

Deux neuropeptides orphelins trouvent enfin leur récepteur

Les récepteurs à 7 domaines transmembranaires couplés aux protéines G (RCPG), qui constituent le principal système de reconnaissance des variations de la composition chimique du milieu environnant, permettent aux cellules qui les expriment de répondre de façon appropriée aux stimulus extérieurs. Le nombre de gènes codant pour des RCPG est estimé, dans le génome humain, à environ 5 000 dont probablement 2 000 correspondant à des gènes codant pour des récepteurs olfactifs [1]. Pour certains RCPG, le ligand naturel est bien connu: il s'agit soit d'une molécule endogène identifiée (calcium, rétinol, neurotransmetteur conventionnel, peptide ou protéine), soit d'un composé volatil odorant [2]. Pour d'autres RCPG caractérisés par séquençage à grande échelle du génome ou par clonage par homologie de séquence, le ligand endogène reste inconnu. On estime actuellement à plus de 100 le nombre de RCPG orphelins clonés chez l'homme [3]. A titre d'exemple, les chercheurs de la société SmithKline Beecham annonçaient à la fin de 1997 qu'ils avaient réussi à identifier plus de 70 RCPG non encore répertoriés dans les banques de données [3]. Pour la plupart de ces RCPG orphelins, le ligand endogène doit être une hormone peptidique ou un neuropeptide. La caractérisation de ces peptides, ligands naturels des RCPG, constitue donc un enjeu majeur pour le développement de médicaments innovants [3, 4]. Toutefois, l'isolement et la purification de ces peptides à partir d'extraits biologiques sont extrêmement délicats à réaliser, de sorte que le nombre de ligands de RCPG orphelins identifiés à ce jour

reste relativement modeste. En fait, chez les vertébrés, seuls cinq nouveaux peptides ont été découverts en tant que ligands naturels de RCPG: la nociceptine [5], les orexines ([6]; *m/s* 1998, n° 4, p. 498), les prolactin-releasing peptides ([7]; *m/s* 1998, n° 10, p. 1118), l'apéline [8] et, très récemment, la ghréline [9]. A ceux-ci viennent s'ajouter deux « peptides orphelins » dont les récepteurs ont été très récemment identifiés à partir des banques de RCPG orphelins: la *melanin-concentrating hormone* ou MCH ([10, 11]; *m/s* 1999, n° 12, p. 1449) et l'urotensine II [12-15]. L'histoire de ces deux hormones nous rappelle, s'il en était besoin, la pertinence de l'approche comparative pour la découverte de nouveaux neuropeptides.

La MCH et l'urotensine II: une histoire qui se répète

La MCH et l'urotensine II sont deux neurohormones peptidiques qui ont été caractérisées au début des années

1980 chez les poissons téléostéens. La MCH a été d'abord isolée à partir de l'hypophyse du saumon sur la base de son aptitude à concentrer les pigments dans les mélanocytes [16]. Ultérieurement, la MCH a été caractérisée à partir de l'hypothalamus du rat [17] et son précurseur a été cloné chez différentes espèces de poissons et de mammifères, y compris chez l'homme [18]. La MCH est un peptide cyclique qui, chez les poissons, est synthétisé dans les neurones hypothalamiques et libéré dans la circulation générale par les terminaisons nerveuses de la neurohypophyse. L'urotensine II a été initialement isolée à partir de l'urophyse, un organe localisé dans la région caudale de la moelle épinière des poissons téléostéens (*m/s* 1999, n° 5, p. 709) en utilisant la mesure des contractions de la musculature intestinale comme test biologique [19]. L'urotensine II a été ensuite caractérisée à partir du cerveau de la grenouille [20] et son précurseur a été cloné chez différentes

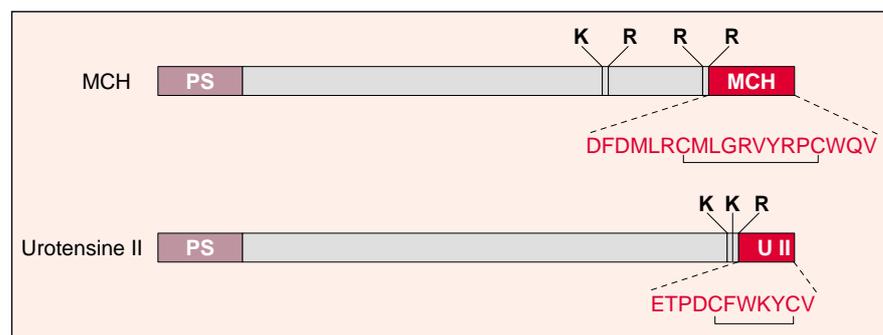


Figure 1. Structures comparées des précurseurs de la MCH et de l'urotensine II, et de leurs peptides mûrs. Les doublets ou triplets d'acides aminés basiques (K: lysine; R: arginine), qui constituent les sites de clivage potentiels par les prohormone-convertases, sont indiqués au-dessus de chaque précurseur. PS: peptide signal; U II: urotensine II.

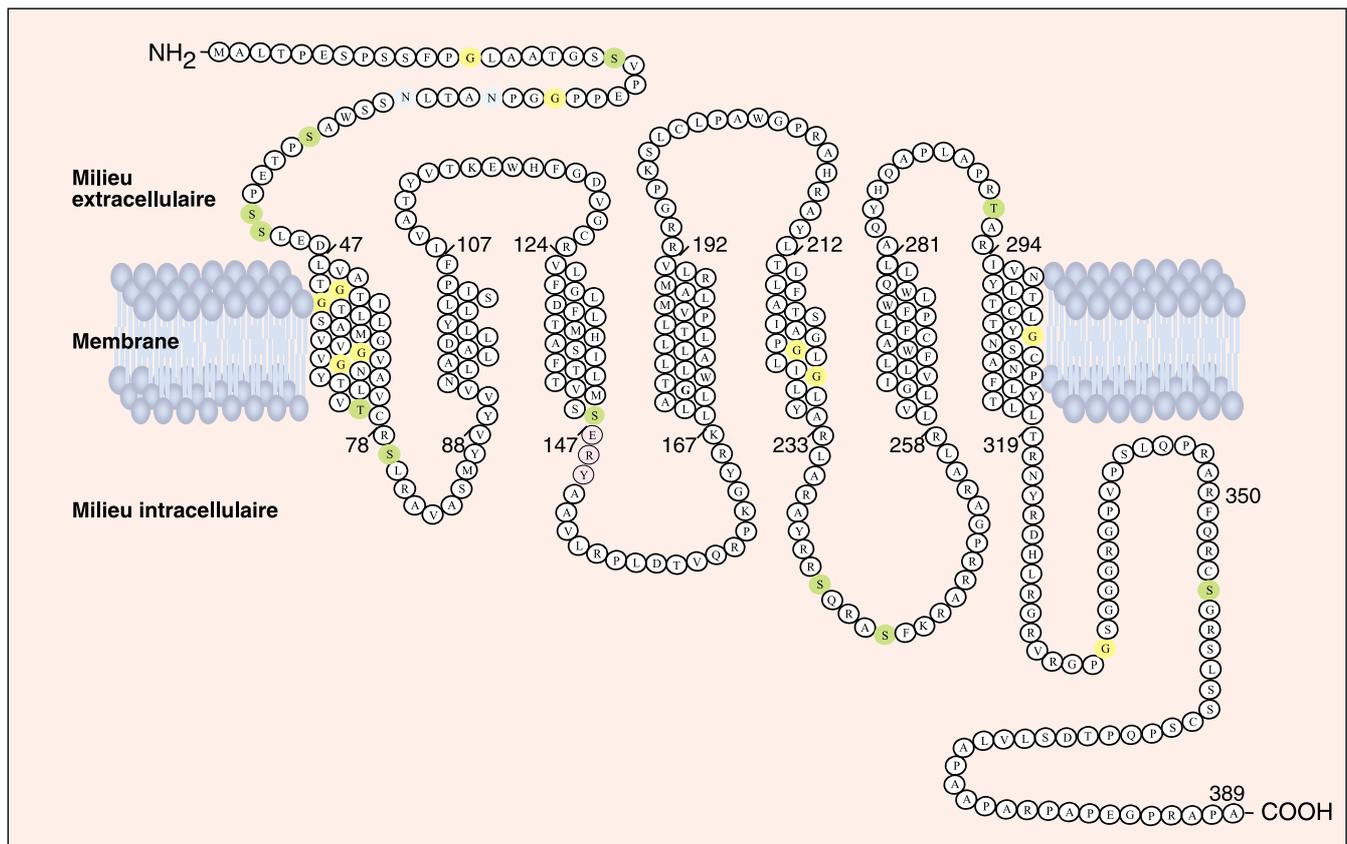


Figure 2. **Modèle de structure du récepteur de l'urotensine II chez l'homme.** Les cercles bleus désignent les sites de N-glycosylation; les cercles jaunes désignent les sites de myristoylation; les cercles verts désignent les sites de phosphorylation sur les sérines ou les thréonines; les cercles roses désignent une séquence très conservée de 3 acides aminés dans les RCPG.

espèces y compris chez l'homme [21]. L'urotensine II est un peptide cyclique qui, chez les poissons, est synthétisé dans des neurones peptidergiques localisés au niveau de la colonne ventrale de la moelle épinière et est libéré dans la circulation générale par des fibres nerveuses qui se projettent dans l'urophyse. Chez toutes les espèces étudiées à ce jour, la MCH et l'urotensine II sont localisées à l'extrémité carboxy-terminale de leur précurseur et la séquence des peptides se termine presque toujours par un résidu valine (figure 1).

Un fort potentiel de valorisation

Chez les mammifères, la MCH est synthétisée essentiellement par des neurones de la région latérale de l'hypothalamus, laquelle est connue

pour son implication dans le contrôle du comportement alimentaire. De fait, l'administration intracérébro-ventriculaire de MCH stimule la prise de nourriture (*m/s 1996, n° 5, p. 625*) et, réciproquement, l'invalidation du gène codant pour le précurseur de la MCH provoque une forte hypophagie (*m/s 1999, n° 2, p. 281*). Le récepteur de la MCH constitue donc une cible potentielle pour le développement de nouveaux médicaments contre l'obésité.

Chez le rat, l'injection intraveineuse d'urotensine II de poisson provoque de fortes variations de la pression artérielle, et la présence de sites de liaison de haute affinité a été mise en évidence au niveau de l'aorte dorsale (*m/s 1999, n° 5, p. 709*). Par ailleurs, le gène codant pour le précurseur de l'urotensine II est principalement

exprimé au niveau des motoneurones de la moelle épinière et du tronc cérébral [21-23], ce qui suggère que le peptide pourrait jouer un rôle au niveau de la jonction neuromusculaire. On pouvait donc s'attendre à ce que le récepteur de l'urotensine II, comme celui de la MCH, suscite un grand intérêt auprès de l'industrie pharmaceutique.

Deux peptides orphelins adoptés par des récepteurs orphelins

La MCH et l'urotensine II ont trouvé récemment « récepteur à leur pied ». La caractérisation du récepteur de la MCH par 5 équipes concurrentes a été, comme il se devait, narrée aux lecteurs de *médecine/science* (*m/s 1999, n° 12, p. 1449*). Nous ne décrivons

donc ici que la découverte du récepteur de l'urotensine II.

L'histoire commence en 1995 avec le clonage d'un nouveau RCPG chez le rat, le bœuf [24] et l'homme [25]. La recherche des analogies de séquence montrait que ce récepteur, désigné par le numéro de code GPR14, était apparenté aux sous-types sst2B et sst4 des récepteurs de la somatostatine. Or l'urotensine II présente certaines analogies structurales avec la somatostatine au niveau de la région cyclique qui est impliquée dans l'activité biologique de ces deux peptides. La transfection du GPR14 humain dans des cellules HEK-293 a permis à une équipe de SmithKline Beecham de cribler une série d'agonistes potentiels en utilisant comme test biologique la mesure des variations de la concentration intracellulaire de calcium [12]. Parmi les 700 composés testés sur ce modèle, seule l'urotensine II a provoqué une forte élévation des taux de calcium cytoplasmique. En l'espace de quelques semaines, trois autres équipes ont confirmé que le ligand naturel de GPR14 est effectivement l'urotensine II [13-15] (figure 2). Parmi ces équipes, on retrouve celle d'Olivier Civelli qui s'était déjà distinguée peu de temps auparavant avec l'identification du récepteur de la MCH, lui aussi apparenté aux récepteurs de la somatostatine (*m/s* 1999, n° 12, p. 1449).

Des récepteurs de haute affinité de l'urotensine II ont été caractérisés par des études de liaison à partir de membranes d'aorte de rat. En accord avec cette observation, il a été montré que l'urotensine II exerce un puissant effet vasomoteur sur l'aorte de rat *in vitro*. Chez les rongeurs, l'action de l'urotensine II semble s'exercer sélectivement sur l'aorte puisque aucun effet n'a été observé sur les artères fémorales et rénales. En revanche, chez les primates, l'urotensine II provoque la contraction de diverses artères, notamment au niveau des muscles squelettiques. L'injection intraveineuse d'une faible dose d'urotensine II chez le singe induit une forte vasoconstriction périphérique associée à une réduction marquée de la contractilité cardiaque conduisant à la mort des animaux [12].

Du gène à la fonction, un long chemin reste à parcourir

L'identification chez l'homme de l'urotensine II [21] et de ses récepteurs [12] constitue sans aucun doute une avancée importante. La localisation des récepteurs de l'urotensine II dans la paroi des artères et les effets pharmacologiques du peptide sur le système cardiovasculaire permettent d'envisager son rôle éventuel dans le contrôle de la pression artérielle et de la fonction cardiaque, ainsi que l'utilisation d'antagonistes pour le traitement des maladies associées à une vasoconstriction périphérique, telles que l'hypertension et l'insuffisance cardiaque. Toutefois, ces études soulèvent plusieurs questions qui restent actuellement sans réponse. Le fait que l'urotensine II soit essentiellement synthétisée au niveau des motoneurons [21-23] alors que ses récepteurs sont surtout exprimés au niveau du pancréas, du cœur et de l'aorte [12] constitue un vrai paradoxe. Chez le porc, deux isoformes moléculaires d'urotensine II qui ne diffèrent que par une seule substitution dans la région amino-terminale ont été caractérisées [14] mais on ne sait pas s'il existe plusieurs variants du peptide chez les autres espèces, notamment chez l'homme. De même, on ignore actuellement si l'urotensine II possède, comme la plupart des autres neuropeptides, plusieurs sous-types de récepteurs. Enfin et surtout, bien que l'urotensine II apparaisse comme l'un des peptides hypertenseurs les plus puissants connus à ce jour [12], ses fonctions restent pour l'instant totalement inconnues. Nul doute que les efforts conjugués des physiologistes, des pharmacologues et des biologistes moléculaires permettront rapidement de résoudre plusieurs de ces énigmes.

RÉFÉRENCES

1. Marchese A, George SR, Kolakowski LF, Lynch KR, O'Dowd BF. Novel GPCRs and their endogenous ligands: expanding the boundaries of physiology and pharmacology. *Trends Pharmacol Sci* 1999; 20: 370-5.
2. Bockaert J, Pin JP. Utiliser un récepteur couplé aux protéines G pour communiquer. Un succès évolutif. *CR Acad Sci Paris* 1998; 321: 529-51.

Hubert Vaudry
Yolaine Coulouarn
Isabelle Lihmann
Marie-Christine Tonon
Nicolas Chartrel

Inserm U. 413, Institut fédératif de recherches multidisciplinaires sur les peptides n° 23, Université de Rouen, 76821 Mont-Saint-Aignan, France.

Vincent Richard
Christian Thuillez

Inserm E. 9920, Institut fédératif de recherches multidisciplinaires sur les peptides n° 23, Université de Rouen, 76183 Rouen, France.

Jean-Louis Nahon

Cnrs, UPR 411, Université de Nice-Sophia-Antipolis, 660, route des Lucioles, 06560 Valbonne, France.

Jean-Claude Beauvillain

Inserm U. 422, Cité hospitalière, place de Verdun, 59045 Lille, France.

3. Wilson S, Bergsma DJ, Chambers JK, *et al.* Orphan G-protein-coupled receptors: the next generation of drug targets? *Br J Pharmacol* 1998; 125: 1387-92.

4. Stadel JM, Wilson S, Bergsma DJ. Orphan G protein-coupled receptors: a neglected opportunity for pioneer drug discovery. *Trends Pharmacol Sci* 1997; 18: 430-7.

5. Meunier JC, Mollereau C, Toll L, *et al.* Isolation and structure of the endogenous agonist of opioid receptor-like ORL1 receptor. *Nature* 1995; 377: 532-5.

6. Sakurai T, Amemiya A, Ishii M, *et al.* Orexins and orexin receptors: a family of hypothalamic neuropeptides and G protein-coupled receptors that regulate feeding behavior. *Cell* 1998; 92: 573-85.

7. Hinuma S, Habata Y, Fujii R, *et al.* A prolactin-releasing peptide in the brain. *Nature* 1998; 393: 272-6.

8. Tatemoto K, Hosoya M, Habata Y, *et al.* Isolation and characterization of a novel endogenous peptide ligand for the human APJ receptor. *Biochem Biophys Res Commun* 1998; 251: 471-6.

9. Kojima M, Hosoda H, Date Y, Nakazato M, Matsuo H, Kangawa K. Ghrelin is a growth-hormone-releasing acylated peptide from stomach. *Nature* 1999; 402: 656-60.

RÉFÉRENCES

10. Chambers J, Ames RS, Bergsma D, *et al.* Melanin-concentrating hormone is the cognate ligand for the orphan G-protein-coupled receptor SLC-1. *Nature* 1999; 400: 261-5.
11. Saito Y, Nothacker HP, Wang Z, Lin SHS, Leslie F, Civelli O. Molecular characterization of the melanin-concentrating-hormone receptor. *Nature* 1999; 400: 265-9.
12. Ames RS, Sarau HM, Chambers JK, *et al.* Human urotensin-II is a potent vasoconstrictor and agonist for the orphan receptor GPR14. *Nature* 1999; 401: 282-6.
13. Nothacker HP, Wang Z, McNeill AM, *et al.* Identification of the natural ligand of an orphan G-protein-coupled receptor involved in the regulation of vasoconstriction. *Nat Cell Biol* 1999; 1: 383-5.
14. Mori M, Sugo T, Abe M, *et al.* Urotensin II is the endogenous ligand of a G-protein-coupled orphan receptor, SENR (GPR14). *Biochem Biophys Res Commun* 1999; 265: 123-9.
15. Liu Q, Pong SS, Zeng Z, *et al.* Identification of urotensin II as the endogenous ligand for the orphan G-protein-coupled receptor GPR14. *Biochem Biophys Res Commun* 1999; 266: 174-8.
16. Kawauchi H, Kawazoe I, Tsubokawa M, Kishida M, Baker BL. Characterization of melanin-concentrating hormone in chum salmon pituitaries. *Nature* 1983; 305: 321-3.
17. Vaughan JM, Fischer WH, Hoeger C, Rivier J, Vale W. Characterization of melanin-concentrating hormone from rat hypothalamus. *Endocrinology* 1989; 125: 1660-5.
18. Presse F, Nahon JL, Fischer WH, Vale W. Structure of the human melanin-concentrating hormone mRNA. *Mol Endocrinol* 1990; 4: 632-7.
19. Pearson D, Shively JE, Clark BR, *et al.* Urotensin II: a somatostatin-like peptide in the caudal neurosecretory system of fishes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1980; 77: 5021-4.
20. Conlon JM, O'Harte F, Smith DD, Tonon MC, Vaudry H. Isolation and primary structure of urotensin II from the brain of a tetrapod, the frog *Rana ridibunda*. *Biochem Biophys Res Commun* 1992; 188: 578-83.
21. Coulouarn Y, Lihrmann I, Jegou S, *et al.* Cloning of the cDNA encoding the urotensin II precursor in frog and human reveals intense expression of the urotensin II gene in motoneurons of the spinal cord. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95: 15803-8.
22. Chartrel N, Conlon JM, Collin F, *et al.* Urotensin II in the central nervous system of the frog *Rana ridibunda*: immunohistochemical localization and biochemical characterization. *J Comp Neurol* 1996; 364: 324-39.
23. Coulouarn Y, Jegou S, Tostivint H, Vaudry H, Lihrmann I. Cloning, sequence analysis and tissue distribution of the mouse and rat urotensin II precursors. *FEBS Lett* 1999; 457: 28-32.
24. Tal M, Ammar DA, Karpuj M, Krizhanovsky V, Naim M, Thompson DA. A novel putative neuropeptide receptor expressed in neural tissue, including sensory epithelia. *Biochem Biophys Res Commun* 1995; 209: 752-9.
25. Marchese A, Heiber M, Nguyen T, *et al.* Cloning and chromosomal mapping of three novel genes, GPR9, GPR10, and GPR14, encoding receptors related to interleukin 8, neuropeptide Y, and somatostatin receptors. *Genomics* 1995; 29: 335-44.

TIRÉS À PART

H. Vaudry.

BRÈVES

■■■ **Tolérance et dépendance à la morphine: quel rôle pour l'endocytose des récepteurs ?** L'activation, par un ligand agoniste, d'un récepteur à sept domaines transmembranaires couplé aux protéines G (GPCR) entraîne sa phosphorylation et accélère son internalisation. Ce processus met en jeu les arrestines, protéines d'échafaudage qui chélatent le récepteur phosphorylé dans des vésicules d'internalisation associées au cytosquelette [1]. Cette endocytose diminue le nombre des récepteurs présents à la membrane, ce qui rend la cellule insensible à l'agoniste. Dans le cas des récepteurs opiacés, ce processus pourrait expliquer la survenue d'une tolérance aux opiacés observée en pratique clinique, mais elle n'explique pas le phénomène de dépendance. Or, des travaux récents montrent que la morphine n'induit pas l'endocytose des récepteurs opiacés [2]. A la lumière de ces travaux, Whistler *et al.* [3] ont émis l'hypothèse selon laquelle les propriétés addictives d'une substance seraient fonction du rapport entre son efficacité pharmacologique et sa capacité d'induire

l'endocytose des récepteurs, rapport appelé RAVE (*relative activity versus endocytosis*). Un RAVE élevé témoignerait de propriétés addictives importantes. Les auteurs ont testé cette hypothèse en utilisant la morphine et la méthadone, un faible agoniste opiacé utilisé en thérapeutique de substitution chez les patients toxicomanes et dont le potentiel addictif est réduit. La morphine active beaucoup plus efficacement les récepteurs opiacés que la méthadone, mais c'est l'inverse qui est vrai quant à la capacité de ces ligands d'induire la phosphorylation du récepteur, la séquestration de la β -arrestine au niveau du récepteur et son internalisation. Dans les modèles cellulaires utilisés, la méthadone induit beaucoup plus efficacement que la morphine le processus d'endocytose. Il faut certainement confirmer l'implication de RAVE dans la tolérance et la dépendance, mais d'ores et déjà le rôle de l'endocytose des récepteurs dans ces phénomènes est malmené par ces travaux [4]. Pour Whistler *et al.*, l'internalisation et la désensibilisation du récepteur n'expliqueraient pas la tolé-

rance et la dépendance mais protégeraient plutôt la cellule d'une exposition trop importante à la drogue. Cela ne se produit pas avec la morphine qui n'induit pas l'endocytose du récepteur. Dans ce cas, la cellule et les effecteurs intracellulaires sont en permanence exposés à la morphine. Cela pourrait induire une modification compensatoire de l'état d'équilibre des systèmes de signalisation, ce qui a été démontré dans le cas de la voie de l'AMP cyclique [5], par exemple, dans laquelle une surexpression des enzymes contrôlant cette cascade a été observée après application chronique de la morphine. L'état de dépendance résulterait de ces modifications.

- [1. Ferguson S, *et al.* *Science*, 1996; 271: 363-6.]
[2. Keith DE, *et al.* *J Biol Chem* 1996; 271: 19021-4.]
[3. Whistler JL, *et al.* *Neuron* 1999; 23: 737-46.]
[4. Roth BL, Willins DL. *Neuron* 1999; 23: 629-31.]
[5. Lane-Ladd SB, *et al.* *J Neurosci* 1997; 17: 7890-901.]