

La pharmacologie inverse marque des points : découverte d'un nouveau peptide stimulant la sécrétion de prolactine

Le clonage à grande échelle de nouveaux récepteurs à 7 domaines transmembranaires a ouvert la voie à une nouvelle discipline connue sous le nom de pharmacologie inverse [1]. La démarche consiste, après avoir caractérisé un récepteur orphelin, à rechercher le ligand naturel pour ce récepteur. Lorsqu'il s'agit de récepteurs pour les neurotransmetteurs conventionnels, l'identification du ligand est généralement aisée. En revanche, la tâche est beaucoup plus complexe et le résultat plus incertain quand le ligand du récepteur est un peptide. Complexe, incertain... mais certainement pas impossible comme le démontrent plusieurs travaux récents qui ont permis l'identification de nouveaux neuropeptides [2-5], lesquels ont reçu comme il se devait les honneurs des colonnes de *médecine/sciences* (*m/s* 1996, n° 1, p. 116; 1998, n° 4, p. 498). Un nouvel exemple de la pertinence de cette approche vient de nous être fourni par une équipe de scientifiques japonais de l'entreprise pharmaceutique Takeda [6].

L'histoire commence en 1995 avec la publication de la séquence d'un récepteur orphelin à 7 domaines transmembranaires apparenté aux récepteurs de l'interleukine-8, du neuropeptide Y et de la somatostatine [7, 8]. Les chercheurs japonais ont observé que le taux d'expression de ce récepteur est particulièrement élevé dans le lobe antérieur de l'hypophyse, suggérant qu'il pourrait être impliqué dans le contrôle des sécrétions adénohypophysaires [6]. Ils ont alors décidé de rechercher le ligand pour ce récepteur et ils ont ainsi isolé, à partir d'un extrait d'hypothalamus de bœuf, un peptide

de 29 acides aminés et un analogue de 19 acides aminés tronqué dans la région amino-terminale qui stimulent tous deux le métabolisme de l'acide arachidonique dans les cellules CHO transfectées avec l'ADNc du récepteur.

À partir de ces séquences peptidiques partielles, ils ont pu synthétiser des oligonucléotides dégénérés qui leur ont permis de cloner l'ADNc codant pour le précurseur du peptide chez le bœuf, le rat et l'homme. La séquence des protéines correspondantes est tout à fait conforme à la structure canonique des précurseurs

des neuropeptides (*figure 1*). Le précurseur est constitué d'une séquence signal, du peptide biologiquement actif dont la séquence est très conservée chez les trois espèces, d'un triplet d'acides aminés basiques également conservé, et d'un peptide flanquant en position carboxy-terminale, dont la longueur et la structure primaire sont variables.

Le peptide biologiquement actif est constitué de 32 acides aminés et présente un résidu glycine en position carboxy-terminale, de sorte que la forme mûre pourrait correspondre à un peptide de 31 acides aminés qui

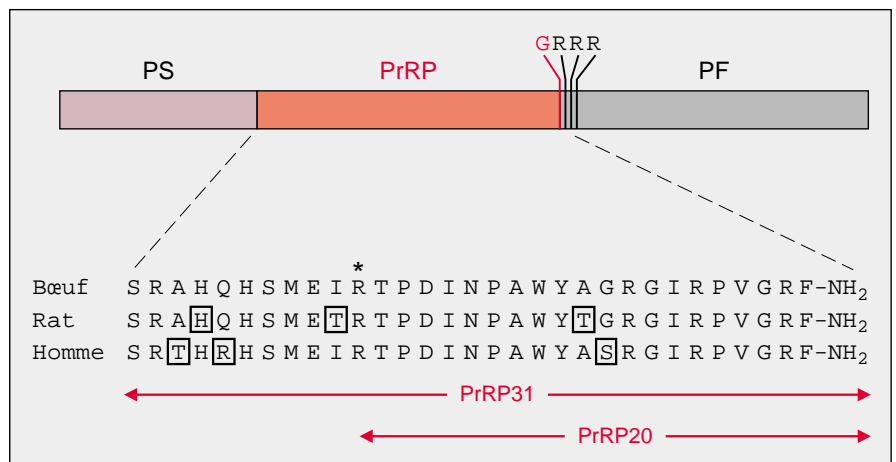


Figure 1. Structure du précurseur du prolactin-releasing peptide. Chez les trois espèces étudiées, le prépro-PrRP est constitué d'un peptide signal (PS), du PrRP31, d'un résidu glycine, d'un triplet de résidus arginine et d'un peptide flanquant carboxy-terminale (PF) de longueur variable. Les séquences des PrRP31 du bœuf, du rat et de l'homme sont indiquées. Les acides aminés variables sont entourés d'un carré. Le résidu glycine situé entre le PrRP31 et le triplet d'arginines est probablement utilisé pour l'amidation du résidu phénylalanine du PrRP. Le résidu arginine en position 10 (astérisque) est susceptible d'être clivé pour donner naissance à une forme courte biologiquement active, le PrRP20. Code à une lettre des acides aminés : A : Ala ; C : Cys ; D : Asp ; E : Glu ; F : Phe ; G : Gly ; H : His ; I : Ile ; K : Lys ; L : Leu ; M : Met ; N : Asn ; P : Pro ; Q : Gln ; R : Arg ; S : Ser ; T : Thr ; V : Val ; W : Trp ; Y : Tyr.

serait amidé sur la phénylalanine carboxy-terminale. Le peptide de 29 acides aminés purifié à partir du cerveau de bœuf n'était donc qu'un fragment du peptide natif tronqué en position carboxy-terminale. Une arginine en position 11 permet éventuellement un clivage pour former un peptide de 20 acides aminés correspondant à la région carboxy-terminale de la forme longue de 31 acides aminés. Curieusement, la séquence carboxy-terminale Arg-Phe-NH₂ se retrouve dans de nombreux autres neuropeptides tels que la g1-MSH, l'ACEP-1, le neuropeptide F ou le FMRFamide. Un motif très semblable, Arg-Tyr-NH₂, est présent dans plusieurs autres peptides et en particulier dans tous les membres de la famille du polypeptide pancréatique (PP, NPY, PYY et SPYY).

Les chercheurs ont synthétisé les peptides de 20 et 31 acides aminés et ont confirmé qu'ils mimaient l'un et l'autre l'activité des peptides naturels purifiés sur le métabolisme de l'acide arachidonique dans les cellules transfectées avec l'ADNc du récepteur orphelin. En utilisant comme traceur le peptide de 31 acides aminés radioiodé, ils ont montré que les récepteurs transfectés ont pour celui-ci une très forte affinité ($K_d = 2,5 \times 10^{-11}$ M) et ils ont mis en évidence l'importance de la fonction amide sur la phénylalanine carboxy-terminale pour la liaison du peptide à son récepteur. Ils ont enfin montré que le peptide stimule la libération de prolactine par des cellules lactotropes tumorales et par des cellules antéhypophysaires normales. Eu égard à cette activité hypophysiotrope, ils ont proposé le nom de *prolactin-releasing peptide* (PrRP) pour désigner ces nouveaux neuropeptides. La comparaison des courbes dose-réponse du PrRP et de la thyrolibérine (TRH) révèle que l'activité de ces deux peptides sur la sécrétion de prolactine est identique. L'effet stimulateur du PrRP sur les cellules antéhypophysaires en culture primaire est bloqué par un inhibiteur de la phospholipase A2, le 4-bromophénacylbromide, et par un inhibiteur de la lipoxigénase, l'acide nordihydroguaiarétique, mais non par l'indométhacine, un inhibiteur de la

cyclooxygénase, ce qui indique que les prostanoïdes de la voie de la lipoxigénase seraient impliqués dans la réponse des cellules lactotropes au peptide.

De toutes les hormones hypophysaires, la prolactine est sans aucun doute celle dont la sécrétion est soumise aux mécanismes de régulation les plus complexes (figure 2). Outre la dopamine qui exerce un puissant effet inhibiteur sur la libération de prolactine, de nombreux neurotransmetteurs et divers neuropeptides peuvent moduler l'activité des cellules lactotropes [7]. Il est difficile de dire, à l'heure actuelle quelle peut être la signification physiologique du PrRP dans le cortège des différents facteurs susceptibles de contrôler la sécrétion de prolactine. D'autres études seront nécessaires avant que le PrRP puisse être considéré comme une authentique neurohormone hypophysiotrope. L'une d'elles, et non la moindre, sera de montrer que

le PrRP est contenu dans des neurones hypothalamiques dont les axones se terminent au voisinage des capillaires du système porte dans l'éminence médiane.

L'histoire de la découverte du PrRP n'est pas sans rappeler celle du *pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide* (PACAP), caractérisé à partir d'un extrait d'hypothalamus en raison de son effet stimulateur de la production d'AMPc au niveau hypophysaire [8]. Ultérieurement, il a été montré que le PACAP exerce de nombreux effets au niveau central et dans divers tissus périphériques [9]. Il ne serait pas surprenant que, à l'instar du PACAP, l'action hypophysiotrope du PrRP ne soit qu'une anecdote et que le peptide joue d'autres rôles que celui d'une neurohormone. Le fait que, chez le rat, le PrRP et ses récepteurs soient exprimés massivement dans le bulbe rachidien [6] semble valider cette hypothèse.

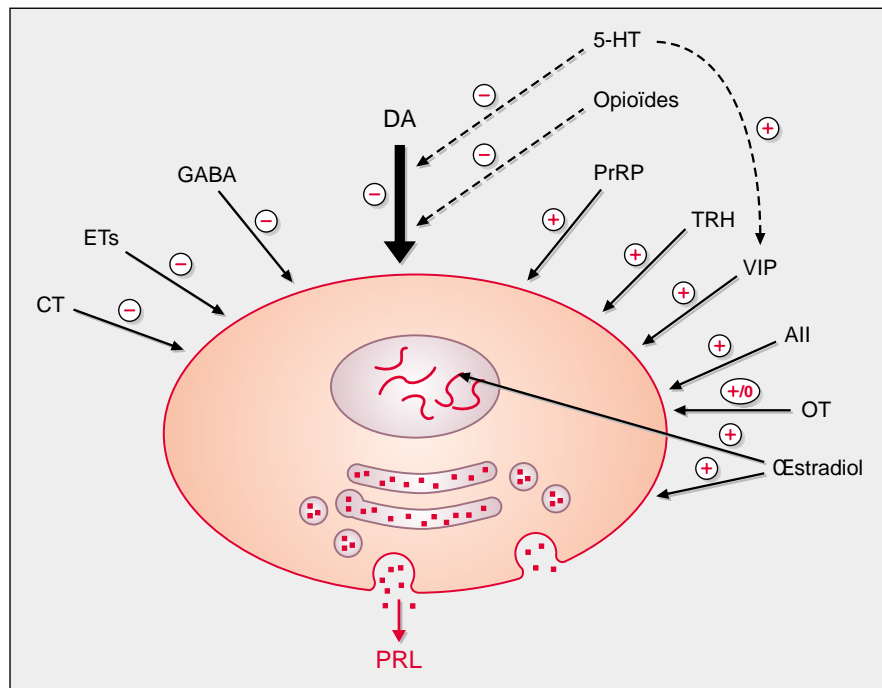


Figure 2. **Représentation des principaux facteurs impliqués dans le contrôle de l'activité des cellules lactotropes.** Les effets directs sont indiqués par des flèches continues et les effets indirects par des flèches discontinues. L'effet prédominant, stimulateur ou inhibiteur, est indiqué par les symboles + et - respectivement. AII: angiotensine II; CT: calcitonine; DA: dopamine; ETs: endothélines; GABA: acide gamma-aminobutyrique; OT: oxytocine; PRL: prolactine; PrRP: prolactin-releasing peptide; TRH: thyrolibérine; VIP: vasoactive intestinal polypeptide.

Contrairement aux autres hormones hypophysaires, dont le rôle est généralement conservé chez tous les vertébrés, les fonctions de la prolactine ont considérablement varié au cours de l'évolution, de sorte qu'il est difficile d'identifier le dénominateur commun entre ces différentes fonctions. Ainsi, chez les poissons euryhalins, la prolactine est impliquée dans l'adaptation des animaux aux changements de salinité [10]. Chez les larves d'amphibiens, la prolactine exerce un puissant effet inhibiteur de la métamorphose [11]. Chez les mammifères, la prolactine contrôle le développement de la glande mammaire et la synthèse des protéines du lait, mais elle agit également chez le mâle sur la sécrétion de testostérone [12]. Malgré ce très large spectre d'action, les mécanismes neuroendocriniens de régulation de la sécrétion de prolactine ont été remarquablement bien préservés au cours de l'évolution [13]. Il serait donc particulièrement intéressant de savoir si la structure du PrRP est conservée chez les vertébrés et si le peptide exerce la même activité hypophysiotrope des poissons jusqu'aux mammifères. La découverte de nouveaux peptides à partir de récepteurs orphelins est un domaine en plein essor [14, 15].

Le clonage de centaines, voire de milliers de récepteurs à 7 domaines transmembranaires représente un défi sans précédent pour les chercheurs qui s'attachent à caractériser de nouveaux peptides régulateurs naturels [16]. C'est aussi un enjeu crucial pour l'industrie pharmaceutique qui devrait pouvoir identifier de nouvelles cibles thérapeutiques grâce à cette stratégie de pharmacologie inverse.

**H.V.
B.B.
N.C.**

1. Mills A, Duggan MJ. Orphan seven transmembrane domain receptors: reversing pharmacology. *Trends Pharmacol Sci* 1993; 14: 394-6.
2. Meunier JC, Mollereau C, Toll L, Suaudeau C, Moisand C, Alvinerie P, Butour JL, Guillemot JC, Ferrara P, Monsarrat B, Mazarguil H, Vassart G, Parmentier M, Costentin J. Isolation and structure of the endogenous agonist of opioid receptor-like ORL1 receptor. *Nature* 1995; 377: 532-5.
3. Reinscheid RK, Nothacker HP, Bourson A, et al. Orphanin FQ: a neuropeptide that activates an opioid-like G protein-coupled receptor. *Science* 1995; 270: 792-4.
4. Cox KJA, Tensen CP, Van der Schors RC, et al. Cloning, characterization, and expression of a G-protein-coupled receptor from *Lymnaea stagnalis* and identification of a leucokinin-like peptide, PSFHSWSamide, as its endogenous ligand. *J Neurosci* 1997; 17: 1197-205.
5. 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.

6. Hinuma S, Habata Y, Fujii R, et al. A prolactin-releasing peptide in the brain. *Nature* 1998; 393: 272-6.
7. Ben-Jonathan N, Laudon M, Garris PA. Novel aspects of posterior pituitary function: regulation of prolactin secretion. *Front Neuroendocrinol* 1991; 12: 231-77.
8. Miyata A, Arimura A, Dahl RR, et al. Isolation of a novel 38 residue-hypothalamic polypeptide which stimulates adenylate cyclase in pituitary cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1989; 164: 567-74.
9. Gonzalez BJ, Basille M, Vaudry D, Fournier A, Vaudry H. Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide. *Ann Endocrinol* 1998 (sous presse).
10. Prunet P, Avella M, Fostier A, Björnsson BT, Boeuf G, Haux C. Roles of prolactin in salmonids. In: Epple A, Scanes CG, Stetson MH, eds. *Progress in Comparative Endocrinology*. New York: Willey-Liss, Inc, 1990: 547-52.
11. Kikuyama S, Kawamura K, Tanaka S, Yamamoto K. Aspects of amphibian metamorphosis: hormonal control. *Int Rev Cytol* 1993; 145: 105-48.
12. Bole-Feysot C, Goffin V, Edery M, Binart N, Kelly PA. Prolactin (PRL) and its receptor: actions, signal transduction pathways and phenotypes observed in PRL receptor knockout mice. *Endocr Rev* 1998; 19: 225-68.
13. Sharp PJ. Comparative regulation of prolactin secretion. In: Kawashima S, Kikuyama S, eds. *Advances in Comparative Endocrinology*. Italy: Munduzzi Editore 1997: 951-5.
14. 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.
15. Meunier JC. Working backwards to find answers. *Nature* 1998; 393: 211-2.
16. Chartrel N, Braun B, Collin F, et al. Stratégie d'identification de nouveaux neuropeptides. *CR Soc Biol* 1998 (sous presse).