs assay kits, Assays principle. Available at: <http://www.cisbio.com/drug-discovery/camp-gs-assay-kits> [Accessed September 3, 2017a].
- Cisbio, HTRF ® theory in brief. In *PRODUCT AND SERVICES CATALOG*. pp. 3–8.
- Conner, M. *et al.*, 2007. Systematic analysis of the entire second extracellular loop of the V1a vasopressin receptor: Key residues, conserved throughout a G-protein-coupled receptor family, identified. *Journal of Biological Chemistry*, 282(24), pp.17405–17412.
- Cornec-Le Gall, E. *et al.*, 2013. Type of PKD1 mutation influences renal outcome in ADPKD. *Journal of the American Society of Nephrology*, 24(6), pp.1006–1013.
- Cotte, N. *et al.*, 1998. Identification of residues responsible for the selective binding of peptide antagonists and agonists in the V2 vasopressin receptor. *Journal of Biological Chemistry*, 273(45), pp.29462–29468.
- Crooks, G.E. *et al.*, 2004. WebLogo: a sequence logo generator. *Genome research*, 14(6), pp.1188–1190.
- Cruz, L.J. *et al.*, 1987. Invertebrate vasopressin/oxytocin homologs. Characterization of peptides from *Conus geographus* and *Conus straitus* venoms. *Journal of Biological Chemistry*, 262(33), pp.15821–15824.
- Czapinska, H. *et al.*, 2000. High-resolution structure of bovine pancreatic trypsin inhibitor with altered binding loop sequence. *Journal of molecular biology*, 295(5), pp.1237–1249.

- Delfin, J. *et al.*, 1996. Purification, characterization and immobilization of proteinase inhibitors from *Stichodactyla helianthus*. *Toxicon*, 34(11–12), pp.1367–1376.
- Delmas, P. *et al.*, 2002. Constitutive activation of G-proteins by polycystin-1 is antagonized by polycystin-2. *Journal of Biological Chemistry*, 277(13), pp.11276–11283.
- Delmas, P. *et al.*, 2004. Gating of the polycystin ion channel signaling complex in neurons and kidney cells. *The FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 18(6), pp.740–742.
- Delort, B. *et al.*, 2017. Coarse-Grained Prediction of Peptide Binding to G-Protein Coupled Receptors. *Journal of chemical information and modeling*, 57(3), pp.562–571.
- Department of Human Genetics RWTH Aachen University, Mutation Database Autosomal Recessive Polycystic Kidney Disease (ARPKD/PKHD1). Available at: <http://www.humgen.rwth-aachen.de> [Accessed July 18, 2017].
- Dere, R. *et al.*, 2010. Carboxy terminal tail of polycystin-1 regulates localization of TSC2 to repress mTOR. *PloS one*, 5(2), p.e9239.
- DiGiovanni, S.R. *et al.*, 1994. Regulation of collecting duct water channel expression by vasopressin in Brattleboro rat. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 91(19), pp.8984–8988.
- Doorty, K.B. *et al.*, 1997. A novel small conductance Ca²⁺-activated K⁺ channel blocker from *Oxyuranus scutellatus* taipan venom. Re-evaluation of taicatoxin as a selective Ca²⁺ channel probe. *The Journal of biological chemistry*, 272(32), pp.19925–19930.
- Duc, N.M., Kim, H.R. & Chung, K.Y., 2015. Structural mechanism of G protein activation by G protein-coupled receptor. *European Journal of Pharmacology*, 763, pp.214–222.
- Eceder, T. & Schrier, R.W., 2009. Cardiovascular abnormalities in autosomal-dominant polycystic kidney disease. *Nature reviews. Nephrology*, 5(4), pp.221–228.
- Eckhard, A. *et al.*, 2012. Water channel proteins in the inner ear and their link to hearing impairment and deafness. *Molecular aspects of medicine*, 33(5–6), pp.612–637.
- Egloff, P. *et al.*, 2014. Structure of signaling-competent neurotensin receptor 1 obtained by directed evolution in *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111(6), pp.E655–662.
- FDA, 2009. *SAMSCA™ (tolvaptan) tablets for oral use Initial U.S. Approval: 05/2009*, United States of America.
- Feinstein, T.N. *et al.*, 2013. Noncanonical control of vasopressin receptor type 2 signaling by retromer and arrestin. *The Journal of biological chemistry*, 288(39), pp.27849–27860.
- Fergusson, D.A. *et al.*, 2008. A comparison of aprotinin and lysine analogues in high-risk cardiac surgery. *The New England journal of medicine*, 358(22), pp.2319–2331.
- Flock, T. *et al.*, 2015. Universal allosteric mechanism for G α activation by GPCRs. *Nature*, 524(7564), pp.173–179.
- Foggensteiner, L. *et al.*, 2000. Cellular and subcellular distribution of polycystin-2, the protein product of the PKD2 gene. *Journal of the American Society of Nephrology*, 11(5), pp.814–827.
- Fredriksson, R. *et al.*, 2003. The G-protein-coupled receptors in the human genome form

- five main families. Phylogenetic analysis, paralogon groups, and fingerprints. *Molecular pharmacology*, 63(6), pp.1256–1272.
- Fry, B.G., 2005. From genome to "venome"; molecular origin and evolution of the snake venom proteome inferred from phylogenetic analysis of toxin sequences and related body proteins. *Genome research*, 15(3), pp.403–420.
- Fry, B.G., 2015. *Venomous reptiles and their toxins* B. G. Fry, ed., Oxford: Oxford University Press.
- Fry, B.G. & Wüster, W., 2004. Assembling an Arsenal: Origin and Evolution of the Snake Venom Proteome Inferred from Phylogenetic Analysis of Toxin Sequences. *Molecular Biology and Evolution*, 21(5), pp.870–883.
- Furukawa, M. *et al.*, 2014. Liquid chromatography–tandem mass spectrometry method for determining tolvaptan and its nine metabolites in rat serum: application to a pharmacokinetic study. *Archives of pharmacal research*, 37(12), pp.1578–1587.
- García-Fernández, R. *et al.*, 2016. The kunitz-type protein ShPI-1 inhibits serine proteases and voltage-gated potassium channels. *Toxins*, 8(4), pp.1–17.
- Garcia-Gonzalez, M.A. *et al.*, 2007. Genetic interaction studies link autosomal dominant and recessive polycystic kidney disease in a common pathway. *Human molecular genetics*, 16(16), pp.1940–1950.
- Gasparini, S. *et al.*, 1998. Delineation of the functional site of α -dendrotoxin. *Journal of Biological Chemistry*, 273(39), pp.25393–25403.
- Gasteiger, E. *et al.*, 2005. Protein Identification and Analysis Tools on the ExPASy Server. In *The Proteomics Protocols Handbook*. Humana Press, pp. 571–607.
- Gattone, V.H. *et al.*, 2003. Inhibition of renal cystic disease development and progression by a vasopressin V2 receptor antagonist. *Nature medicine*, 9(10), pp.1323–1326.
- Geng, L. *et al.*, 1996. Identification and localization of polycystin, the PKD1 gene product. *Journal of Clinical Investigation*, 98(12), pp.2674–2682.
- Gilquin, B. *et al.*, 1999. Conformational and functional variability supported by the BPTI fold: Solution structure of the Ca²⁺ channel blocker calcicludine. *Proteins: Structure, Function and Genetics*, 34(4), pp.520–532.
- Gimpl, G. & Fahrenholz, F., 2001. The oxytocin receptor system: structure, function, and regulation. *Physiological reviews*, 81(2), pp.629–83.
- Gladkikh, I. *et al.*, 2015. New kunitz-type HCRG polypeptides from the sea anemone *heteractis crispa*. *Marine Drugs*, 13(10), pp.6038–6063.
- Goilav, B., 2011. Apoptosis in polycystic kidney disease. *Biochimica et biophysica acta*, 1812(10), pp.1272–1280.
- González-Perrett, S. *et al.*, 2001. Polycystin-2, the protein mutated in autosomal dominant polycystic kidney disease (ADPKD), is a Ca²⁺-permeable nonselective cation channel. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(3), pp.1182–1187.
- Granier, S. *et al.*, 2004. A cyclic peptide mimicking the third intracellular loop of the V 2 vasopressin receptor inhibits signaling through its interaction with receptor dimer and G protein. *Journal of Biological Chemistry*, 279(49), pp.50904–50914.
- Greenberg, A. & Verbalis, J.G., 2006. Vasopressin receptor antagonists. *Kidney international*, 69(12), pp.2124–2130.

- Griffin, M.D. *et al.*, 1997. Vascular expression of polycystin. *Journal of the American Society of Nephrology*, 8(4), pp.616–26.
- Guan, K.L. *et al.*, 2000. Negative regulation of the serine/threonine kinase B-Raf by Akt. *Journal of Biological Chemistry*, 275(35), pp.27354–27359.
- Guénard, H., 2009. *Physiologie humaine* 1ère. Pradel, ed.,
- Gunay-Aygun, M. *et al.*, 2006. Autosomal recessive polycystic kidney disease and congenital hepatic fibrosis: summary statement of a first National Institutes of Health/Office of Rare Diseases conference. *The Journal of pediatrics*, 149(2), pp.159–164.
- Gund, P., 1977. Three-Dimensional Pharmacophoric Pattern Searching. *Progress in Molecular and Subcellular Biology.*, 5, p.117.
- Hanaoka, K. *et al.*, 2000. Co-assembly of polycystin-1 and -2 produces unique cation-permeable currents. *Nature*, 408, pp.990–994.
- Hanson, W.M. *et al.*, 2003. Identification of a residue critical for maintaining the functional conformation of BPTI. *Journal of Molecular Biology*, 333(2), pp.425–441.
- Hargreaves, A.D. *et al.*, 2014. Restriction and recruitment-gene duplication and the origin and evolution of snake venom toxins. *Genome Biology and Evolution*, 6(8), pp.2088–2095.
- Harris, P.C. & Torres, V.E., 2009. Polycystic kidney disease. *Annual review of medicine*, 60(60), pp.321–337.
- Harvey, A.L. & Karlsson, E., 1980. Dendrotoxin from the Venom of the Green Mamba, *Dendroaspis angusticeps*: A Neurotoxin that Enhances Acetylcholine Release at Neuromuscular Junctions. *NaunynSchmiedebergs archives of pharmacology*, 312(1), pp.1–6.
- Hasler, U. *et al.*, 2002. Long term regulation of aquaporin-2 expression in vasopressin-responsive renal collecting duct principal cells. *The Journal of biological chemistry*, 277(12), pp.10379–10386.
- Haute Autorité de Santé, 2016. Avis de la commission de transparence sur le Jinarc. *Direction de l'Évaluation médicale, Économique et de Santé Publique*. Available at: https://www.has-sante.fr/portail/jcms/c_2589169/fr/jinarc-tolvaptan-antagoniste-de-la-vasopressine [Accessed July 11, 2017].
- Haute Autorité de Santé, 2012. *Diagnostic de l'insuffisance rénale chronique*,
- Haute Autorité de Santé, 2005. *Prise en charge des patients adultes atteints d'hypertension artérielle essentielle - Recommandations*,
- Hua, T. *et al.*, 2017. Crystal structures of agonist-bound human cannabinoid receptor CB1. *Nature*, 547(7664), pp.468–471.
- Huang, W. *et al.*, 2015. Structural insights into μ -opioid receptor activation. *Nature*, 524(7565), pp.315–321.
- Huber, R. *et al.*, 1970. The basic trypsin inhibitor of bovine pancreas. I. Structure analysis and conformation of the polypeptide chain. *Die Naturwissenschaften*, 57(8), pp.389–392.
- Hughes, J. *et al.*, 1995. The polycystic kidney disease 1 (PKD1) gene encodes a novel protein with multiple cell recognition domains. *Nature genetics*, 10(2), pp.151–160.
- Hus-Citharel, A. *et al.*, 2014. Apelin counteracts vasopressin-induced water reabsorption

- via cross talk between apelin and vasopressin receptor signaling pathways in the rat collecting duct. *Endocrinology*, 155(11), pp.4483–4493.
- Ibraghimov-Beskrovnaya, O. *et al.*, 1997. Polycystin: in vitro synthesis, in vivo tissue expression, and subcellular localization identifies a large membrane-associated protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94(12), pp.6397–6402.
- Inagaki, H. *et al.*, 2012. Functional characterization of Kunitz-type protease inhibitor Pr-mulgins identified from New Guinean *Pseudechis australis*. *Toxicon*, 59(1), pp.74–80.
- Innamorati, G. *et al.*, 1997. Phosphorylation of the V2 vasopressin receptor. *Journal of Biological Chemistry*, 272(4), pp.2486–2492.
- Irazabal, M. V. & Torres, V.E., 2013. Experimental Therapies and Ongoing Clinical Trials to Slow Down Progression of ADPKD. *Current Hypertensive review*, 9(1), pp.44–59.
- Jolkkonen, M. *et al.*, 1995. A snake toxin against muscarinic acetylcholine receptors: Amino acid sequence, subtype specificity and effect on guinea-pig ileum. *Toxicon*, 33(4), pp.399–410.
- Juul, K.V. *et al.*, 2014. The physiological and pathophysiological functions of renal and extrarenal vasopressin V2 receptors. *American journal of physiology. Renal physiology*, 306(9), pp.F931-940.
- Kamsteeg, E.-J. *et al.*, 2006. Short-chain ubiquitination mediates the regulated endocytosis of the aquaporin-2 water channel. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(48), pp.18344–18349.
- Kanno, K. *et al.*, 1995. Urinary excretion of aquaporin-2 in patients with diabetes insipidus. *The New England journal of medicine*, 332(23), pp.1540–1545.
- Katritch, V., Cherezov, V. & Stevens, R.C., 2013. Structure-function of the G protein-coupled receptor superfamily. *Annual review of pharmacology and toxicology*, 53, pp.531–556.
- Kaufmann, J.E. *et al.*, 2000. Vasopressin-induced von Willebrand factor secretion from endothelial cells involves V2 receptors and cAMP. *The Journal of clinical investigation*, 106(1), pp.107–116.
- Kessler, P. *et al.*, 2017. The three-finger toxin fold: a multifunctional structural scaffold able to modulate cholinergic functions. *Journal of Neurochemistry*, 142, pp.7–18.
- Khan, S.M. *et al.*, 2013. The Expanding Roles of G Subunits in G Protein-Coupled Receptor Signaling and Drug Action. *Pharmacological Reviews*, 65(2), pp.545–577.
- Kim, I. *et al.*, 2008. Fibrocystin/polyductin modulates renal tubular formation by regulating polycystin-2 expression and function. *Journal of the American Society of Nephrology*, 19(3), pp.455–468.
- Kim, S.R. *et al.*, 2011. Pharmacokinetics, pharmacodynamics and safety of tolvaptan, a novel, oral, selective nonpeptide AVP V2-receptor antagonist: results of single- and multiple-dose studies in healthy Japanese male volunteers. *Cardiovascular drugs and therapy*, 25 Suppl 1, pp.S5-17.
- King, G.F. *et al.*, 2008. A rational nomenclature for naming peptide toxins from spiders and other venomous animals. *Toxicon*, 52(2), pp.264–276.
- King, G.F., 2011. Venoms as a platform for human drugs: translating toxins into therapeutics. *Expert Opinion on Biological Therapy*, 11(11), pp.1469–1484.

- Kloog, Y. *et al.*, 1988. Sarafotoxin, a novel vasoconstrictor peptide: phosphoinositide hydrolysis in rat heart and brain. *Science (New York, N.Y.)*, 242(4876), pp.268–270.
- Kobilka, B.K., 2007. G protein coupled receptor structure and activation. *Biochimica et biophysica acta*, 1768(4), pp.794–807.
- Kondo, K. *et al.*, 1999. 7-Chloro-5-hydroxy-1-[2-methyl-4-(2-methylbenzoylamino)benzoyl]-2,3,4,5-tetrahydro-1H-1-benzazepine (OPC-41061): a potent, orally active nonpeptide arginine vasopressin V2 receptor antagonist. *Bioorganic & medicinal chemistry*, 7(8), pp.1743–1754.
- Koshimizu, T. *et al.*, 2012. Vasopressin V1a and V1b receptors: from molecules to physiological systems. *Physiological reviews*, 92(4), pp.1813–1864.
- Koster, A., Faraoni, D. & Levy, J.H., 2015. Antifibrinolytic Therapy for Cardiac Surgery: An Update. *Anesthesiology*, 123(1), pp.214–221.
- Köttgen, M., 2007. TRPP2 and autosomal dominant polycystic kidney disease. *Biochimica et biophysica acta*, 1772(8), pp.836–850.
- Krumm, B.E. & Grisshammer, R., 2015. Peptide ligand recognition by G protein-coupled receptors. *Frontiers in Pharmacology*, 6(MAR), pp.1–6.
- Kunitz, M. & Northrop, J.H., 1936. Isolation From Beef Pancreas of Crystalline Trypsinogen, Trypsin, a Trypsin Inhibitor, and an Inhibitor-Trypsin Compound. *The Journal of general physiology*, 19(6), pp.991–1007.
- Kwong, P.D. *et al.*, 1995. Structure of β 2-bungarotoxin: potassium channel binding by Kunitz modules and targeted phospholipase action. *Structure*, 3(10), pp.1109–1119.
- Lager, D.J. *et al.*, 2001. The pck rat: A new model that resembles human autosomal dominant polycystic kidney and liver disease. *Kidney International*, 59(1), pp.126–136.
- Lagerström, M.C. & Schiöth, H.B., 2008. Structural diversity of G protein-coupled receptors and significance for drug discovery. *Nature reviews. Drug discovery*, 7(4), pp.339–357.
- Lee, K., Battini, L. & Gusella, G.L., 2011. Cilium, Centrosome and Cell Cycle Regulation in Polycystic Kidneys Disease. *Biochimica et biophysica acta*, 1812(10), pp.1263–1271.
- Leuenroth, S.J. *et al.*, 2008. Triptolide reduces cystogenesis in a model of ADPKD. *Journal of the American Society of Nephrology*, 19(9), pp.1659–1662.
- Li, M. *et al.*, 2001. Identification of two prokineticin cDNAs: recombinant proteins potently contract gastrointestinal smooth muscle. *Molecular pharmacology*, 59(4), pp.692–698.
- Li, X. *et al.*, 2005. Polycystin-1 and polycystin-2 regulate the cell cycle through the helix – loop – helix inhibitor Id2. *Nature Cell Biology*, 7(12), pp.1202–1212.
- Loghman-Adham, M. *et al.*, 2004. The intrarenal renin-angiotensin system in autosomal dominant polycystic kidney disease. *American journal of physiology. Renal physiology*, 287(4), pp.F775–788.
- Low, S.H. *et al.*, 2006. Polycystin-1, STAT6, and P100 function in a pathway that transduces ciliary mechanosensation and is activated in polycystic kidney disease. *Developmental cell*, 10(1), pp.57–69.
- Luttrell, L.M. & Lefkowitz, R.J., 2002. The role of β -arrestins in the termination and transduction of G-protein-coupled receptor signals. *Journal of cell science*, 115(Pt 3),

- pp.455–465.
- Lutz, W. *et al.*, 1990. Internalization of vasopressin analogs in kidney and smooth muscle cells: evidence for receptor-mediated endocytosis in cells with V2 or V1 receptors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 87(17), pp.6507–6511.
- Maciejewski, R. *et al.*, 2005. Selected biochemical parameters and ultrastructural picture of pancreas due to Ulinastatin treatment of experimental acute pancreatitis. *Experimental and Toxicologic Pathology*, 56(4–5), pp.305–311.
- Maïga, A. *et al.*, 2013. Crystallization of recombinant green mamba ρ -Dala toxin during a lyophilization procedure and its structure determination. *Acta crystallographica. Section F, Structural biology and crystallization communications*, 69(Pt 6), pp.704–709.
- Manglik, A. *et al.*, 2012. Crystal structure of the μ -opioid receptor bound to a morphinan antagonist. *Nature*, 485(7398), pp.321–326.
- Marieb, E.N. & Hoehn, K., 2010. *Human Anatomy and Physiology* 8th ed., Pearson Education, Inc.
- Massotte, D. & Kieffer, B.L., 2005. The second extracellular loop: a damper for G protein-coupled receptors? *Nature structural & molecular biology*, 12(4), pp.287–288.
- McCubrey, J.A. *et al.*, 2007. Roles of the Raf/MEK/ERK pathway in cell growth, malignant transformation and drug resistance. *Biochimica et biophysica acta*, 1773(8), pp.1263–1284.
- Mekahli, D. *et al.*, 2014. Polycystin-1 but not polycystin-2 deficiency causes upregulation of the mTOR pathway and can be synergistically targeted with rapamycin and metformin. *Pflugers Archiv European Journal of Physiology*, 466(8), pp.1591–1604.
- Menezes, L. *et al.*, 2004. Polyductin, the PKHD1 gene product, comprises isoforms expressed in plasma membrane, primary cilium, and cytoplasm. *Kidney international*, 66, pp.1345–1355.
- Miller, R.L. *et al.*, 2013. Vasopressin inhibits apoptosis in renal collecting duct cells. *American journal of physiology. Renal physiology*, 304(2), pp.F177-188.
- Millers, E.-K.I. *et al.*, 2009. Crystal structure of textilinin-1, a Kunitz-type serine protease inhibitor from the venom of the Australian common brown snake (*Pseudonaja textilis*). *The FEBS journal*, 276(11), pp.3163–3175.
- Ministère de la Santé, 2009. Les maladies rares. Available at: <http://www.sante.gouv.fr/les-maladies-rares-qu-est-ce-que-c-est.html> [Accessed January 19, 2015].
- Miyazaki, T. *et al.*, 2007. Tolvaptan, an orally active vasopressin V(2)-receptor antagonist - pharmacology and clinical trials. *Cardiovascular drug reviews*, 25(1), pp.1–13.
- Mochizuki, T. *et al.*, 1996. PKD2, a gene for polycystic kidney disease that encodes an integral membrane protein. *Science*, 272(5266), pp.1339–1342.
- Morgenthaler, N.G., 2010. Copeptin: a biomarker of cardiovascular and renal function. *Congestive heart failure*, 16 Suppl 1, pp.S37-44.
- Morin, D. *et al.*, 1998. The D136A mutation of the V2 vasopressin receptor induces a constitutive activity which permits discrimination between antagonists with partial agonist and inverse agonist activities. *The FEBS letters*, 441(3), pp.470–475.
- De Mota, N. *et al.*, 2004. Apelin, a potent diuretic neuropeptide counteracting vasopressin

- actions through inhibition of vasopressin neuron activity and vasopressin release. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(28), pp.10464–10469.
- Mouillac, B. *et al.*, 1995. The binding site of neuropeptide vasopressin V1a receptor. Evidence for a major localization within transmembrane regions. *The Journal of biological chemistry*, 270(43), pp.25771–25777.
- Mutig, K. *et al.*, 2007. Vasopressin V2 receptor expression along rat, mouse, and human renal epithelia with focus on TAL. *American journal of physiology. Renal physiology*, 293(4), pp.F1166-1177.
- Nagao, S. *et al.*, 2012. Animal Models for Human Polycystic Kidney Disease. *Experimental Animals*, 61(March), pp.477–488.
- Nauli, S.M. *et al.*, 2003. Polycystins 1 and 2 mediate mechanosensation in the primary cilium of kidney cells. *Nature Genetics*, 33(2), pp.129–137.
- Neves, S.R., Ram, P.T. & Iyengar, R., 2002. G protein pathways. *Science (New York, N.Y.)*, 296(5573), pp.1636–1639.
- Nevoux, J. *et al.*, 2011. Vasopressin, ATP and catecholamines differentially control potassium secretion in inner ear cell line. *The FEBS letters*, 585(17), pp.2703–2708.
- Nielsen, S. *et al.*, 1993. Cellular and subcellular immunolocalization of vasopressin-regulated water channel in rat kidney. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 90(24), pp.11663–11667.
- Nielsen, S. *et al.*, 1995. Vasopressin increases water permeability of kidney collecting duct by inducing translocation of aquaporin-CD water channels to plasma membrane. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92(4), pp.1013–1017.
- Niezborala, C., 2008. *Une nouvelle technique de mesure du dichroïsme circulaire : premiers pas vers l'étude du repliement de polypeptides modèles*. Ecole polytechnique.
- Nishimoto, G. *et al.*, 1999. Arginine vasopressin stimulates phosphorylation of aquaporin-2 in rat renal tissue. *American journal of physiology*, 276(2 Pt 2), pp.F254-259.
- North, W.G., 2000. Gene regulation of vasopressin and vasopressin receptors in cancer. *Experimental physiology*, 85(Spec No), p.27S–40S.
- O'Hayre, M., Degese, M.S. & Gutkind, J.S., 2014. Novel insights into G protein and G protein-coupled receptor signaling in cancer. *Current opinion in cell biology*, 27, pp.126–135.
- Oakley, R.H. *et al.*, 2000. Differential affinities of visual arrestin, beta arrestin1, and beta arrestin2 for G protein-coupled receptors delineate two major classes of receptors. *The Journal of biological chemistry*, 275(22), pp.17201–17210.
- Oldham, W.M. & Hamm, H.E., 2008. Heterotrimeric G protein activation by G-protein-coupled receptors. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 9(1), pp.60–71.
- Oligny-Longpré, G. *et al.*, 2012. Engagement of β -arrestin by transactivated insulin-like growth factor receptor is needed for V2 vasopressin receptor-stimulated ERK1/2 activation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(17), pp.E1028–E1037.
- Oliver, G. & Schafer, E.A., 1895. On the Physiological Action of Extracts of Pituitary Body

- and certain other Glandular Organs: Preliminary Communication. *The Journal of Physiology*, 18, pp.277–279.
- Onuchic, L.F. *et al.*, 2002. PKHD1 , the Polycystic Kidney and Hepatic Disease 1 Gene, Encodes a Novel Large Protein Containing Multiple Immunoglobulin-Like Plexin-Transcription – Factor Domains and Parallel Beta-Helix 1 Repeats. *American journal of human genetics*, 70(5), pp.1305–1317.
- Orellana, S.A. *et al.*, 1995. Epidermal growth factor receptor expression is abnormal in murine polycystic kidney. *Kidney international*, 47(2), pp.446–457.
- Paesen, G.C. *et al.*, 2009. An Ion-channel Modulator from the Saliva of the Brown Ear Tick has a Highly Modified Kunitz/BPTI Structure. *Journal of Molecular Biology*, 389(4), pp.734–747.
- Palczewski, K. *et al.*, 2000. Crystal structure of rhodopsin: A G protein-coupled receptor. *Science (New York, N.Y.)*, 289(5480), pp.739–745.
- Parnell, S.C. *et al.*, 1998. The Polycystic Kidney Disease-1 protein, Polycystin-1, binds and activates heterotrimeric G-proteins in vitro. *Biochemical and biophysical research communications*, 251, pp.625–631.
- Patch, C. *et al.*, 2011. Use of antihypertensive medications and mortality of patients with autosomal dominant polycystic kidney disease: a population-based study. *American journal of kidney diseases: the official journal of the National Kidney Foundation*, 57(6), pp.856–862.
- Paul, B.M. *et al.*, 2014. Evidence of a third ADPKD locus is not supported by reanalysis of designated PKD3 families. *Kidney international*, 85(2), pp.383–392.
- Pei, Y. *et al.*, 1999. Somatic PKD2 Mutations in Individual Kidney and Liver Cysts Support a “Two-Hit ” Model of Cystogenesis in Type 2 Autosomal Dominant Polycystic Kidney Disease. *Journal of the American Society of Nephrology*, 10(7), pp.1524–1529.
- Peigneur, S. *et al.*, 2011. A bifunctional sea anemone peptide with Kunitz type protease and potassium channel inhibiting properties. *Biochemical Pharmacology*, 82(1), pp.81–90.
- Peri, A., 2013. The use of vaptans in clinical endocrinology. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 98(4), pp.1321–1332.
- Petrel, C. *et al.*, 2013. Identification, structural and pharmacological characterization of τ -CnVA, a conopeptide that selectively interacts with somatostatin sst 3 receptor. *Biochemical Pharmacology*, 85(11), pp.1663–1671.
- St. Pierre, L. *et al.*, 2008. Common evolution of waprin and kunitz-like toxin families in Australian venomous snakes. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 65(24), pp.4039–4054.
- Pisitkun, T., Shen, R.-F. & Knepper, M.A., 2004. Identification and proteomic profiling of exosomes in human urine. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(36), pp.13368–13373.
- PKD Foundation Web Site, 2017. Autosomal Dominant Polycystic Kidney Disease: Mutation Database. Available at: <http://pkdb.pkdcure.org> [Accessed July 18, 2017].
- Possani, L.D. *et al.*, 1992. Isolation and physiological characterization of taicatoxin, a complex toxin with specific effects on calcium channels. *Toxicon*, 30(11), pp.1343–1364.

- Praetorius, H.A. & Spring, K.R., 2001. Bending the MDCK cell primary cilium increases intracellular calcium. *Journal of Membrane Biology*, 184(1), pp.71–79.
- Qian, F. *et al.*, 1997. PKD1 interacts with PKD2 through a probable coiled-coil domain. *Nature Genetics*, 16(2), pp.179–183.
- Qian, F. *et al.*, 1996. The Molecular Basis of Focal Cyst Formation in Human Autosomal Dominant Polycystic Kidney Disease Type I. *Cell*, 87(6), pp.979–987.
- Qian, F. & Watnick, T.J., 1999. Somatic Mutation as Mechanism for Cyst Formation in Autosomal Dominant Polycystic Kidney Disease. *Molecular genetics and metabolism*, 68(2), pp.237–242.
- Ranasinghe, S. & McManus, D.P., 2013. Structure and function of invertebrate Kunitz serine protease inhibitors. *Developmental and Comparative Immunology*, 39(3), pp.219–227.
- Rasmussen, S.G.F., DeVree, B.T., *et al.*, 2011. Crystal structure of the β_2 adrenergic receptor-Gs protein complex. *Nature*, 477(7366), pp.549–555.
- Rasmussen, S.G.F., Choi, H., *et al.*, 2011. Structure of a Nanobody-Stabilized Active State of the Beta2 Adrenoceptor. *Nature*, 469(7329), pp.175–180.
- Rawlings, N.D., Barrett, A.J. & Finn, R., 2016. Twenty years of the MEROPS database of proteolytic enzymes, their substrates and inhibitors. *Nucleic Acids Research*, 44(D1), pp.D343–D350.
- Rice, P., Longden, I. & Bleasby, A., 2000. EMBOSS: the European Molecular Biology Open Software Suite. *Trends in genetics*, 16(6), pp.276–277.
- Richards, W.G. *et al.*, 1998. Epidermal growth factor receptor activity mediates renal cyst formation in polycystic kidney disease. *The Journal of clinical investigation*, 101(5), pp.935–9.
- Rodrigo, J. *et al.*, 2007. Mapping the binding site of arginine vasopressin to V1a and V1b vasopressin receptors. *Molecular endocrinology (Baltimore, Md.)*, 21(2), pp.512–523.
- Rossetti, S. *et al.*, 2007. Comprehensive molecular diagnostics in autosomal dominant polycystic kidney disease. *Journal of the American Society of Nephrology*, 18(7), pp.2143–2160.
- Rouget, C. *et al.*, 2010. Identification of a novel snake peptide toxin displaying high affinity and antagonist behaviour for the α_2 -adrenoceptors. *British journal of pharmacology*, 161(6), pp.1361–1374.
- Saleh, N. *et al.*, 2016. A Three-Site Mechanism for Agonist/Antagonist Selective Binding to Vasopressin Receptors. *Angewandte Chemie - International Edition*, 55(28), pp.8008–8012.
- Salvadori, M. & Tsalouchos, A., 2017. Novel Therapeutic Strategies Targeting Molecular Pathways of Cystogenesis in Autosomal Polycystic Kidney Disease. *Journal of Renal and Hepatic Disorders*, 1(1), pp.35–49.
- Sammels, E. *et al.*, 2010. Polycystin-2 activation by inositol 1,4,5-trisphosphate-induced Ca^{2+} release requires its direct association with the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor in a signaling microdomain. *The Journal of biological chemistry*, 285(24), pp.18794–18805.
- Sánchez-Fernández, G. *et al.*, 2014. G α_q signalling: The new and the old. *Cellular Signalling*, 26(5), pp.833–848.

- Sandford, R. *et al.*, 1997. Comparative analysis of the polycystic kidney disease 1 (PKD1) gene reveals an integral membrane glycoprotein with multiple evolutionary conserved domains. *Human Molecular Genetics*, 6(9), pp.1483–1489.
- Schechter, I. & Berger, A., 1967. On the size of the active site in proteases. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 27(2), pp.157–162.
- Schulz, A. *et al.*, 2000. Structural implication for receptor oligomerization from functional reconstitution studies of mutant V2 vasopressin receptors. *Journal of Biological Chemistry*, 275(4), pp.2381–2389.
- Schweitz, H. *et al.*, 1994. Calcicludine, a venom peptide of the Kunitz-type protease inhibitor family, is a potent blocker of high-threshold Ca²⁺ channels with a high affinity for L-type channels in cerebellar granule neurons. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 91(3), pp.878–882.
- Schweitz, H. *et al.*, 1995. Kalicludines and kaliseptine. Two different classes of sea anemone toxins for voltage sensitive K⁺ channels. *The Journal of biological chemistry*, 270(42), pp.25121–25126.
- Schweitz, H. *et al.*, 1999. MIT(1), a black mamba toxin with a new and highly potent activity on intestinal contraction. *The FEBS letters*, 461(3), pp.183–188.
- Serra, A.L. *et al.*, 2010. Sirolimus and Kidney Growth in Autosomal Dominant Polycystic Kidney Disease. *New England Journal of Medicine*, 363(9), pp.820–829.
- Serradeil-Le Gal, C., 2001. An overview of SR121463, a selective non-peptide vasopressin V(2) receptor antagonist. *Cardiovascular drug reviews*, 19(3), pp.201–214.
- Shafqat, J., Zaidi, Z.H. & Jörnvall, H., 1990. Purification and characterization of a chymotrypsin Kunitz inhibitor type of polypeptide from the venom of cobra (*Naja naja naja*). *The FEBS letters*, 275(1–2), pp.6–8.
- Sharpe, I.A. *et al.*, 2003. Allosteric α 1-Adrenoreceptor Antagonism by the Conopeptide rho-TIA. *Journal of Biological Chemistry*, 278(36), pp.34451–34457.
- Shenoy, S.K. & Lefkowitz, R.J., 2011. B-Arrestin-Mediated Receptor Trafficking and Signal Transduction. *Trends in Pharmacological Sciences*, 32(9), pp.521–533.
- Shihoya, W. *et al.*, 2016. Activation mechanism of endothelin ETB receptor by endothelin-1. *Nature*, 537(7620), pp.363–368.
- Shillingford, J.M. *et al.*, 2006. The mTOR pathway is regulated by polycystin-1, and its inhibition reverses renal cystogenesis in polycystic kidney disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(14), pp.5466–71.
- Shoaf, S.E. *et al.*, 2007. Pharmacokinetics, pharmacodynamics, and safety of tolvaptan, a nonpeptide AVP antagonist, during ascending single-dose studies in healthy subjects. *Journal of clinical pharmacology*, 47(12), pp.1498–507.
- Shoaf, S.E., Bricmont, P. & Mallikaarjun, S., 2014. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of oral tolvaptan in patients with varying degrees of renal function. *Kidney international*, 85(4), pp.953–961.
- Singla, V. & Reiter, J.F., 2006. The Primary Cilium as the Cell's Antenna: Signaling at a Sensory Organelle. *Science*, 313(5787), pp.629–634.
- Slizgi, J.R. *et al.*, 2016. Inhibition of Human Hepatic Bile Acid Transporters by Tolvaptan and Metabolites: Contributing Factors to Drug-Induced Liver Injury? *Society of Toxicology*, 149(1), pp.237–250.

- Smith, D. *et al.*, 2016. Unexpected activity of a novel kunitz-type inhibitor Inhibition of cysteine proteases but not serine proteases. *Journal of Biological Chemistry*, 291(37), pp.19220–19234.
- Sun, L. *et al.*, 2011. Down-regulation of PKHD1 induces cell apoptosis through PI3K and NF- κ B pathways. *Experimental cell research*, 317(7), pp.932–940.
- Sun, L. *et al.*, 2016. Functions of vasopressin and oxytocin in bone mass regulation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 113(1), pp.164–169.
- Sweeney, W.E. & Avner, E.D., 2006. Molecular and cellular pathophysiology of autosomal recessive polycystic kidney disease (ARPKD). *Cell and tissue research*, 326(3), pp.671–685.
- Sweeney, W.E. & Avner, E.D., 2014. Pathophysiology of childhood polycystic kidney diseases: new insights into disease-specific therapy. *Pediatric research*, 75(1–2), pp.148–157.
- Syrovatkina, V. *et al.*, 2016. Regulation, Signaling, and Physiological Functions of G-Proteins. *Journal of molecular biology*, 428(19), pp.3850–3868.
- Takahashi, K. *et al.*, 2012. V2 vasopressin receptor (V2R) mutations in partial nephrogenic diabetes insipidus highlight protean agonism of V2R antagonists. *Journal of Biological Chemistry*, 287(3), pp.2099–2106.
- Takiar, V. *et al.*, 2011. Activating AMP-activated protein kinase (AMPK) slows renal cystogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(6), pp.2462–2467.
- Takiar, V. & Caplan, M.J., 2011. Polycystic kidney disease: pathogenesis and potential therapies. *Biochimica et biophysica acta*, 1812(10), pp.1337–1343.
- Tamiya, N. & Arai, H., 1966. Studies on sea-snake venoms. Crystallization of erabutoxins a and b from Laticauda semifasciata venom. *The Biochemical journal*, 99(3), pp.624–30.
- Tamma, R. *et al.*, 2013. Regulation of bone remodeling by vasopressin explains the bone loss in hyponatremia. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(46), pp.18644–18649.
- Tenenbaum, J. *et al.*, 2009. The constitutively active V2 receptor mutants conferring NSIAD are weakly sensitive to agonist and antagonist regulation. *PLoS ONE*, 4(12), pp.1–6.
- Terrillon, S. *et al.*, 2003. Oxytocin and vasopressin V1a and V2 receptors form constitutive homo- and heterodimers during biosynthesis. *Molecular endocrinology*, 17(4), pp.677–691.
- Terrillon, S., Barberis, C. & Bouvier, M., 2004. Heterodimerization of V1a and V2 vasopressin receptors determines the interaction with beta-arrestin and their trafficking patterns. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(6), pp.1548–1553.
- The European Polycystic Kidney Disease Consortium, 1994. The Polycystic Kidney Disease 1 Gene Encodes a 14 kb Transcript and Lies within a Duplicated Region on Chromosome 16. *Cell*, 77, pp.881–894.
- The International Polycystic Kidney Disease Consortium, 1995. Polycystic Kidney Disease: The Complete Structure of the PKD1 Gene and Its Protein. *Cell*, 81(2),

- pp.289–298.
- Thomsen, A.R.B. *et al.*, 2016. GPCR-G Protein-beta-Arrestin Super-Complex Mediates Sustained G Protein Signaling. *Cell*, 166(4), pp.907–919.
- Torres, V.E. *et al.*, 2004. Effective treatment of an orthologous model of autosomal dominant polycystic kidney disease. *Nature medicine*, 10(4), pp.363–364.
- Torres, V.E. *et al.*, 2017. Multicenter, open-label, extension trial to evaluate the long-term efficacy and safety of early versus delayed treatment with tolvaptan in autosomal dominant polycystic kidney disease: the TEMPO 4:4 Trial. *Nephrology Dialysis Transplantation*, pp.1–13.
- Torres, V.E. *et al.*, 2012. Tolvaptan in patients with autosomal dominant polycystic kidney disease. *The New England journal of medicine*, 367(25), pp.2407–2418.
- Torres, V.E. *et al.*, 2001. Vascular expression of polycystin-2. *Journal of the American Society of Nephrology*, 12(1), pp.1–9.
- Torres, V.E., 2006. Water for ADPKD? Probably, yes. *Journal of the American Society of Nephrology*, 17(8), pp.2089–2091.
- Torres, V.E. & Harris, P.C., 2007. Polycystic kidney disease: genes, proteins, animal models, disease mechanisms and therapeutic opportunities. *Journal of internal medicine*, 261(1), pp.17–31.
- Torres, V.E., Harris, P.C. & Pirson, Y., 2007. Autosomal dominant polycystic kidney disease. *Lancet*, 369(9569), pp.1287–1301.
- Tsiokas, L. *et al.*, 1997. Homo- and heterodimeric interactions between the gene products of PKD1 and PKD 2. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94, pp.6965–6970.
- Turner, R.A., Pierce, J.G. & du Vigneaud, V., 1951. The purification and the amino acid content of vasopressin preparations. *The Journal of biological chemistry*, 191(1), pp.21–28.
- Venkatakrishnan, A.J. *et al.*, 2016. Diverse activation pathways in class A GPCRs converge near the G-protein-coupling region. *Nature*, 536(7617), pp.484–487.
- Walz, G. *et al.*, 2010. Everolimus in patients with autosomal dominant polycystic kidney disease. *The New England journal of medicine*, 363(9), pp.830–840.
- Wang, S. *et al.*, 2004. The Autosomal Recessive Polycystic Kidney Disease Protein Is Localized to Primary Cilia, with Concentration in the Basal Body Area. *Journal of the American Society of Nephrology*, 15(3), pp.592–602.
- Wang, X. *et al.*, 2005. Effectiveness of vasopressin V2 receptor antagonists OPC-31260 and OPC-41061 on polycystic kidney disease development in the PCK rat. *Journal of the American Society of Nephrology*, 16(4), pp.846–851.
- Wang, X. *et al.*, 2008. Vasopressin directly regulates cyst growth in polycystic kidney disease. *Journal of the American Society of Nephrology*, 19(1), pp.102–108.
- Ward, C.J. *et al.*, 2003. Cellular and subcellular localization of the ARPKD protein; fibrocystin is expressed on primary cilia. *Human molecular genetics*, 12(20), pp.2703–2710.
- Ward, C.J. *et al.*, 2002. The gene mutated in autosomal recessive polycystic kidney disease encodes a large, receptor-like protein. *Nature Genetics*, 30(3), pp.259–269.
- Wegierski, T. *et al.*, 2009. TRPP2 channels regulate apoptosis through the Ca²⁺

- concentration in the endoplasmic reticulum. *The EMBO journal*, 28(5), pp.490–499.
- Wheatley, M. *et al.*, 2012. Lifting the lid on GPCRs: The role of extracellular loops. *British Journal of Pharmacology*, 165(6), pp.1688–1703.
- White, J.F. *et al.*, 2012. Structure of the agonist-bound neurotensin receptor. *Nature*, 490(7421), pp.508–513.
- Widmaier, E., Raff, H. & Strang, K., 2008. *Vander's Human Physiology: the Mechanisms of body function* 11th ed. M. companies Inc., ed., McGraw-Hill companies Inc.
- Williams, A. & Baird, L.G., 2003. DX-88 and HAE: A developmental perspective. *Transfusion and Apheresis Science*, 29(3), pp.255–258.
- Willmott, N. *et al.*, 1995. A novel serine protease inhibitor from the Australian brown snake, *Pseudonaja textilis textilis*: Inhibition kinetics. *Fibrinolysis and Proteolysis*, 9(1), pp.1–8.
- Wilson, J.L.L., Miranda, C.A. & Knepper, M.A., 2013. Vasopressin and the regulation of aquaporin-2. *Clinical and experimental nephrology*, 17(6), pp.751–764.
- Wilson, P.D. *et al.*, 2000. Apical Plasma Membrane Mispolarization of NaK-ATPase in Polycystic Kidney Disease Epithelia Is Associated with Aberrant Expression of the $\beta 2$ Isoform. *The American Journal of Pathology*, 156(1), pp.253–268.
- Wilson, P.D., 2004. Polycystic Kidney Disease. *The New England journal of medicine*, 350(2), pp.151–164.
- Woodhead, J.L. *et al.*, 2017. Application of a mechanistic model to evaluate putative mechanisms of tolvaptan drug-induced liver injury and identify patient susceptibility factors. *Toxicological Sciences*, 155(1), pp.61–74.
- Wu, B. *et al.*, 2010. Structures of the CXCR4 chemokine GPCR with small-molecule and cyclic peptide antagonists. *Science*, 330(6007), pp.1066–1071.
- Wu, H. *et al.*, 2012. Structure of the human kappa opioid receptor in complex with JDTic. *Nature*, 485(7398), pp.327–332.
- Wu, Y. *et al.*, 2006. Kinesin-2 mediates physical and functional interactions between polycystin-2 and fibrocystin. *Human molecular genetics*, 15(22), pp.3280–3292.
- Wüthrich, K., 1989. The development of nuclear magnetic resonance spectroscopy as a technique for protein structure determination. *Accounts of Chemical Research*, 22(1), pp.36–44.
- Xiong, H. *et al.*, 2002. A Novel Gene Encoding a TIG Multiple Domain Protein Is a Positional Candidate for Autosomal Recessive Polycystic Kidney Disease. *Genomics*, 80(1), pp.96–104.
- Xu, Y. *et al.*, 1998. The crystal structure of bikunin from the inter-alpha-inhibitor complex: a serine protease inhibitor with two Kunitz domains. *Journal of molecular biology*, 276(1998), pp.955–966.
- Yamada, T. *et al.*, 1995. AVP inhibits EGF-stimulated MAP kinase cascade in Madin-Darby canine kidney cells. *Kidney international*, 48(3), pp.745–752.
- Yamaguchi, T. *et al.*, 2006. Calcium restores a normal proliferation phenotype in human polycystic kidney disease epithelial cells. *Journal of the American Society of Nephrology*, 17(1), pp.178–187.
- Yamaguchi, T. *et al.*, 2004. Calcium restriction allows cAMP activation of the B-Raf/ERK pathway, switching cells to a cAMP-dependent growth-stimulated phenotype. *The*

- Journal of biological chemistry*, 279(39), pp.40419–40430.
- Yamamura, Y. *et al.*, 1992. Characterization of a novel aquaretic agent, OPC-31260, as an orally effective, nonpeptide vasopressin V2 receptor antagonist. *British journal of pharmacology*, 105(4), pp.787–791.
- Yamamura, Y. *et al.*, 1998. OPC-41061, a highly potent human vasopressin V2-receptor antagonist: pharmacological profile and aquaretic effect by single and multiple oral dosing in rats. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*, 287(3), pp.860–7.
- Yang, J. *et al.*, 2007. PKHD1 Gene Silencing May Cause Cell Abnormal Proliferation through Modulation of Intracellular Calcium in Autosomal Recessive Polycystic Kidney Disease. *Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, 40(4), pp.467–474.
- Yoder, B.K., 2007. Role of primary cilia in the pathogenesis of polycystic kidney disease. *Journal of the American Society of Nephrology*, 18(5), pp.1381–1388.
- Zerres, K. *et al.*, 1996. Autosomal recessive polycystic kidney disease in 115 children: clinical presentation, course and influence of gender. Arbeitsgemeinschaft für Pädiatrische, Nephrologie. *Acta paediatrica (Oslo, Norway: 1992)*, 85(4), pp.437–445.
- Zerres, K. *et al.*, 1994. Mapping of the gene for autosomal recessive polycystic kidney disease (ARPKD) to chromosome 6p21–cen. *Nature Genetics*, 7, pp.429–432.
- Zhang, M.-Z. *et al.*, 2004. PKHD1 protein encoded by the gene for autosomal recessive polycystic kidney disease associates with basal bodies and primary cilia in renal epithelial cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(8), pp.2311–2316.
- Zhang, Z.-R. *et al.*, 2013. TRPP2 and TRPV4 form an EGF-activated calcium permeable channel at the apical membrane of renal collecting duct cells. *PLoS one*, 8(8), pp.1–15.
- Zhao, R. *et al.*, 2011. SdPI, the first functionally characterized Kunitz-type trypsin inhibitor from scorpion venom. *PLoS ONE*, 6(11), p.e27548.
- Zhou, J.X. & Li, X., 2015. Apoptosis in Polycystic Kidney Disease: From Pathogenesis to Treatment. In X. Li, ed. *Polycystic Kidney Disease*. Brisbane (AU): Codon Publication.
- Zhou, X. *et al.*, 2013. Sirtuin 1 inhibition delays cyst formation in autosomal-dominant polycystic kidney disease. *The Journal of Clinical Investigation*, 123(7), pp.3048–3098.
- Zhou, X.-D. *et al.*, 2004. Purification, characterization and primary structure of a chymotrypsin inhibitor from *Naja atra* venom. *Comparative biochemistry and physiology. Part B, Biochemistry & molecular biology*, 137(2), pp.219–224.
- Zupunski, V., Kordis, D. & Gubensek, F., 2003. Adaptive evolution in the snake venom Kunitz/BPTI protein family. *The FEBS letters*, 547(1–3), pp.131–136.

ANNEXE



Green mamba peptide targets type-2 vasopressin receptor against polycystic kidney disease

Justyna Ciolek^{a,1}, Helen Reinfrank^{b,1,2}, Loïc Quinton^c, Say Viengchareun^d, Enrico A. Stura^{a,3}, Laura Vera^{a,3}, Sabrina Sigismeu^a, Bernard Mouillac^a, Hélène Orce l^a, Steve Peigneur^f, Jan Tytgat^f, Laura Droctov e^a, Fabrice Beau^a, Jerome Nevoux^d, Marc Lomb es^d, Gilles Mourier^a, Edwin De Pauw^c, Denis Servent^a, Christiane Mendre^{a,4}, Ralph Witzgall^{b,4}, and Nicolas Gilles^{a,4}

^aService d'Ingénierie Moléculaire des Protéines, Institut des Sciences du Vivant Frédéric Joliot, Commissariat   l'Energie Atomique, Université Paris-Saclay, F-91191 Gif sur Yvette, France; ^bInstitute for Molecular and Cellular Anatomy, University of Regensburg, 93053 Regensburg, Germany; ^cLaboratoire de Spectrométrie de Masse, Unité de Recherche Molecular Systems, Université de Liège, Liège 4000, Belgium; ^dINSERM U1185, Université Paris Sud, Université Paris-Saclay, F-94276, Le Kremlin-Bicêtre, France; ^eInstitut de Génomique Fonctionnelle, CNRS, INSERM, Université Montpellier, F-34094 Montpellier, France; and ^fLaboratory of Toxicology, University of Leuven, Leuven B-3000, Belgium

Edited by David W. Russell, University of Texas Southwestern Medical Center, Dallas, TX, and approved April 13, 2017 (received for review December 17, 2016)

Polycystic kidney diseases (PKDs) are genetic disorders that can cause renal failure and death in children and adults. Lowering cAMP in cystic tissues through the inhibition of the type-2 vasopressin receptor (V2R) constitutes a validated strategy to reduce disease progression. We identified a peptide from green mamba venom that exhibits nanomolar affinity for the V2R without any activity on 155 other G-protein-coupled receptors or on 15 ionic channels. Mambaquaretin-1 is a full antagonist of the V2R activation pathways studied: cAMP production, beta-arrestin interaction, and MAP kinase activity. This peptide adopts the Kunitz fold known to mostly act on potassium channels and serine proteases. Mambaquaretin-1 interacts selectively with the V2R through its first loop, in the same manner that aprotinin inhibits trypsin. Injected in mice, mambaquaretin-1 increases in a dose-dependent manner urine outflow with concomitant reduction of urine osmolality, indicating a purely aquaretic effect associated with the *in vivo* blockade of V2R. CD1-pcy/pcy mice, a juvenile model of PKD, daily treated with 13 µg of mambaquaretin-1 for 99 d, developed less abundant (by 33%) and smaller (by 47%) cysts than control mice. Neither tachyphylaxis nor apparent toxicity has been noted. Mambaquaretin-1 represents a promising therapeutic agent against PKDs.

polycystic kidney disease | Kunitz peptide | snake toxin

Polycystic kidney diseases (PKDs) are potentially life-threatening genetic disorders that are characterized by the presence of multiple fluid-filled cysts in the kidney. In PKDs, cyst formation and enlargement progressively compromise normal renal parenchyma functions and with time severely distort the entire kidney, leading to end-stage renal failure (1). With an estimated prevalence of 1 in 1,000, autosomal-dominant PKD (ADPKD), caused by mutations in either the polycystin-1 or polycystin-2 gene, is one of the most common monogenetic disorders affecting millions of people worldwide (2, 3). Autosomal-recessive PKD caused by mutations in the fibrocystin gene is 20 times less common than ADPKD and affects children in the first year of life with a high mortality rate. No satisfactory therapy for PKDs has yet been developed despite huge efforts for more than 30 y. All of the strategies, from microtubule stabilization with the antitumor drug paclitaxel to the inhibition of either epidermal growth factor receptor or B-Raf, MAPK/ERK, and mTOR kinases have failed to significantly improve the pathological state (4). A key advance in ADPKD treatment has been the observation that in the polycystic kidneys a pathogenic cAMP accumulation stimulates cell proliferation and chloride-driven fluid secretion into cyst lumen (5, 6). The cAMP level can be reduced in two ways: through Gi-protein activation by the somatostatin SSTR2 receptor or, alternatively, through type-2 vasopressin receptor (V2R) inhibition that decreases Gs-protein signaling. Although both strategies appear to be effective in humans and constitute an efficient

therapeutic approach, the use of V2R antagonists has certain advantages (7, 8). Most renal ADPKD cysts develop within the vasopressin-sensitive tubular parts of the nephron, where vasopressin is also the main hormonal regulator of adenylyl cyclase and thus a stimulator of cAMP production. Moreover, increased levels of circulating vasopressin and elevated expression of V2R have been observed in human ADPKD and in animal models. Finally, in contrast to somatostatin receptors, V2R has kidney-specific expression.

Among the orally bio-available vasopressin antagonists, originally licensed for short-term treatment of heart failure and hyponatraemia, tolvaptan has been proved to be beneficial for the long-term treatment of ADPKD in adult patients (9). Tolvaptan is an aquaretic agent that inhibits V2R and reduces cAMP production in principal cells of the collecting tubules (10). In

Significance

Polycystic kidney diseases (PKDs) are genetic disorders in which multiple cysts grow in kidneys, leading to end-stage renal failure. Vasopressin antagonists (vaptans) currently used to treat PKDs have side effects due to liver toxicity. We report the characterization of Mambaquaretin-1, a Kunitz-fold polypeptide isolated from mamba venom that selectively and fully inhibits three major signaling pathways of the vasopressin type-2 receptor. Mambaquaretin-1 induces a purely aquaretic effect on mice and reduces cyst development in a mouse model. We produced mambaquaretin-1 by peptide synthesis and determined its X-ray structure, its binding mode, and functional properties. With high selectivity and without toxic metabolic byproducts associated with its peptidic nature, mambaquaretin-1 could become the preferential treatment for these disorders.

Author contributions: E.A.S., B.M., C.M., R.W., and N.G. designed research; J.C., H.R., L.Q., S.V., E.A.S., L.V., S.S., B.M., H.O., S.P., J.T., L.D., F.B., J.N., M.L., G.M., C.M., R.W., and N.G. performed research; J.C., H.R., L.Q., S.V., E.A.S., L.V., S.S., B.M., H.O., S.P., J.T., L.D., F.B., J.N., M.L., G.M., C.M., R.W., and N.G. analyzed data; and J.C., L.Q., E.A.S., B.M., S.P., J.T., M.L., E.D.P., D.S., C.M., R.W., and N.G. wrote the paper.

The authors declare no conflict of interest.

This article is a PNAS Direct Submission.

Data deposition: The atomic coordinates and structure factors have been deposited in the Protein Data Bank, www.pdb.org (PDB ID code 5M4V).

¹J.C. and H.R. contributed equally to this work.

²Present address: Department of Nephrology, University Hospital of Regensburg, 93053 Regensburg, Germany.

³Present address: Laboratory of Biomolecular Research, Division of Biology and Chemistry, Paul Scherrer Institute, 5232 Villigen, Switzerland.

⁴To whom correspondence may be addressed. Email: Nicolas.gilles@cea.fr, christiane.mendre@igf.cnrs.fr, or Ralph.Witzgall@vki.uni-regensburg.de.

This article contains supporting information online at www.pnas.org/lookup/suppl/doi:10.1073/pnas.1620454114/-DCSupplemental.

a large randomized phase III clinical trial, tolvaptan was found to slow down cyst development and renal insufficiency (8). Since 2014, marketing authorization has been granted in Japan, Canada, and four European countries (France, Germany, the United Kingdom, and Switzerland) and only more recently in the United States, delayed because of concerns regarding its harmful effects on liver function. Indeed, tolvaptan degradation by cytochrome P450 generates hepatotoxic metabolites (9). Additionally, because vaptans bind at a highly conserved orthosteric site, common to all vasopressin-sensitive receptors, they have weak selectivity.

Venoms constitute a reservoir of millions of disulfide-rich peptides, which are biochemically stable with particular pharmacological properties. Due to their high affinity and selectivity, polypeptides derived from venom of different animals are interesting alternatives to small nonpeptidic compounds for drug development (11). Mamba snake venom contains toxins, such as MT7, ρ -Da1b, and ρ -Da1a specific for GPCRs, able to modulate their functions in unique ways. MT7 acts as a negative allosteric modulator of the M1 muscarinic receptor (12), ρ -Da1b is a noncompetitive antagonist of the α 2A-adrenoreceptor (13), and ρ -Da1a is able to antagonize in an insurmountable way the α 1A-adrenoreceptor (14). Marine cone snails are currently the only species known to secrete toxins active on vasopressin receptors. These toxins mimic vasopressin with weak activity against the V1a and V1b receptors (15, 16). Here we report the identification, 3D structure, and properties of mambaquaretin-1 discovered by screening green mamba venom. Mambaquaretin-1 is a highly selective V2R antagonist able to protect against renal cyst development in vivo. For patients with PKD for which tolvaptan is contraindicated, a peptidic drug may represent an interesting alternative.

Results

Mambaquaretin-1 Selectively Interacts with V2R. Mambaquaretin-1 was purified once from the venom of the green mamba (Fig. 1A) by cation exchange and reverse-phase liquid chromatography. The active fraction F from the cation exchange step (Fig. 1B) was subfractionated on a reverse-phase column (Fig. 1C) and fraction D active against V2R was isolated. The final purification step allowed separation of the minor active fraction A (Fig. 1D). The monoisotopic molecular mass of the active polypeptide was 6,367.2 Da and 6,373.2 Da before and after reduction, indicating the presence of three disulfide bridges (Fig. S1). Its sequence of 57 residues was determined by Edman's degradation and mass analysis (Fig. S2 and Table S1). Mambaquaretin-1 was then produced by solid-phase peptide chemical synthesis (Fig. S3 A and E). The synthetic homologue had the same elution time as the toxin isolated from the venom (Fig. 1E) and it was found to bind V2R with the same affinity (data not shown). Synthetic mambaquaretin-1 inhibits tritiated arginine-vasopressin (^3H -AVP) binding to V2R with a K_d of 2.81 nM (pK_d , 8.55 ± 0.25 , Fig. 1F). At concentrations up to 10 μM , no binding could be measured on V1a, V1b, and the oxytocin receptor. At similar high concentrations, mambaquaretin-1 showed moderate activity only for K_v 1.1 subtype but not on other potassium, sodium, or calcium channels (tested on nine K_v and on two Na_v oocyte expressed channel subtypes, Fig. S4, and on rat brain N-type calcium channel, data not shown). Mambaquaretin-1 at 1 μM was inactive on nine cardiac ionic channels and on 155 G-protein-coupled receptors expressed on eukaryotic cells (SI Method 1: Mambaquaretin-1 Identification and data not shown).

Loop 1 of Mambaquaretin-1 Mediates Binding to V2R. Mambaquaretin-1 shares between 49% and 57% of sequence identity with typical Kunitz-fold proteins (Fig. 2) such as α -dendrotoxin (α -DTX) (17, 21), which blocks the potassium channel K_v 1.1 conductivity, and three inhibitors of trypsin activity: aprotinin (22), textilinin-

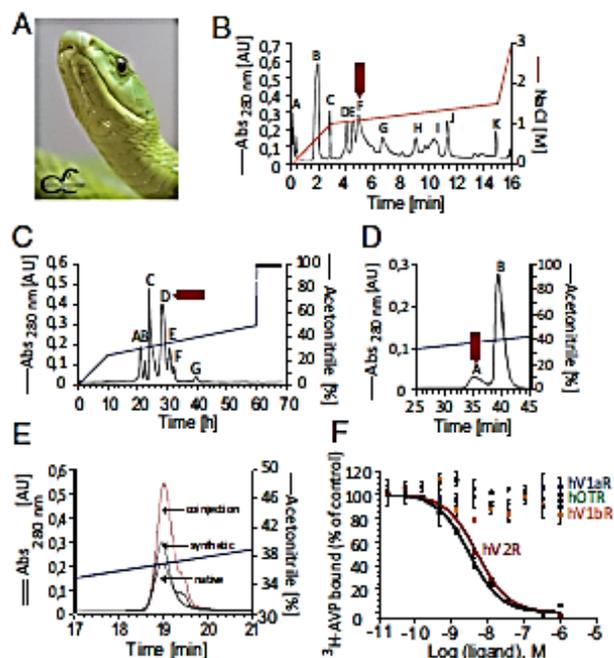


Fig. 1. Identification and characterization of mambaquaretin-1. (A) Green mamba, reproduced with permission from C. Vanbellingen, Alphabiotoxine Laboratory sprl, Belgium. (B) Fractionation of 1 g of *Dendroaspis angusticeps* crude venom by ion-exchange chromatography. (C) Fractionation by reverse-phase chromatography of fraction F. (D) Fractionation by reverse-phase chromatography of fraction D. Arrows indicate active peaks. (E) Coelution between fraction A and synthetic mambaquaretin-1. (F) Binding of ^3H -AVP on V2R, V1aR, V1bR, and Oxytocin R (hOTR) in the presence of mambaquaretin-1 (colored circles) and AVP (black circles). Data represent at least three independent experiments and are presented as mean \pm SD. Abs, absorbance; AU, absorbance unit.

1 (18), and boophilin (20). The molecular strategies used by the α -DTX and the aprotinin to interact with their respective targets are different. α -DTX blocks K_v 1.1 mainly with its lysine in position 5 (21) whereas aprotinin to inhibit trypsin activity uses a dyad of residues composed of a lysine and an alanine (KA) located in its first loop (23). These positions are occupied by a serine (position 3 in mambaquaretin-1; Fig. 2A, orange circle) and by asparagine and glycine (positions 15 and 16 in mambaquaretin-1; Fig. 2A, green circles). Three variants were synthesized to question the strategy used by mambaquaretin-1 to target V2R: S3K, an N-ter truncated version lacking the first four residues, and the N15G16/K15A16 double variant (Fig. S3). The S3K variant and the truncated toxin were found to have the same affinity for V2R (pK_d , 8.87 ± 0.14 and pK_d , 8.84 ± 0.38 , respectively) whereas the NG/KA variant had an affinity 1,000-fold lower than WT (pK_d , 5.50 ± 0.46 ; Fig. 2B). Remarkably, the NG/KA variant inhibited trypsin with nanomolar affinity ($\text{IC}_{50} = 0.77 \pm 0.18$ nM vs. WT: $\text{IC}_{50} = 14.8 \pm 1.1$ μM , Fig. 2C), the S3K variant was found to be more active on K_v 1.1 ($\text{IC}_{50} = 308 \pm 52$ nM vs. WT: $\text{IC}_{50} = 8.2$ μM), and the truncated polypeptide was inactive against K_v 1.1 ($\text{IC}_{50} > 50$ μM , Fig. 2D). Mambaquaretin-1 uses its first loop to interact with V2R, like aprotinin to inhibit trypsin (Fig. 2 B–D). On their own, at concentrations up to 10 μM , neither α -DTX nor aprotinin was found to bind V2R (Fig. 2B). The X-ray structure of mambaquaretin-1 (variant KA) was obtained from crystals diffracting to 1.06 Å resolution (Fig. 2E, SI Method 2: Crystallization and Structure Determination, Table S2, and Fig. S5). The structure is highly compact with

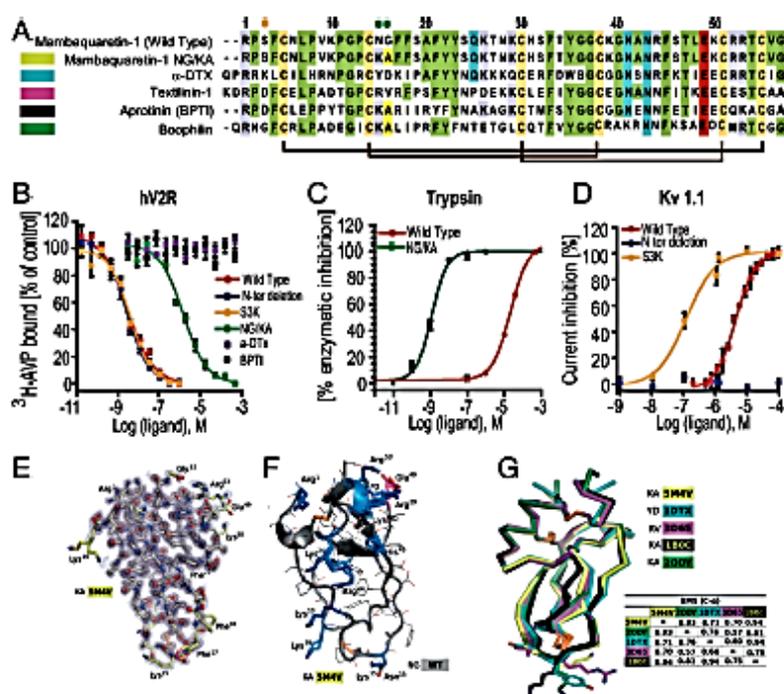


Fig. 2. Mambaquaretin-1 binds V2R with its first loop. (A) Sequence comparison between mambaquaretin-1, its KA variant, α -DTX, Australian common brown snake textilin-1, aprotinin (BPTI), and cattle tick clotting inhibitor boophilin. Cysteines are shaded light green, positively charged residues are shaded blue, negatively charged residues are shaded red, and other conserved residues are shaded gray. Orange and green circles indicate residues critical for α -DTX and BPTI activity, respectively. (B) Binding inhibition of $^3\text{H-AVP}$ on hV2R by mambaquaretin-1, its three variants, BPTI, and α -DTX. (C) Trypsin inhibition by mambaquaretin-1 and its NG/KA variant. (D) Current inhibition of Kv1.1 channels obtained by plotting the percentage of blocked current in function of increasing toxin concentrations by mambaquaretin-1, N-ter deletion, and S3K variant. (E) X-ray structure of mambaquaretin-1 KA in stick representation colored according to β value (light blue to red). (F) Cartoon representation of mambaquaretin-1 and the KA variant showing the preponderance of positively charged residues. (G) Superposition on C- α of mambaquaretin-1 KA (PDB ID: 5M4V), α -DTX [PDB ID: 1DTX (17)], textilin-1 [PDB ID: 3D65 (18)], BPTI [PDB ID: 1B0C (19)], and boophilin [PDB ID: 2ODY (20)] with rmsd between the structures from PyMOL alignment.

extremely low mobility apart from the first loop including the two adjacent Phe residues in positions 17 and 18. A model of WT mambaquaretin-1 can be built from the variant K15A16 by K15N and A16G substitutions with the selection of the closest Asp rotamer to that used by the Lys (Fig. 2F). Mambaquaretin-1 has a large number of positively charged residues distributed throughout the sequence and only two negative ones: the conserved Glu-49 and the C-terminal Gly-57. The backbone of mambaquaretin-1, that of α -DTX, and those of three other serine-protease inhibitors superimpose very well with an rmsd on C- α between 0.57 Å and 0.94 Å (Fig. 2G). Mambaquaretin-1 was submitted to the MEROPS database (24). It has been classified as belonging to the I2 family that contains diverse Kunitz peptides found in animals, similar to α -DTX and aprotinin.

Mambaquaretin-1 Competitively Antagonizes V2R-Induced Signaling Pathways. By acting on V2R, vasopressin activates at least three signaling pathways: a Gs-coupled stimulation of adenylyl cyclase that initiates intracellular cAMP production, an arrestin-mediated V2R desensitization, and a stimulation of MAP kinase phosphorylation. Mambaquaretin-1 alone was unable to activate these signaling pathways (Fig. 3A, C, and D), but could antagonize all of them with a K_i of 12.0 nM ($PA_2 = 7.92 \pm 0.02$, $n = 3$) for cAMP production in CHO cells stably expressing V2R, 110 nM ($PA_2 = 7.0 \pm 0.2$, $n = 3$) for β -arrestin-1 mobilization in a tsA cell line transiently transfected with β -arrestin-1-YFP and hV2R-Rluc, and 210 nM ($PA_2 = 6.9 \pm 0.2$, $n = 7$) for MAP kinase phosphorylation in a tsA cell line transiently trans-

fecting with hV2R (Fig. 3A, C, and D). Increasing concentrations of mambaquaretin-1 induced parallel rightward shifts of the activation curves. Arunlakshana-Schild plots show a purely competitive behavior between vasopressin and mambaquaretin-1 on the three different activation pathways because the IC₅₀ regression can be linearized with unitary slope (Fig. 3B, D, and F). Mambaquaretin-1 was tested on immortalized KC3AC1 renal cells that naturally express V2R. These cells, isolated from the cortical collecting ducts of a transgenic mouse, display an epithelial polarized phenotype when cultivated on filters (25). $^3\text{H-AVP}$ was found to bind to KC3AC1 cells with an affinity between 4 nM and 6 nM and a B_{max} of 21,000 receptors per cell. 1-Desamino-8-D-arginine vasopressin (dDAVP) induced cAMP production in a dose-dependent manner with an EC₅₀ of 0.3 ± 0.2 nM, whereas in the presence of 1 μM mambaquaretin-1, its EC₅₀ was 60-fold higher (18 ± 1.2 nM; Fig. 3G). Moreover, mambaquaretin-1 antagonized the effect of 0.8 nM dDAVP (EC₅₀) with an IC₅₀ of 37 ± 15 nM. No change in cAMP production was observed with mambaquaretin-1 alone (Fig. 3H).

Aquaretic Effect of Mambaquaretin-1. The CD1-*pcy/pcy* mouse strain suffers from type 3 nephronopthisis, similar in many aspects to ADPKD, caused by a spontaneous missense mutation (T1841G) in the gene orthologous to human NPHP3 (26). This strain is a pertinent model for in vivo evaluation of renoprotective efficacy of novel drug candidates (6). Ten-week-old C57BL/6 female mice were given 1 $\mu\text{mol/kg}$ by body weight (BW) mambaquaretin-1 via daily intraperitoneal (i.p.) injections for 6 d

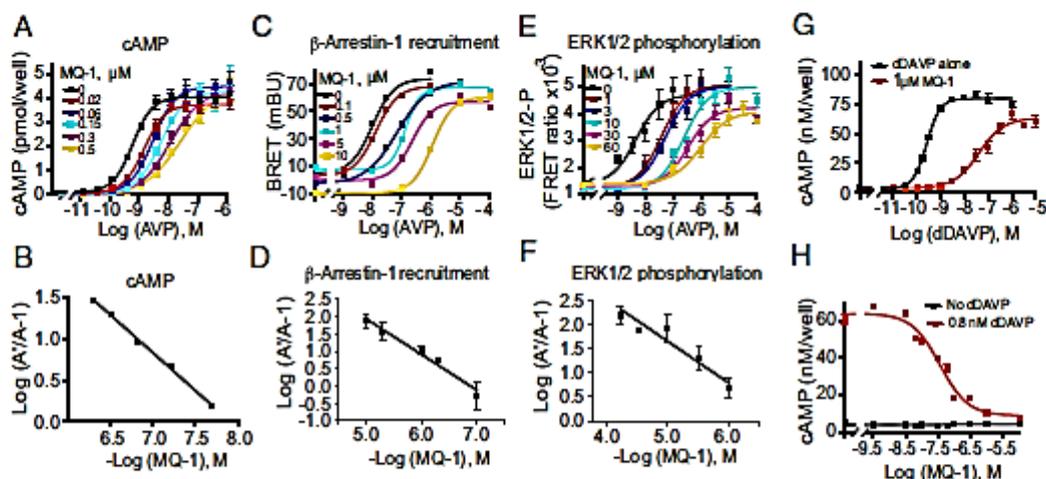


Fig. 3. V2R antagonist activity of mambaquaretin-1 (MQ-1). (A, C, and E) Competitive inhibition of AVP-induced (A) cAMP production in stable CHO-hv2R cell line, (C) β -arrestin-1 recruitment by BRET- β -arrestin-1-YFP and hv2R-Rluc tSA transfected cell line, and (E) MAP kinase phosphorylation on hv2R tSA transfected cell line. (B, D, and F) Corresponding Arunlakshana-Schild plots. (G) Antagonistic effect of mambaquaretin-1 on cAMP production in dDAVP-stimulated renal KC3A1 cells. (H) Effect of increasing concentrations of mambaquaretin-1 on cAMP production in the absence or in the presence of 0.8 nM of dDAVP in renal KC3A1 cell line. All panels are representative of at least three independent experiments and Schild representations are plotted as mean \pm SEM. mBU, millibRET unit.

whereas female CD1-pcy/pcy mice received three different doses of mambaquaretin-1: 0.01 μ mol/kg BW, 0.1 μ mol/kg BW, and 1 μ mol/kg BW. We used female mice to maximize the likelihood to observe a therapeutic effect of mambaquaretin-1. Urine output increased and urine osmolality decreased dramatically under mambaquaretin-1 treatment without differences between the two mouse strains (Fig. 4 A and B). For the two largest doses of mambaquaretin-1, a marked diuretic effect was observed within 1 d after the first injection. The effect reached a maximum with urine volumes around 4 mL/d. For the 0.01- μ mol/kg BW dose of mambaquaretin-1, four injections were necessary to provoke an increase in diuresis with a stabilized urinary volume around 2 mL/d. The diuresis caused by mambaquaretin-1 was paralleled by a decrease in urine osmolality consistent with an aquaretic effect in vivo. Intraperitoneal and subcutaneous injections gave identical biological results in terms of urine volume and osmolality (Fig. S6). The i.p. route was found to be more practical. Starting at 10 wk of age, CD1-pcy/pcy female mice received 0.1 μ mol/kg BW ($n = 6$) mambaquaretin-1 intraperitoneally for 99 d, whereas control mice received saline solution ($n = 7$). Mambaquaretin-1 was well tolerated as judged by the equivalent body weight (21.1 \pm 2.2 g vs. 21.3 \pm 0.8 g in controls, $P = 0.41$, Fig. S7) and by their normal social behavior during the course of the experiment. In addition, we did not notice any difference in the locomotive behavior, in the exterior aspect, or in the amount of food or water ingested between the two groups. Constant increase in diuresis and decrease in urine osmolality were observed at each time point until the end of the trial (Fig. 4 C and D). Protein and electrolyte excretions in the urine samples were similar in the treated and control groups (Fig. 4 E and F). No differences were found in cation and anion levels (Fig. S8).

Blood creatinine and urea, two important parameters related to renal function, were measured at the end of the trial (Fig. S9 A and B). No difference in urea concentration was noted between the two groups (73.1 \pm 6.6 mg/dL vs. 75.9 \pm 11.9 mg/dL in controls, $P = 0.3$). However, a threefold decrease of the creatinine levels was measured in the mambaquaretin-1-treated group (0.59 \pm 0.11 mg/dL vs. 1.86 \pm 0.73 mg/dL in controls, $P = 0.002$). Urea and creatinine levels were consistent with the mambaquaretin-1-treated mice having better renal function.

Mambaquaretin-1 Inhibits Cyst Progression in pcy Mice. By the end of the treatment, mice were perfusion fixed and organs were removed for analysis. Heart weights were found to be equivalent between treated and nontreated female mice (113 \pm 10 mg vs. 114 \pm 10 mg in controls, $n = 6-7$, $P = 0.45$; Fig. S9C). Kidneys from mambaquaretin-1-treated mice appeared smaller relative to those from control mice (kidney to body ratio: 0.029 \pm 0.005 vs. 0.043 \pm 0.018 in controls, $P = 0.06$; Fig. S4). The renoprotective effect of mambaquaretin-1 was clearly discernible in quantitative analysis of imaged kidney sections. The ratio of

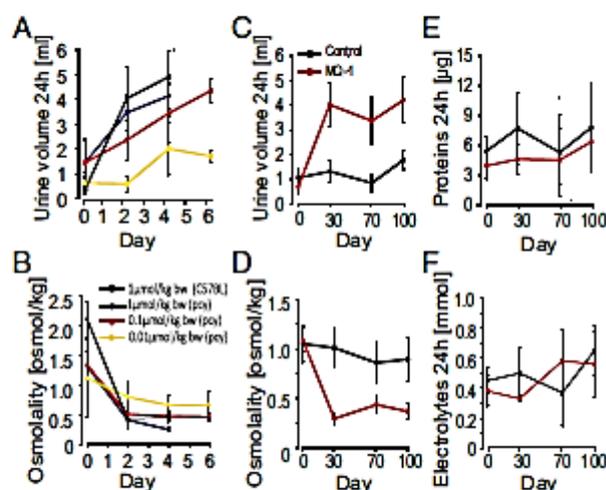


Fig. 4. Aquaretic effect of mambaquaretin-1. (A and B) Increase in urinary volume (A) and decrease in urine osmolality (B) after daily administration of mambaquaretin-1 at three doses to pcy mice and to C57BL/6 mice (violet curve, one dose) for 6 d. (C-F) Monitoring of (C) diuresis, (D) urine osmolality, (E) excretion of proteins, and (F) electrolytes during the 99-d treatment with 0.1 μ mol/kg BW of mambaquaretin-1. Data are presented as mean \pm SD, $n = 6-7$.

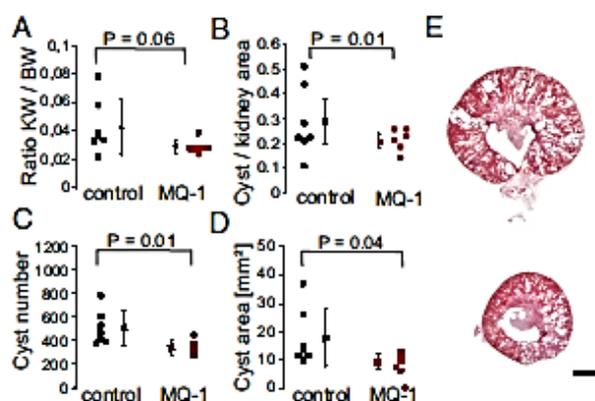


Fig. 5. Beneficial effect of treatment with mambaquaretin-1 (MQ-1) in pcy mice. Ratio of kidney weight to body weight (KW/BW) (A), ratio of cyst area to kidney area (B), cyst number (C), cyst area (D), and representative H&E-stained sections from kidneys of nontreated pcy mice (E, Top) and treated with mambaquaretin-1 (E, Bottom). *P* values were calculated with a *t* test by comparing treated and control animals, *n* = 6–7. (Scale bar, 2 mm.)

cyst to kidney area was significantly smaller after treatment with mambaquaretin-1 (0.21 ± 0.03 vs. 0.29 ± 0.09 in controls, decrease by 28%, $P = 0.03$; Fig. 5B). The average number of renal cysts was reduced by 33% (from 509 ± 134 in control animals to 342 ± 57 in those treated with mambaquaretin-1, $P = 0.01$; Fig. 5C). The total area of renal cysts was decreased by 47% (from 17.9 ± 9.3 mm² in controls to 9.4 ± 2.4 mm² in the treated mice, $P = 0.04$; Fig. 5D). Finally, analysis of representative kidney sections (Fig. 5E) showed a globally beneficial effect of mambaquaretin-1. The tests carried out on a limited cohort of mice demonstrated that a low dose of mambaquaretin-1 ($0.1 \mu\text{mol/kg BW}$) was effective.

Discussion

Currently V2R inhibition represents the most promising pharmaceutical strategy against PKD (27). We report the identification of mambaquaretin-1, a venom peptide that strongly antagonizes V2R with a therapeutic potential against renal polycystic disease. Venom components target principally enzymes and ionic channels involved in the control of the hemostatic, nervous, and cardiovascular systems (28). Components acting on the GPCR superfamily are rare and represent less than 1% of the characterized toxins. Mamba snakes (*Dendroaspis* sp.) are among the most dangerous snakes in Africa because their toxins act on potassium channels and acetylcholinesterase. Currently, their venom is also the richest source of GPCR ligands. These ligands are all three-finger-fold toxins active on amine-sensitive receptors (29–33). Mambaquaretin-1 is unique because it is a Kunitz-fold toxin active on a peptide-sensitive receptor. Mambaquaretin-1 is a minor component and its role as part of the venom has not been determined. Kunitz-type toxins were first identified in the early 1970s in black mamba (*Dendroaspis polylepis*) venom (34). Kunitz peptides are also common in other snakes, scorpions, spiders, ticks, and sea anemones and are known to interact with diverse targets. These include calcium channels (35), TRPV1 (36), cysteine proteases (37), or ASIC channels. Prevalently, individual Kunitz toxins act as potassium channel blockers (38), inhibitors of serine proteases (22), or both (39). Mambaquaretin-1 effectively and selectively targets V2R, expanding the repertoire of activities associated with the Kunitz fold. By using the first loop instead of the N-terminal part to interact with V2R, mambaquaretin-1 mimics aprotinin rather than α -DTX in its binding strategy. The

Kunitz-fold versatility is revealed by simple residue substitutions in mambaquaretin-1 sequence that significantly improve alternatively K_v1.1 and trypsin inhibition. Mambaquaretin-1 is a polypeptide five times bigger than vasopressin. Its great selectivity toward V2R may be related to a binding not confined to the orthosteric pocket. Certain hV2R loops peripheral to the orthosteric pocket are acidic whereas mambaquaretin-1 has a strongly basic character (net charge +9). Charge complementarity may help drive complex formation. The larger interaction surface, compared with vasopressin and vaptans, may also explain why mambaquaretin-1 acts as a full antagonist in three intracellular signaling pathways controlled by V2R activation. It can be speculated that its binding may induce a frizzled and nonfunctional V2R conformation that could have advantages in PKD treatment. The physiological consequences of a complete blockage of V2R will need a more detailed examination. The most promising finding is that mambaquaretin-1 is an efficient renoprotective agent able to slow down the progression of ADPKD in the murine model of the disease without any detectable adverse effects and no apparent toxicity up to $1 \mu\text{mol/kg BW}$. The pcy mice treated with mambaquaretin-1 compared with untreated animals had fewer smaller cysts. The renoprotective effect of mambaquaretin-1 could be due to lower cAMP levels in V2R-expressing cells. We demonstrated that mambaquaretin-1 inhibited the dDAVP-induced cAMP production in a dose-dependent manner. All therapeutic effects observed for mambaquaretin-1 were similar to those reported for vaptans. Despite its liver toxicity, tolvaptan is currently the key drug for PKD treatment (40, 41). Mambaquaretin-1, being a natural peptide, is unlikely to share the adverse effects associated with long-term vaptan use. Mambaquaretin-1 being the most selective ligand for V2R is likely to have fewer side effects because of its better selectivity. Animal venoms constitute a natural library of several million molecules, largely unexplored at present as a source of potential drugs. Six peptidic drugs derived from venoms are now on the market. Tens of other candidates are in clinical development and hundreds of patents have been filed, highlighting their therapeutic potential. Mambaquaretin-1 could be added to this list as a promising candidate for PKD treatment.

Materials and Methods

Unless mentioned otherwise, all chemicals were obtained from Sigma-Aldrich.

Identification of Mambaquaretin-1. One gram of *Dendroaspis angusticeps* venom (Latoxan) was separated into 13 peaks by ion exchange as described (42) and the fraction F in seven fractions as described in *SI Method 1: Mambaquaretin-1 Identification*.

Peptide Synthesis and Crystal Structure Determination. Mambaquaretin-1 and its variants were synthesized on an Applied Biosystems 433A peptide synthesizer, purified, and folded according to a method previously described (43). Briefly, this involved solid-phase synthesis, using an Fmoc strategy on 50 μmol of Chemmatrix resin loaded with the glycine residue. The linear peptide was folded in the presence of 25% glycerol and oxidized and reduced glutathione (1 mM) in Tris buffer at pH 8 for 16 h at room temperature (13). Crystallization trials were set up for the WT, the truncated mambaquaretin-1 lacking its four first residues, and the KA variant as described in *SI Method 2: Crystallization and Structure Determination*.

Assays. Binding assays were performed using radioactive tracers on cell membrane preparation from CHO cells expressing the receptor of interest as described in *SI Method 3: Radioligand Binding Assay*. Selectivity profiles of mambaquaretin-1 have been subcontracted to a service company as described in *SI Method 4: Selectivity Profile of Mambaquaretin-1*. Voltage-gated ion channels pharmacology was performed on *Xenopus* oocytes expressing potassium and sodium channels as described in ref. 44 and in *SI Method 5: Voltage-Gated Ion Channels Pharmacology*. Trypsin inhibition assays were performed by monitoring hydrolysis of the fluorogenic substrate Mca-R-P-K-P-V-E-NVal-W-R-PK(Dnp)-NH₂ as described in *SI Method 6: Trypsin Inhibition Assays*. Cell-based assays were performed on eukaryotic cells expressing

the vasopressin-sensitive receptors as described in *SI Method 7: Cell-Based Assays*. All animal assays were conducted in accordance with the German Animal Protection Law and are described in *SI Method 8: Animal Assays*.

ACKNOWLEDGMENTS. We are grateful to the European Synchrotron Radiation Facility synchrotron for allocation of beam time and to Dr. Leonard Gordon for assistance during data collection on beamline ID29.

- Sun Y, Zhou H, Yang Bx (2011) Drug discovery for polycystic kidney disease. *Acta Pharmacol Sin* 32:805–816.
- Willey CJ, et al. (2016) Prevalence of autosomal dominant polycystic kidney disease in the European Union. *Nephrol Dial Transplant*, gfw240.
- Torres VE, Harris PC (2009) Autosomal dominant polycystic kidney disease: The last 3 years. *Kidney Int* 76:149–168.
- Gattone VH (2005) Emerging therapies for polycystic kidney disease. *Curr Opin Pharmacol* 5:535–542.
- Mangoo-Karim R, et al. (1989) Renal epithelial fluid secretion and cyst growth: The role of cyclic AMP. *FASEB J* 3:2629–2632.
- Gattone VH, Wang X, Harris PC, Torres VE (2003) Inhibition of renal cystic disease development and progression by a vasopressin V2 receptor antagonist. *Wat Mod* 9:1323–1326.
- Carroll A, et al. (2013) Effect of long-acting somatostatin analogue on kidney and cyst growth in autosomal dominant polycystic kidney disease (ALADIN): A randomised, placebo-controlled, multicentre trial. *Lancet* 382:1485–1495.
- Torres VE, et al. (2012) Tolvaptan in patients with autosomal dominant polycystic kidney disease. *N Engl J Med* 367:2407–2418.
- Decaux G, Soupart A, Vassart G (2008) Non-peptide arginine-vasopressin antagonists: The vaptans. *Lancet* 371:1624–1632.
- Yamamura Y, et al. (1998) OPC-41061, a highly potent human vasopressin V2-receptor antagonist: Pharmacological profile and aqueoretic effect by single and multiple oral dosing in rats. *J Pharmacol Exp Ther* 287:860–867.
- King GF, ed (2015) *Venoms to Drugs, Drug Discovery* (Royal Society of Chemistry, London), pp P001–320.
- Fruchart-Gaillard C, et al. (2008) Different interactions between MT7 toxin and the human muscarinic M1 receptor in its free and N-methylscopolamine-occupied states. *Mol Pharmacol* 74:1554–1563.
- Rouget C, et al. (2010) Identification of a novel snake peptide toxin displaying high affinity and antagonist behaviour for the $\alpha 2$ -adrenoceptors. *Br J Pharmacol* 161:1361–1374.
- Palea S, et al. (2013) Effects of μ -Dala a peptidic $\alpha(1)$ (A) -adrenoceptor antagonist in human isolated prostatic adenoma and anaesthetized rats. *Br J Pharmacol* 168:618–631.
- Cruz LJ, et al. (1987) Invertebrate vasopressin/oxytocin homologs. Characterization of peptides from *Conus geographus* and *Conus straitus* venoms. *J Biol Chem* 262:15821–15824.
- Dutarte S, et al. (2008) Conopressin-T from *Conus tulipa* reveals an antagonist switch in vasopressin-like peptides. *J Biol Chem* 283:7100–7108.
- Skarzynski T (1992) Crystal structure of alpha-dendrotoxin from the green mamba venom and its comparison with the structure of bovine pancreatic trypsin inhibitor. *J Mol Biol* 224:671–683.
- Millers EK, et al. (2009) Crystal structure of textilinin-1, a Kunitz-type serine protease inhibitor from the venom of the Australian common brown snake (*Pseudonaja textilis*). *FEBS J* 276:3163–3175.
- Hamaux C, et al. (2000) The BPTI decamer observed in acidic pH crystal forms pre-exists as a stable species in solution. *J Mol Biol* 297:697–712.
- Macedo-Ribeiro S, et al. (2008) Isolation, cloning and structural characterization of boophilin, a multifunctional Kunitz-type proteinase inhibitor from the cattle tick. *PLoS One* 3:1–17.
- Gasparini S, et al. (1998) Delineation of the functional site of α -dendrotoxin: The functional topographies of dendrotoxins are different but share a conserved core with those of other Kv1 potassium channel-blocking toxins. *J Biol Chem* 273:25393–25403.
- Kunitz M, Northrop JH (1936) Isolation from beef pancreas of crystalline trypsinogen, trypsin, a trypsin inhibitor, and an inhibitor-trypsin compound. *J Gen Physiol* 19:991–1007.
- Otlewski J, et al. (2001) Structure-function relationship of serine protease - protein inhibitor interaction. *Acta Biochim Pol* 48:419–428.
- Rawlings ND, Barrett AJ (1999) MEROPS: The peptidase database. *Nucleic Acids Res* 27:325–331.
- Vongchareun S, et al. (2009) Osmotic stress regulates mineralocorticoid receptor expression in a novel aldosterone-sensitive cortical collecting duct cell line. *Mol Endocrinol* 23:1948–1962.
- Nagao S, Kugita M, Yoshihara D, Yamaguchi T (2012) Animal models for human polycystic kidney disease. *Exp Anim* 61:477–488.
- Chebib FT, Sussman CR, Wang X, Harris PC, Torres VE (2015) Vasopressin and disruption of calcium signalling in polycystic kidney disease. *Nat Rev Nephrol* 11:451–464.
- Fry BG, et al. (2009) The toxicogenomic multiverse: Convergent recruitment of proteins into animal venoms. *Annu Rev Genom Hum Genet* 10:483–511.
- Maiga A, et al. (2012) G protein-coupled receptors, an unexploited animal toxin target: Exploration of green mamba venom for novel drug candidates active against adrenoceptors. *Toxicol* 59:487–496.
- Harvey AL, et al. (2002) Effects of muscarinic toxins MT1 and MT2 from green mamba on different muscarinic cholinergic receptors. *Neurochem Res* 27:1543–1554.
- Blanchet G, et al. (2013) New α -adrenergic property for synthetic MT β and CM-3 three-finger fold toxins from black mamba. *Toxicol* 75:160–167.
- Koivula K, Rondinelli S, Näsman J (2010) The three-finger toxin MTalpha is a selective alpha(2B)-adrenoceptor antagonist. *Toxicol* 56:440–447.
- Jerusalinsky D, Kornisiuk E, Alfaro P (2000) Muscarinic toxins: Novel pharmacological tools for the muscarinic cholinergic system. *Toxicol* 38:747–761.
- Harvey AL, Karlsson E (1980) Dendrotoxin from the venom of the green mamba, *Dendroaspis angusticeps*. A neurotoxin that enhances acetylcholine release at neuromuscular junction. *Naunyn Schmiedeberg Arch Pharmacol* 312:1–6.
- Schweitz H, et al. (1994) Calcicludine, a venom peptide of the Kunitz-type protease inhibitor family, is a potent blocker of high-threshold Ca $^{2+}$ channels with a high affinity for L-type channels in cerebellar granule neurons. *Proc Natl Acad Sci USA* 91:878–882.
- Andreev YA, et al. (2008) Analgesic compound from sea anemone *Heteractis crispata* is the first polypeptide inhibitor of vanilloid receptor 1 (TRPV1). *J Biol Chem* 283:23914–23921.
- Smith D, et al. (2016) Unexpected activity of a novel Kunitz-type inhibitor: Inhibition of cysteine proteases but not serine proteases. *J Biol Chem* 291:19220–19234.
- Harvey AL (2001) Twenty years of dendrotoxins. *Toxicol* 39:15–26.
- Paigneur S, et al. (2011) A bifunctional sea anemone peptide with Kunitz type protease and potassium channel inhibiting properties. *Biochem Pharmacol* 82: 81–90.
- Watkins PR, et al. (2015) Clinical pattern of Tolvaptan-associated liver injury in subjects with autosomal dominant polycystic kidney disease: Analysis of clinical trials database. *Drug Saf* 38:1103–1113.
- European Medicines Agency (2017) Jinarc. Available at http://www.ema.europa.eu/ema/index.jsp?curl=pages/medicines/human/medicines/002788/human_mod_001857.jsp&mid=W00b01ac058001d124. Accessed June 12, 2016.
- Quinton L, et al. (2010) Isolation and pharmacological characterization of AdTx1, a natural peptide displaying specific insurmountable antagonism of the α -1A-adrenoceptor. *Br J Pharmacol* 159:316–325.
- Mourier G, Dutarte S, Fruchart-Gaillard C, Menez A, Sorvent D (2003) Chemical synthesis of MT1 and MT7 muscarinic toxins: Critical role of Arg-34 in their interaction with M1 muscarinic receptor. *Mol Pharmacol* 63:26–35.
- Liman ER, Tytgat J, Hess P (1992) Subunit stoichiometry of a mammalian K $^{+}$ channel determined by construction of multimeric cDNAs. *Neuron* 9:861–871.
- Suckau D, et al. (2003) A novel MALDI LIFT-TOF/TOF mass spectrometer for proteomics. *Anal Bioanal Chem* 376:952–965.
- Kabsch W (2010) Integration, scaling, space-group assignment and post-refinement. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 66:133–144.
- McCoy AJ, et al. (2007) Phaser crystallographic software. *J Appl Crystallogr* 40:658–674.
- Emsley P, Lohkamp B, Scott WG, Cowtan K (2010) Features and development of Coot. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 66:486–501.
- Murshudov GN, et al. (2011) REFMAC5 for the refinement of macromolecular crystal structures. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 67:355–367.
- Adams PD, et al. (2010) PHENIX: A comprehensive python-based system for macromolecular structure solution. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 66:213–221.
- Favreau P, et al. (2001) A new ω -conotoxin that targets N-type voltage-sensitive calcium channels with unusual specificity. *Biochemistry* 40:14567–14575.
- Cheng Y, Prusoff WH (1973) Relationship between the inhibition constant (K $_{i}$) and the concentration of inhibitor which causes 50 per cent inhibition (I $_{50}$) of an enzymatic reaction. *Biochem Pharmacol* 22:3099–3108.
- Garni FA, et al. (2014) Electrophysiological characterization of Ts6 and Ts7, K $^{+}$ channel toxins isolated through an improved *Tityus serrulatus* venom purification procedure. *Toxins* 6:892–913.

Supporting Information

Ciolek et al. 10.1073/pnas.1620454114

SI Method 1: Mambaquaretin-1 Identification

Fraction *F* was further purified by reverse-phase HPLC, using a linear gradient from 0% to 100% acetonitrile and 0.1% trifluoroacetic acid in 100 min. Fraction *D* was finally purified on a C18 Vydac column (4.6 mm, 5 μ m, 15 cm, flow = 1 mL/min), using a gradient of 0.5% acetonitrile per minute. Venom fractionation was done only once. Venom fractions and membrane protein concentrations were determined using the Bio-Rad protein assay with BSA as a standard. Mambaquaretin-1 sequence was determined by Edmans degradation and mass analysis. N-terminal sequencing of the fraction *FDA* was performed as described in ref. 13. Sequencing by in-source decay (ISD) MALDI-TOF was carried out with 15 μ g of fraction *FDA* treated with 2 μ L of 100 mM Tris(carboxyethyl)phosphine at 50 °C and purified on a Zip-Tip C18 microcolumn. ISD experiments used 1,5-diaminonaphthalene (Acros) as described in ref. 13. For peptide mass fingerprinting, 300 ng of purified toxin was reduced in 5 μ L of 50 mM NH₄HCO₃, pH 8, by 2 μ L of 250 mM DTT for 30 min at 56 °C, followed by 2.2 μ L of 500 mM iodoacetamide during 1 h in the dark at room temperature. The mass analysis was made as described in ref. 13. Tandem mass spectrometry experiments were performed using LIFT-TOF/TOF technology (45). Data were acquired with Flex Control 3.0. Resulting spectra were analyzed with Biotools 3.2 and Sequence Editor 3.2 (Bruker Daltonics).

SI Method 2: Crystallization and Structure Determination

Crystallization trials were set up for the WT, the truncated mambaquaretin-1 lacking its four first residues, and the KA variant. The trials were set up with 250 μ g peptides resuspended at a concentration of 7 mg/mL in 50 mM sodium acetate, pH 5.5, for which the largest amount of protein was available. The other constructs were resuspended at the same concentration in the same buffer. The screen consisted of 24 conditions consisting of high precipitation strength precipitants and additives used in the crystallization of BPTL. Crystallization was carried out in sitting-drop CrystChem plates with 1- μ L drops of protein and 1- μ L drops of reservoir solution consisting of 36% monomethyl polyethylene glycol 2,000 (MPEG-2K), 450 mM NaCl, 90 mM KSCN, and 100 mM imidazole-HCl, pH 7.5, and allowed to equilibrate in a constant temperature incubator at 20 °C. The mixed cryoprotectant solution consisted of 5% diethylene glycol, 5% ethylene glycol, 5% MPD, 5% glycerol, 5% 1,2-propanediol, 5% DMSO, 18% MPEG-2K, and 100 mM linear mixed buffer: sodium acetate, ADA, and bicine, 20% at pH 4 and 80% at pH 10. Crystals were obtained from 36% MPEG-2K, 450 mM NaCl, 90 mM KSCN, 100 mM imidazole HCl, pH 7.5. A screen consisting of 12 conditions for the WT did not give crystals, even after cross-seeding with the KA mutant. A screen consisting of 6 conditions for the shortened construct also gave no crystals. Seven crystals were used for data collection on beamline ID29 at the European Synchrotron Radiation Facility in Grenoble, France. Processing was carried with XDS and XSCALE (46) with the resolution cutoff chosen on the basis of a mean $I/\Delta(I)$ better than 1 and a $CC_{(1/2)}$ greater than 50%. The structure was solved by molecular replacement using Phaser (47) and aprotinin as a model (PDB ID: 1B0C) (19). Model building was done with COOT (48) and refinement with REFMAC5 (49) and Phenix (50). Given the high MPEG concentration used in the crystallization, two crystals were flash-cooled in liquid nitrogen without prior transfer to a cryoprotectant solution. These two crystals diffracted to 1.27 Å and 1.15 Å. The best diffraction, at 1.06 Å, was obtained from a crystal transferred to a

mixed cryoprotectant solution consisting of 5% diethylene glycol, 5% ethylene glycol, 5% MPD, 5% glycerol, 5% 1,2-propanediol, 5% DMSO, 18% MPEG-2K, 100 mM mixed linear buffer sodium acetate, ADA, and bicine 20% at pH 4 and 80% at pH 10. The overall resolution for these data was 1.38 Å.

SI Method 3: Radioligand Binding Assay

The ³H-AVP, ¹²⁵I-GVIA, and membrane preparations from CHO cells expressing oxytocin and vasopressin receptors V1a, V1b, and V2 subtypes were purchased from PerkinElmer. Binding experiments were performed using 1 nM ³H-AVP in a 100- μ L reaction mixture at room temperature in buffer composed of 50 mM Tris-HCl, pH 7.4, 10 mM MgCl₂, and 1 g/L BSA, with increasing concentrations of competitors. Nonspecific binding was measured in the presence of 1 μ M AVP. Binding experiments on N-type calcium channels were performed as described in ref. 51. Incubation was stopped by filtration through 96 GF/C filter plates preincubated with 0.5% polyethylenimine. A total of 25 μ L of Microscint 0 was added onto each dry filter and the radioactivity was quantified on a TopCount beta counter with a 33% and 45% yield for tritium and iodine, respectively (PerkinElmer). Competition binding data were fitted to a one-site/state inhibition mass action curve using Kaleidagraph (Synergy software). IC₅₀ values were converted to K_d, using the Cheng-Prusoff equation (52) and 1.1 nM as K_d. Data represent at least three independent experiments performed in duplicate and are presented as mean \pm SD.

SI Method 4: Selectivity Profile of Mambaquaretin-1

Electrophysiological assays were performed by GE Healthcare (Millipore Corporation), using 1 μ M of the mambaquaretin-1 for activities on cardiac ion channels Nav1.5, Cav1.2, Kv4.3/KChIP2, Kv1.5, KCNQ1/mink, Kir2.1, hERG, and HCN4. Mambaquaretin-1 did not exhibit significant inhibition of any of the ion channels at a concentration of 1 μ M. FLIPR assays were conducted by GE Healthcare to profile the mambaquaretin-1 (1 μ M) for agonist and antagonist activities on 156 GPCRs: M1, M2, M3, M4, M5, A1, A2B, A3, alpha1A, alpha1B, alpha1D (Delta 2 to 79), alpha2A, beta 1, beta 2, beta 3, C3aR, C5aR, AT1, APJ, BB1, BB2, BB3, Bradykinin B2, CGPR1, CaS, CB1, CB2, ChemR23, CCR1, CCR10, CCR2B, CCR3, CCR4, CCR5 rhesus macaque, CCR6, CCR7, CCR8, CCR9, CX3CR1, CXCR1, CXCR2, CXCR3, CXCR4, CXCR5, CXCR6, XCR1/GPR5, CCK1, CCK2, CRF1, CRF2, D1, D2L, D4, D5, ETA, ETB, GPR41, GPR43, GABAB1b, GAL1, GAL2, Ghrelin receptor, GIP, GLP-1, GLP-2, glucagon, secretin receptor, mGlu1, mGlu2, TSH, GnRH, H1, H2, H3, GPR99, GPR54, BLT1, CysLT1, CysLT2, LPA1, LPA3, LPA5/GPR92, S1P1, S1P2, S1P3, S1P4, S1P5, MrgD, MRGX1, MRGX2, MCHR1, MCHR2, MC2, MC4, MC5, motilin receptor, NMU1, NMU2, NPBW1/GPR7, Y2, Y4, NTR1, FPR1, FPR1L1, GPR109A, Delta, Kappa, Mu, NOP/ORL1, OX1, OX2, GPR39, OT, GPR103/ORFP, P2RY1, P2RY2, P2RY4, P2RY11, P2RY12, PAF, PK1, PK2, PRP, DP, EP1, EP2, EP3, EP4, FP, IP1, TP, trypsin-activated PARs, thrombin-activated PARs, PTH1, PTH2, 5-HT1A, 5-HT2A, 5-HT2B, 5-HT2C, 5-HT4B, 5-HT6, SST2, SST3, SST4, SST5, GPR68/OGR1, SUCNR1/GPR91, NK1, NK2, NK3, TRH, GPR14, V1A, V1B, PAC1 long isoform, VPAC1, and VPAC2.

SI Method 5: Voltage-Gated Ion Channels Pharmacology

For the expression of the potassium and sodium channels in *Xenopus* oocytes, the linearized plasmids were transcribed

using the T7 or SP6 mMESSAGEmMACHINE transcription kit (Ambion) as previously described (44). Two-electrode voltage-clamp recordings were performed as described in ref. 53. Data were fitted with the Hill equation: $y = 100/[1 + (IC_{50}/[toxin])^h]$, where y is the amplitude of the toxin-induced effect, IC_{50} is the toxin concentration at half-maximal efficacy, $[toxin]$ is the toxin concentration, and h is the Hill coefficient. All data represent at least three independent experiments and are presented as mean \pm SD.

SI Method 6: Trypsin Inhibition Assays

Trypsin inhibition assays were carried out in 200 μ L of 50 mM Tris-HCl buffer (pH 6.8), 100 mM NaCl, 10 mM $CaCl_2$ at 20 $^{\circ}C$ with a fluorogenic substrate Mca-R-P-K-P-V-E-NVal-W-R-PK(Dnp)-NH₂ (R&D Systems) and trypsin at 0.4-nM concentration (Sigma Aldrich). Continuous assays were performed by recording the increase in fluorescence induced by the cleavage of the fluorogenic substrate, using a Fluoroscan Ascent photon counter spectrophotometer, $y = 100/[1 + (IC_{50}/[toxin])^h]$, where y is the amplitude of the toxin-induced effect, IC_{50} is the toxin concentration at half-maximal efficacy, $[toxin]$ is the toxin concentration, and h is the Hill coefficient. All data represent at least three independent experiments and are presented as mean \pm SD.

SI Method 7: Cell-Based Assays

The SV40 temperature-sensitive T-antigen-transformed HEK 293 cell line tsA-201 (purchased from ECACC) and the CHO cell line expressing hV2R were cultured at 37 $^{\circ}C$ in 5% CO_2 in DMEM containing 10% FCS and 100 units/mL penicillin/100 μ g/mL streptomycin supplemented with 0.1 mM nonessential amino acids and 0.4 mg/mL geneticin for CHO cells. The renal KC3AC1 cell line established by targeted oncogenesis was isolated from microdissected cortical collecting ducts of a transgenic mouse in which expression of the SV40 T antigen was placed under the control of the proximal promoter (P1) of the human MR gene 226. These cells were cultured on collagen I-coated (Instituit Jacques Boy) Petri dishes with an epithelial culture medium composed of DMEM/Ham's F12 (1:1), 2 mM glutamine, 50 nM dexamethasone, 50 nM sodium selenite, 5 μ g/mL transferrin, 5 μ g/mL insulin, 10 ng/mL EGF (Tebu), 2 nM T3, 100 units/mL penicillin/streptomycin, 20 mM Hepes (pH 7.4), and 5% dextran charcoal-treated serum. For the quantification of cAMP, stable CHO cells expressing the hV2R were seeded at 5,000 cells per well into a 96-well plate and KC3AC1 cells were seeded at 50,000 cells per well into a collagen I-coated 96-well plate. CHO-hV2R cells were preincubated for 15 min at 37 $^{\circ}C$ in the absence or in the presence of increasing mambaquartetin-1 concentrations and then stimulated by increasing AVP concentrations in a total 50 μ L volume incubation medium containing DMEM, 5% BSA, and 0.1 mM Ro201724. KC3AC1 cells were stimulated with increasing dDAVP concentrations in the absence or presence of 1 μ M mambaquartetin-1 without preincubation. Competition experiments in KC3AC1 cells were performed by adding simultaneously buffer (mambaquartetin-1 alone) or 0.8 nM dDAVP and increasing doses of mambaquartetin-1. Experiments lasted for 30 min at 37 $^{\circ}C$ and were stopped by the addition of lysis buffer from the cAMP Dynamic 2 kit (Cisbio International). The addition of donor and acceptor entities (100 μ L total volume per well) elicited a FRET signal ($F\% = 100 \times (R_{pos} - R_{neg})/R_{neg}$) with R_{pos} fluorescence ratio (665/620 nm) in wells incubated with both donor- and acceptor-labeled antibodies, and R_{neg} being the same ratio for the negative control with donor fluorophore-labeled antibody. This signal was then transformed into cAMP concentration in wells, using a calibration curve. To characterize arrestin-V2 interaction, 2.5×10^6 tsA cells transiently transfected with 150 ng of the hV2Rluc plasmid and with

1 μ g of the β -arrestin-1-YFP plasmid were seeded in 6-well plates. Forty-eight hours after transfection, cells were washed with KREBS buffer containing 146 mM NaCl, 4.2 mM KCl, 0.5 mM $MgCl_2$, 1 mM $CaCl_2$, 10 mM Hepes (pH 7.4), and 1 mg/mL glucose and suspended in 1 mL of this buffer. BRET measurements between the V2-Rluc and the β -arrestin-1-YFP were performed in 96-well plates with a final volume of 50 μ L containing 30 μ L of cell suspension (75,000 cells), 10 μ L of KREBS buffer or the mix of ligands containing either increasing concentrations of AVP or mambaquartetin-1. A total of 10 μ L Coelenterazine (luciferase substrate) was then added to the mix and incubated at 37 $^{\circ}C$ before BRET measurements were performed in a BertholdTech Mithras LB940, using MikroWin software. The kinetics of interaction were performed and the saturable specific BRET signal measured 600 s after AVP addition to the cells transfected with both donor V2-Rluc and acceptor β -arrestin-YFP was calculated using the following equation: BRET in millibRET units (mBU) = $1,000 \times (R_{pos} - R_{neg})$, with R_{pos} being the fluorescence ratio (530/485 nm) calculated in wells incubated with both donor V2-Rluc and acceptor β -arrestin-YFP and R_{neg} being the same ratio for the negative control incubated only with the donor V2-Rluc. Activation curves were plotted to the log of AVP concentrations and fitted to the Hill equation to extract the EC_{50} , using Graphpad Prism software. The corresponding Arunlakshana-Schild plots allowed determining Schild parameters (pA_2 and slope) from the Schild equation. Experiments were repeated at least three times on different cultures, and each condition was extracted from the kinetics only once. Data for Schild representation are presented as mean \pm SEM. The MAP kinase phosphorylation activity was measured on 10×10^6 tsA cells transiently transfected with 500 ng of an expression plasmid for human V2R and were plated into polyornithine-coated 96-well plates with 75,000 cells per well with DMEM containing 10% serum. Eight hours and 24 h later, the cells were starved with medium without serum. Stimulation was performed 27 h later. Transfected cells were incubated for 7 min at 37 $^{\circ}C$ with DMEM in the absence (control condition) or with increasing doses of AVP (stimulated condition) or with a mix of AVP and mambaquartetin-1 (stimulated condition with inhibitor). Then, the medium was replaced with 50 μ L lysis buffer from the Cellul'ERK kit (Cisbio International) and the cells were rocked gently for 30 min at room temperature. ERK phosphorylation measurement was performed with the time-resolved fluorescence energy transfer-based Cellul'ERK kit (Cisbio Bioassays) according to the manufacturer's recommendation. In a 384-well plate, 2 μ L of the donor-labeled antibody and then 2 μ L of the acceptor-labeled antibody were successively added to 16 μ L lysed cells. After 2 h incubation at room temperature, fluorescence emissions were measured on a RubyStar fluorometer. The specific FRET signal was calculated using the following equation: specific FRET ratio = $(R_{pos} - R_{neg})$, where R_{pos} and R_{neg} are the ratio of the signals measured at 665 nm and 620 nm when both donor- and acceptor-labeled antibodies were added to lysed cells (R_{pos}) or to lysis buffer alone (R_{neg}). Activation curves were plotted to the log of AVP concentrations and fitted to the Hill equation to extract the EC_{50} , using Graphpad Prism software. The corresponding Arunlakshana-Schild plots allowed determining Schild parameters (pA_2 and slope) from the Schild equation. Experiments were repeated at least three times on different cultures, each condition in triplicate. Data are presented as mean \pm SEM.

SI Method 8: Animal Assays

Mambaquartetin-1 (1 mg/mL in 0.9% NaCl) was administered daily at different doses to 10-wk-old female CD1-*pcy/pcy* and C57BL/6 mice via intraperitoneal or subcutaneous routes. Urine

was collected in metabolic cages for 24 h and centrifuged for 30 min at $20,800 \times g$ before urine osmolality was determined with a Knauer osmometer. Creatinine and urea concentrations were determined with the commercial enzyme-based kits (LT-SYS creatinine and urea kits; Eberhard Lehmann GmbH). In the case of creatinine, absorption was measured at 564 nm and in the case of urea, absorption was measured at 340 nm. For the therapeutic trial, mambaquaretin-1 was daily administered via i.p. injections at a dose of $0.1 \mu\text{mol toxin/kg BW}$ to female CD1-pcy/pcy mice starting at the age of 10 wk. Ninety-nine days later the mice were perfusion fixed with 4% paraformaldehyde. Kidneys and hearts were removed and

weighed. For further processing, the kidneys were embedded in paraffin. The $7\text{-}\mu\text{m}$ -thick paraffin sections were stained with Sirius Red to quantify the fibrotic changes and with H&E to quantify all other parameters with Image J ver. 1.2 software. Cysts were included in the analysis only if they exceeded an area of 0.05 mm^2 . Statistical analysis was performed using IBM SPSS Statistics ver. 21. To detect differences in cyst area and average size of cysts the one-way t test was used. The differences in urine volume and urine osmolality were analyzed using the paired t test. All experiments were approved by the local government (Regierung der Oberpfalz).

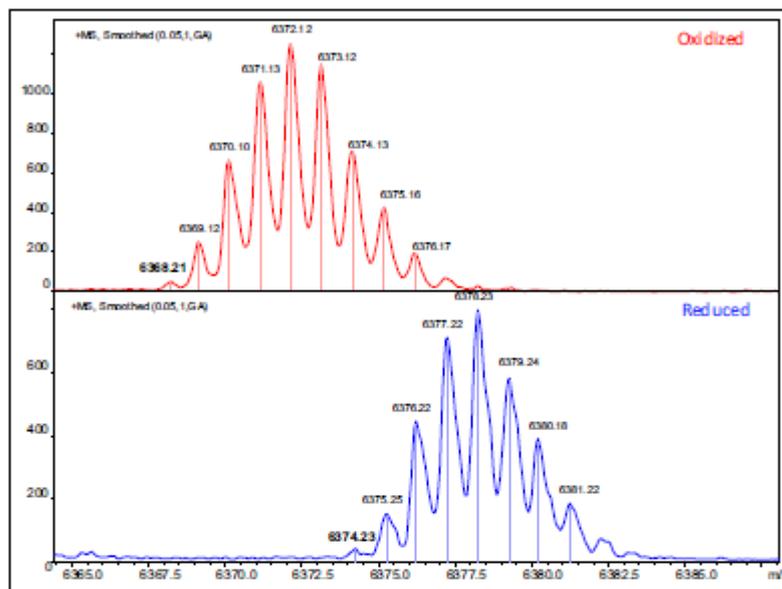


Fig. S1. MALDI-TOF spectra of oxidized and reduced mambaquaretin-1. Shown are MALDI-TOF spectra of mambaquaretin-1 before (*Top*) and after (*Bottom*) reduction of the disulfide bonds. Each reduced disulfide bond leads to the molecular weight increase by 2 Da. The difference between the masses of the two species charged with one proton clearly indicates that mambaquaretin-1 has three disulfide bonds ($\Delta M = 6,374.23$ to $6,368.21 = 6.02 \text{ Da}$). Monoisotopic masses are in bold.

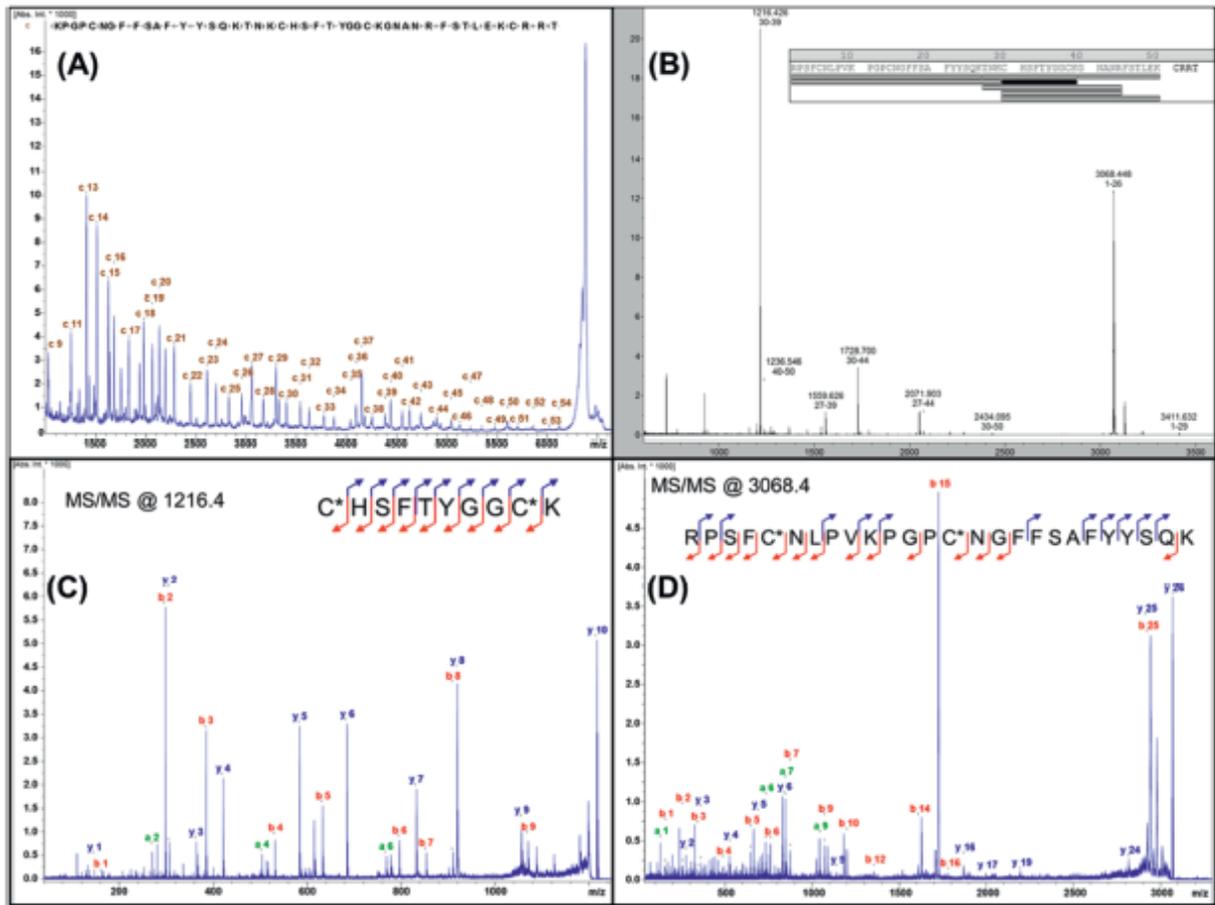


Fig. S2. MALDI-TOF/TOF identification of amino acid sequence of mambaquaretin-1. (A) ISD mass spectrum obtained for the reduced peptide. The spectrum displays a large c-ion series that allows the toxin to be sequenced from the +09 to the +54 amino acid. (B) Peptide mass fingerprint acquired after the reduction, alkylation, and tryptic digestion of mambaquaretin-1. The resulting peptides, which match with the proposed sequence, confirm the results of the ISD experiment. (C) Further characterization with the MS/MS of the peptide detected at m/z 1216.4. b- and y-type ions fit perfectly with the sequence found by ISD. (D) MS/MS characterization of the N-terminal peptide (m/z 3068.4) that could not be characterized from the ISD experiment (due to intense adducts of matrix that hide the signals in the low- m/z range). This spectrum perfectly validates sequence obtained from Edman's degradation.

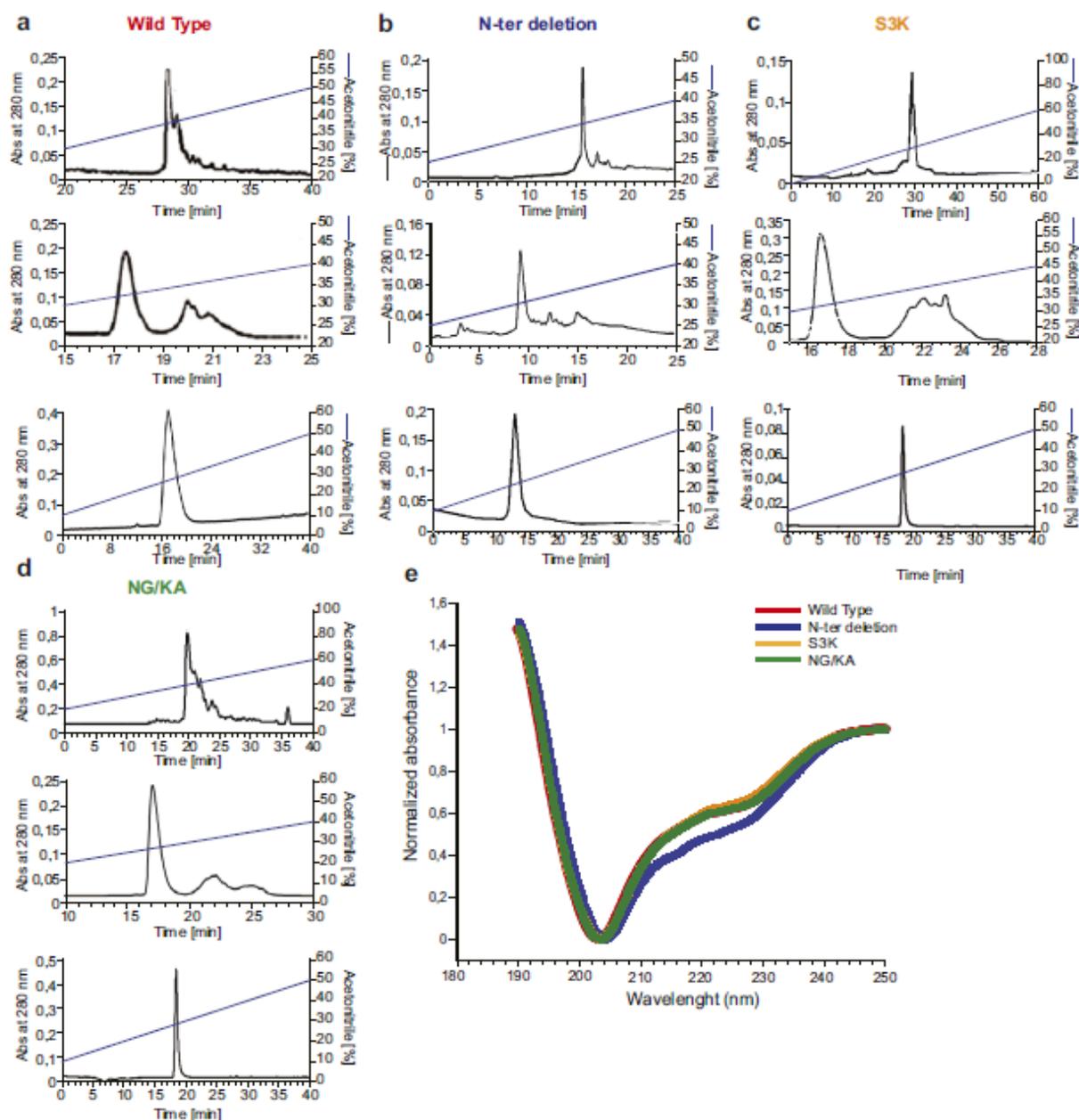


Fig. S3. Solid-phase synthesis of WT mambaquaretin-1 and its three variants. (A–D) Reverse-phase liquid chromatography of the mambaquaretin-1 WT (A), the N-ter deletion peptide lacking its four first residues (B), the S3K (C), and the NG/KA variants (D). Solvents are A (water, TFA 0.1%) and B (acetonitrile, TFA 0.1%). A–D, Top corresponds to the purification of the crude synthesis on Waters X-bridge C18, 19 × 250 mm, 10 μm, flow of 15 mL/min. The gradients were 10–40% of B in 40 min (mambaquaretin-1 WT), 15–40% of B in 25 min (N-ter deletion peptide), 0–60% of B in 60 min (S3K variant), and 20–60% of B in 40 min (NG/KA variant). A–D, Middle corresponds to the purification of the oxidized peptide performed on a Waters Sunfire 10 μm, 10 × 250 mm. The gradients were 15–40% of B in 25 min (mambaquaretin-1 WT and N-ter deletion peptide), 20–60% of B in 40 min (S3K variant), and 10–40% of B in 30 min (NG/KA variant). A–D, Bottom corresponds to the analytical chromatography of the pure oxidized peptide performed on Waters X-bridge C18, 4.6 × 150 mm, 3.5 μm. Gradient was 10–50% of B in 40 min. (E) Circular dichroism of WT mambaquaretin-1 and its three variants. Absorbance was normalized to fix at 1 the values at 250 nm and at 0 the minima. Size of the symbol equals SD, $n = 8–12$. Abs, absorbance.

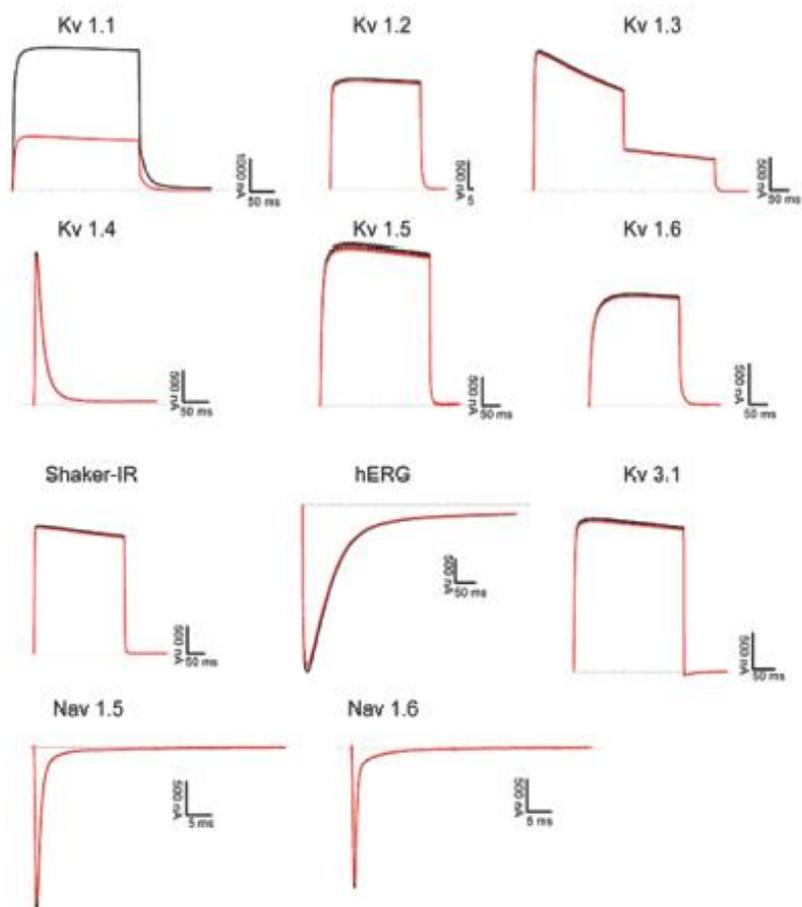


Fig. S4. Electrophysiological recordings of the effect of mambaquaretin-1 on conductivity of potassium (Kv) and sodium (Nav) channels. All channels were expressed in *Xenopus laevis* oocytes. Currents were recorded without (black traces) or in the presence of 10 μ M mambaquaretin-1 (red traces). Mambaquaretin-1 showed moderate inhibitory activity only on the Kv 1.1 channel.

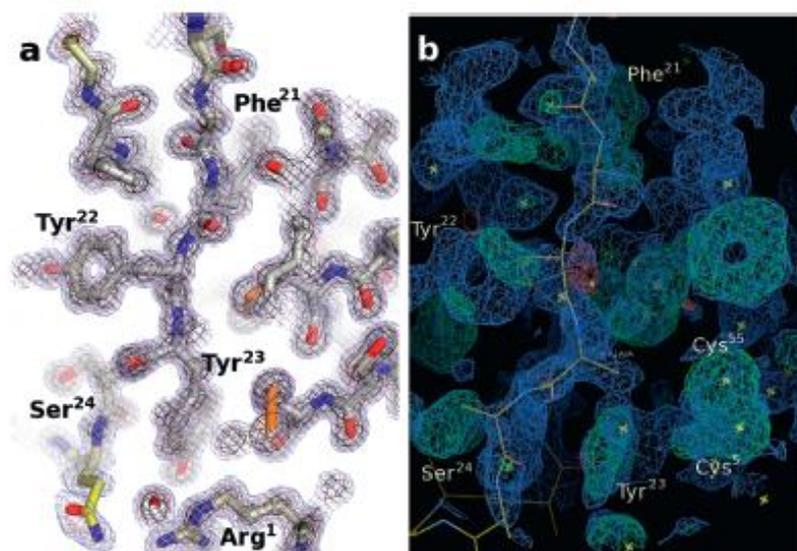


Fig. S5. Electron density maps. (A) Fitted electron density map at 1.06 Å showing the central stretch $^{21}\text{FYYS}^{21}$ for the final refined structure. (B) Experimental radiation damage-induced phasing (RIP) map with automatically built polyaniline chain obtained from data collected from a mambaquaretin KA crystal that has suffered radiation damage. The $^{21}\text{FYYS}^{21}$ is easily interpretable and the disulfide Cys⁵ to Cys⁵⁵ is clearly visible.

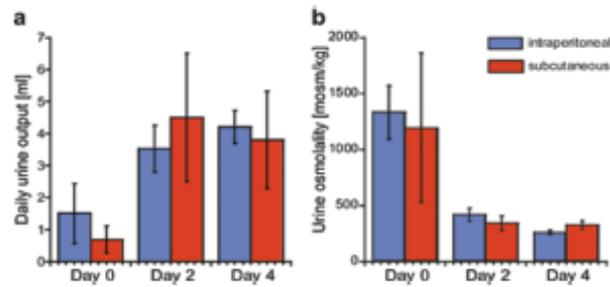


Fig. S6. Effect on urine output and urine osmolality of CD1-pcy/pcy mice after daily intraperitoneal or subcutaneous injections of mambaquaretin-1 at a dose of $1 \mu\text{mol/kg}$ body weight. (A) Total urine volume (24 h). (B) Urine osmolality. Data are presented as mean \pm SD, $n = 6-7$. $P = \text{NS}$ (not significant), one-way t test.

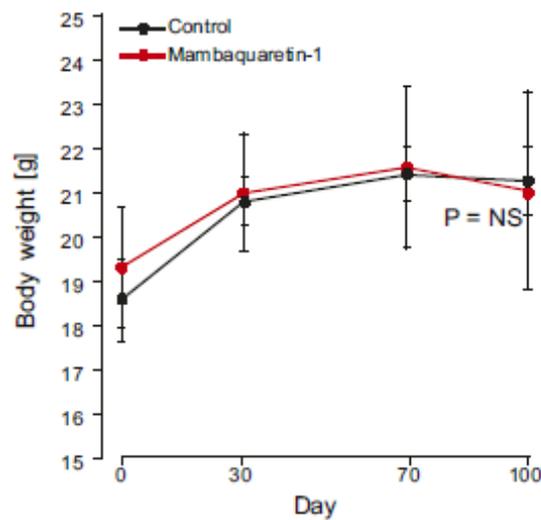


Fig. S7. Effect of mambaquaretin-1 at a dose of $0.1 \mu\text{mol/kg}$ BW on BW of CD1-pcy/pcy mice after daily intraperitoneal injections for 99 d. Data are presented as mean \pm SD, $n = 6-7$. $P = \text{NS}$ (not significant), one-way t test.

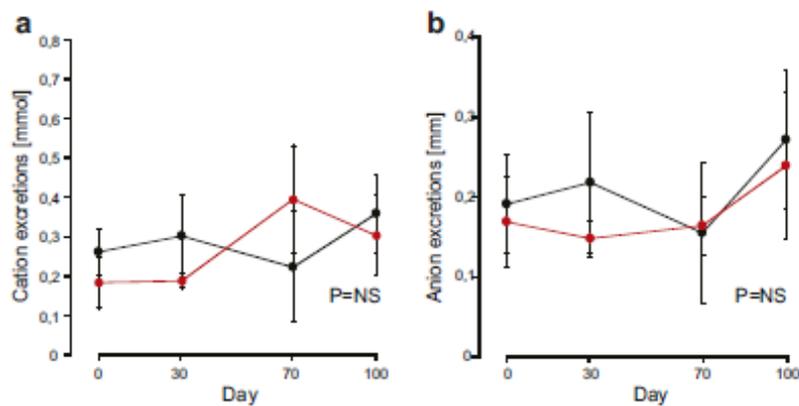


Fig. S8. Effect of mambaquaretin-1 at a dose of $0.1 \mu\text{mol/kg}$ BW on cation and anion urinary excretions of CD1-pcy/pcy mice after daily intraperitoneal injections for 99 d. (A) Cation urinary excretions; (B) anion urinary excretions. Data are presented as mean \pm SD, $n = 6-7$. $P = \text{NS}$ (not significant), one-way t test.

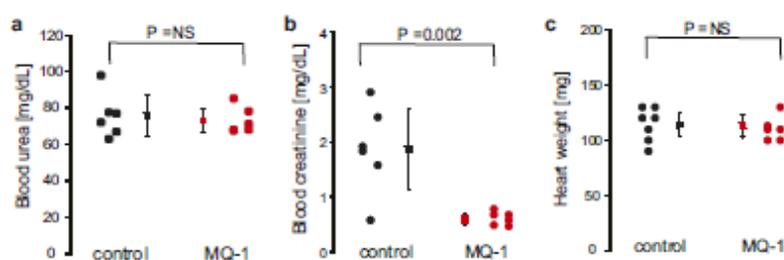


Fig. 59. Effect of mambaquaretin-1 (MQ-1) at a dose of 0.1 μ mol/kg BW on (A) blood urea, (B) blood creatinine, and (C) heart weight of CD1-pcy/pcy mice after daily intraperitoneal injections for 99 d. $P = NS$ (not significant), one-way t test. $n = 6-7$.

Table S1. Identification of amino acid sequence of mambaquaretin-1

Methods	Sequence, 57 aa
Edman's degradation	RPSFCNLPVKPGPCNGFFSAFYYSQKTNKC
ISD	KPGPCNGFFSAFYYSQKTNKCCHSFTYGGCKGNANRFSTIEKCRRT
MS/MS 1,216.4	CHSFTYGGCK
MS/MS 3,068.4	RPSFCNLPVKPGPCNGFFSAFYYSQK
Prediction	1 5 10 15 20 25 30 35 40 45 50 55 CVG
Full sequence	RPSFCNLPVKPGPCNGFFSAFYYSQKTNKCCHSFTYGGCKGNANRFSTIEKCRRTC

Table S2. Statistics for mambaquaretin-KA structure determination

PDB code 5M4V	
Data collection	
Synchrotron source	ESRF, ID29
Wavelength, Å	0.976251
Space group	P4 ₂ 1 ₂
Unit-cell parameters, Å	63.86, 63.86, 32.98
Molecules/asymmetric unit	1
Resolution, Å	45.14-1.06
R_{meas} , %	8.0
R_{factor} , %	7.8
Mean $I/\sigma(I)$	19.36
$CC_{(1/2)}$, %	100.0
Completeness, %	99.9
Multiplicity	23.76
Refinement	
Resolution, Å	45.14-1.06
No. reflections	29,915
R_{work} , %	13.07
R_{free} , %	15.57
rmsds	
Bond lengths, Å	0.029
Bond angles, °	2.709
Ramachandran*	
Favored, %	64
Outliers, %	0

PDB code 5M4V. *Values from PDB Validation server.

Titre : Premières toxines Kunitz antagonistes du récepteur de type 2 à la vasopressine : étude pharmacodynamique et relations structure-activité

Mots clés : toxine animale, peptide thérapeutique, pharmacologie moléculaire, pharmacodynamie

Résumé : La mambaquarétine-1 (MQ-1), une toxine du mamba vert, est le tout premier peptide Kunitz à bloquer sélectivement l'activité du récepteur de type 2 à la vasopressine (V2R). Celui-ci contrôle la concentration finale des urines dans le rein. Impliqué dans plusieurs pathologies, son inhibition est actuellement considérée comme la meilleure stratégie thérapeutique dans le traitement de la polykystose rénale, une maladie génétique héréditaire. L'étude pharmacodynamique de MQ-1 sur des rats sains a confirmé son activité *in vivo* qui se traduit par un effet aquarétique dépendant de la dose. L'effet maximum est atteint 2 heures après injection intrapéritonéale et disparaît avec un temps de demi-vie biologique variant de 1 à 4 heures selon la dose. L'administration quotidienne d'une faible dose a montré une accumulation de l'effet les trois premiers jours,

avant un plateau, suggérant une activité résiduelle au-delà de 24 heures. Le criblage des trois autres venins de mambas ainsi qu'une analyse comparée des séquences peptidiques les plus proches dans les bases de données ont révélé l'existence d'un groupe phylogénétique de onze toxines Kunitz antagonistes de V2R. Une approche innovante, combinant tests de liaison de variants de MQ-1 et modélisation du complexe MQ-1-V2R, a permis de décrypter une partie du pharmacophore de la toxine. Les deux partenaires partagent une importante complémentarité ionique impliquant plusieurs boucles extracellulaires du récepteur, et une région hydrophobe de MQ-1 interagit au cœur de V2R à proximité de son site orthostérique supposé. Enfin, une première collaboration avec une industrie pharmaceutique a mis en évidence les points critiques à approfondir pour aboutir au développement thérapeutique de MQ-1.

Title: First vasopressin type 2 receptor antagonist Kunitz toxins: pharmacodynamic study and structure-activity relationships

Keywords: animal toxin, therapeutic peptide, molecular pharmacology, pharmacodynamics

Abstract: Mambaquarétin-1 (MQ-1), a green mamba toxin, is the very first Kunitz peptide to selectively hinder the vasopressin type 2 receptor (V2R) activation. This receptor controls the final concentration of urine in kidneys. Involved in a number of pathologies, its inhibition is currently considered as the best therapeutic strategy in the treatment of polycystic kidney disease, a hereditary genetic disease. Pharmacodynamic study of MQ-1 carried out on healthy rats confirmed its *in vivo* activity which consists in inducing a dose-dependent aquaretic effect. Maximum effect is reached 2 hours after an intraperitoneal injection and disappears in a biological half-life ranging from 1 to 4 hours according to the dose. The daily injection of small quantities pointed to a cumulative effect over the first three days, leading to a plateau, which suggests

a residual activity exceeding 24 hours. The screening of the three other mamba venoms along with a comparative analysis of the closest peptide sequences reported in databases revealed the existence of a phylogenetic group of eleven V2R antagonist Kunitz toxins. An innovative approach combining binding assays on MQ-1 variants and the modelling of the MQ-1-V2R complex has led to a partial deciphering of the pharmacophore of the toxin. The two partners share a significant ionic complementarity involving a number of extracellular loops of the receptor, and a hydrophobic region of MQ-1 interacts within V2R in the vicinity of its supposed orthosteric site. Lastly, a collaboration initiated with a pharmaceutical company brought out the need for the closer scrutiny of some crucial points to succeed in a therapeutic development of MQ-1.

