

La ghréline, un nouveau neuropeptide stimulant la sécrétion de l'hormone de croissance

La sécrétion de l'hormone de croissance (GH) par les cellules somatotropes hypophysaires est soumise à un contrôle hypothalamique complexe, à la fois inhibiteur et stimulateur. Deux neuropeptides impliqués dans ce double mécanisme de régulation – la somatostatine et la *growth hormone-releasing hormone* (GHRH) – ont été identifiés en 1973 et 1982 par les équipes de Roger Guillemin et Wylie Vale en utilisant le test classique de la libération de GH par les cellules antéhypophysaires en culture [1-3]. Par une approche de pharmacologie inverse, une équipe japonaise vient de caractériser un nouveau peptide régulateur de la sécrétion de GH, la ghréline [4]. La démarche qui a conduit à l'identification de ce nouveau neuropeptide est à plusieurs points de vue remarquable.

De la GHRH à la ghréline

L'histoire de la ghréline commence au début des années 1980, avant même l'identification de la GHRH, par la découverte d'un hexapeptide de synthèse His-DTrp-Ala-Trp-DPhe-Lys-NH₂, capable de stimuler la sécrétion de GH et dénommé *GH-releasing peptide-6* (GHRP-6) [5]. L'étude des mécanismes de transduction a rapidement montré que la GHRH et le GHRP-6 agissent par l'intermédiaire de récepteurs distincts: la GHRH stimule la sécrétion de GH *via* l'activation d'une protéine-kinase A alors que le GHRP-6 active la voie de la protéine-kinase C [6, 7]. Par ailleurs, un certain nombre de composés non peptidiques qui stimulent la libération de GH se comportent comme des agonistes sélectifs des récepteurs du GHRP-6 dans la mesure où ils

agissent en synergie avec la GHRH mais n'ont pas d'effet additif sur la réponse au GHRP-6 [8]. En utilisant l'un de ces peptidomimétiques, le MK-0677, les chercheurs du groupe Merck sont parvenus à cloner les récepteurs du GHRP-6 chez l'homme et le porc [9], démontrant ainsi de façon définitive l'existence de récepteurs distincts pour le GHRH et le GHRP-6.

Le récepteur du GHRP-6, encore appelé *growth hormone secretagogue receptor* (GHS-R), appartient à la superfamille des récepteurs à 7 domaines transmembranaires couplés aux protéines G (RCPG) et présente une assez forte identité de séquence avec les RCPG de la neurotensine et de la thyrolibérine (TRH). Mais aucune affinité de GHS-R pour les peptides biologiquement actifs caractérisés à ce jour n'avait pu être mise en évidence et ce récepteur constituait donc un RCPG orphelin singulier puisque plusieurs agonistes artificiels avaient pu être synthétisés alors même que le ligand naturel restait inconnu. Dans la cour des géants de l'industrie pharmaceutique qui cherchaient à identifier le ligand endogène de GHS-R, c'est l'équipe académique japonaise de Kenji Kangawa qui est venue arbitrer la partie [4].

Le premier neuropeptide acylé connu à ce jour

Selon une approche maintenant classique, des cellules tumorales transfectées avec le GHS-R ont servi à cribler des fractions purifiées d'homogénats tissulaires en mesurant les variations de la concentration de calcium intracellulaire ([Ca²⁺]_i) induites par le ligand endogène que les auteurs

cherchaient à identifier et qu'ils ont dénommé ghréline (du sanscrit *ghre* qui signifie croître). Une étude préliminaire a montré que les taux les plus élevés de ghréline étaient présents dans l'estomac. Après un certain nombre d'étapes de chromatographie d'un extrait d'estomac de rat, un composé a été purifié jusqu'à homogénéité. L'identification de sa séquence a montré que la ghréline est un peptide de 28 acides aminés. La recherche d'analogies de séquences dans les bases de données a permis de trouver un EST (*expressed sequence tag*) de rat, ce qui a grandement facilité la caractérisation de l'ADNc codant pour son précurseur. Chez le rat et chez l'homme, la prépro-ghréline est une protéine de 117 acides aminés munie d'un peptide signal de 23 acides aminés, la ghréline étant localisée à l'extrémité amino-terminale du précurseur (*figure 1*). Comme on pouvait s'y attendre, la structure primaire de la ghréline est très conservée, avec seulement deux substitutions entre les séquences murines et humaines. De façon plus surprenante, la séquence du peptide carboxy-terminal flanquant la ghréline est également très conservée, suggérant que ce peptide pourrait, lui aussi, exercer une activité biologique.

Toutefois, la caractérisation chimique de la ghréline allait s'avérer plus compliquée qu'il n'y paraissait. Tout d'abord, au cours du séquençage du peptide, la nature de l'acide aminé en position 3 n'avait pas pu être élucidée, et seul le clonage de l'ADNc a permis de déterminer qu'il s'agit d'un résidu sérine. Par ailleurs, la masse moléculaire du peptide naturel est supérieure à celle prédite

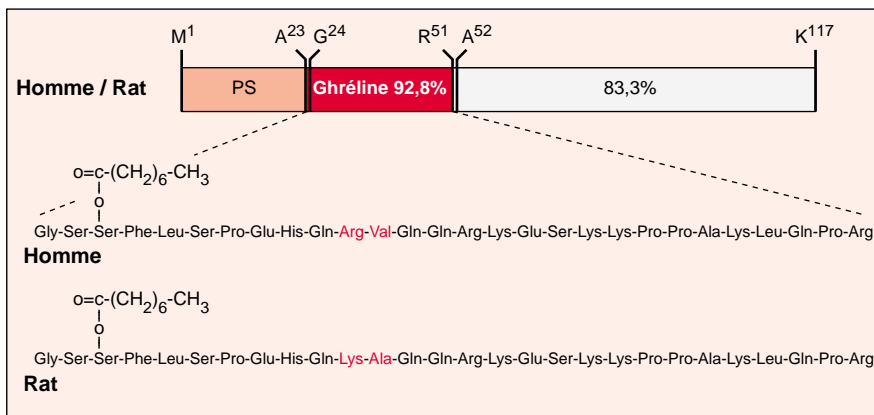


Figure 1. **Structures comparées des précurseurs de la ghréline et des peptides matures chez le rat et l'homme.** Les acides aminés qui délimitent chaque peptide sont figurés (A : alanine ; G : glycine ; K : lysine ; M : méthionine ; R : arginine). Le résidu arginine en position 51 constitue un site de clivage potentiel par les pro-hormone-convertases. Les pourcentages indiquent les degrés d'identité entre les séquences humaine et de rat. Les deux acides aminés substitués sont indiqués en rouge. PS : peptide signal.

par la séquence, et l'analyse chromatographique a révélé que le peptide natif est plus hydrophobe que la réplique synthétique. Enfin, contrairement à la ghréline naturelle, le peptide synthétique ne provoque aucune augmentation des taux de calcium intracellulaire. L'ensemble de ces observations suggèrerait l'existence d'une modification post-traductionnelle en position 3, nécessaire pour l'activité biologique de la ghréline. De fait, chez le rat comme chez l'homme, le groupement hydroxyle du résidu Ser³ est substitué par un radical octanoyl (figure 1).

La ghréline rejoint la grande famille des brain-gut peptides

La ghréline satisfait à la plupart des critères requis pour être admise dans le cercle très restreint des neuropeptides hypothalamiques hypophysiotropes. Sur des cellules CHO transfectées avec le GHS-R, la ghréline augmente de façon dépendante de la dose la [Ca²⁺]_i et cet effet est bloqué par un antagoniste sélectif, le [DLys³]GRHP-6. La ghréline stimule *in vitro* la sécrétion de GH par les cellules antéhypophysaires de rat en culture primaire, la courbe dose-réponse étant tout à fait comparable à celle obtenue avec la GHRH. *In*

vivo, l'administration intraveineuse de ghréline entraîne une très forte augmentation des taux de GH plasmatique, sans modifier les concentrations des autres hormones hypophysaires. Enfin, le marquage immuno-histochimique montre que, dans le cerveau du rat, les corps cellulaires produisant la ghréline sont principalement localisés dans le noyau arqué, région de l'hypothalamus médio-basal dont les neurones se projettent massivement vers l'éminence médiane.

Toutefois, l'analyse par *Northern blot* révèle que l'estomac est de loin l'organe où les ARNm de la ghréline sont le plus fortement exprimés. Au sein de la paroi gastrique, la ghréline est produite dans des cellules endocrines et la concentration plasmatique de ghréline étant particulièrement élevée (> 100 fmol/ml), on peut raisonnablement envisager que la ghréline, libérée dans la circulation générale par les cellules gastriques, pourrait agir au niveau hypophysaire pour stimuler la sécrétion de GH.

Un pas important est franchi... et de nouvelles questions sont soulevées

Parmi les différentes stratégies actuellement mises en œuvre pour décou-

vrir de nouveaux neuropeptides, celle qui a mené à l'identification de la ghréline restera marquée d'une pierre blanche. La simple observation d'une activité pharmacologique d'un hexapeptide de synthèse sur la libération de GH a permis successivement le développement de ligands non peptidiques, la caractérisation du récepteur hypophysaire et enfin la découverte du ligand naturel. L'identification de la ghréline constitue une étape importante dans la compréhension des mécanismes de régulation de la fonction somatotrope, mais elle soulève en même temps plusieurs questions qu'il convient maintenant de résoudre. En particulier, l'acylation du résidu sérine constitue une modification post-traductionnelle inédite qui s'avère essentielle pour l'activité biologique du peptide. Il convient donc de caractériser le processus enzymatique qui permet l'addition du groupement octanoyl et de rechercher l'existence éventuelle d'autres neuropeptides acylés. Le fait que la ghréline et le GHR-S soient exprimés dans le noyau arqué, où sont également localisés les neurones à GHRH, suggère l'existence d'interactions entre les deux systèmes de stimulation de la libération de GH. Par ailleurs, la production massive de ghréline par les cellules endocrines de la muqueuse gastrique permet d'envisager l'existence d'une voie nouvelle de régulation de la sécrétion de GH. Au niveau périphérique, le GHS-R est exprimé non seulement dans l'hypophyse, mais aussi dans le cœur, le poumon, le pancréas, l'intestin et le tissu adipeux, ce qui suggère que la ghréline, à l'instar de nombreux neuropeptides produits à la fois dans le cerveau et le tube digestif, pourrait exercer diverses fonctions modulatrices, notamment au niveau du système cardiovasculaire et dans le contrôle du métabolisme. Enfin, bien que la recherche des analogies de séquence indique que la ghréline n'est apparentée à aucun peptide identifié à ce jour, il est probable que la ghréline, comme la plupart des autres neuropeptides, appartient à une famille multigénique dont les autres membres restent à découvrir.

1. Brazeau P, Vale W, Burgus R, Ling N, Butcher M, Rivier J, Guillemin R. Hypothalamic polypeptide that inhibits the secretion of immunoreactive pituitary growth hormone. *Science* 1973; 129: 77-9.
2. Guillemin R, Brazeau P, Bohlen P, Esch F, Ling N, Wehrenberg WB. Growth hormone-releasing factor from a human pancreatic tumor that caused acromegaly. *Science* 1982; 218: 585-97.
3. Rivier J, Spiess J, Thorner MO, Vale W. Characterization of a growth hormone-releasing factor from a human pancreatic islet tumor. *Nature* 1982; 300: 276-8.
4. 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.
5. Momany FA, Bowers CY, Reynolds GA, Chang D, Hong A, Newlander K. Design, synthesis and

biological activity of peptides which release growth hormone *in vitro*. *Endocrinology* 1981; 108: 31-9.

6. Bilezikjian LM, Vale WW. Stimulation of adenosine 3',5'-monophosphate production by growth hormone-releasing factor and its inhibition by somatostatin in anterior pituitary cells *in vitro*. *Endocrinology* 1983; 113: 1726-31.
7. Cheng K, Chan WWS, Butler BS, Barreto A, Smith RG. Evidence for a role of protein kinase-C in His-DTrp-Ala-Trp-DPhe-Lys-NH₂-induced growth hormone release from rat primary pituitary cells. *Endocrinology* 1991; 129: 3337-42.
8. Smith RG, Van Der Ploeg LHT, Howard AD, et al. Peptidomimetic regulation of growth hormone secretion. *Endocrinol Rev* 1997; 18: 621-45.
9. Howard AD, Feighner SD, Cully DF, et al. A receptor in pituitary and hypothalamus that functions in growth hormone release. *Science* 1996; 273: 974-7.

■■■ BRÈVES ■■■

■■■ **Les ferlines: une nouvelle famille de protéines?** S'il faut 3 membres pour déterminer une nouvelle famille de protéines, le compte est bon! La dysferline avait été impliquée l'an passé dans une myopathie des ceintures, la forme 2B des LGMD (*limb girdle muscular dystrophy*) et dans la myopathie de Miyoshi (*m/s* 1999, n° 2, p. 279). La recherche d'homologies dans les banques de données permettait alors de révéler de fortes homologies avec la protéine fer-1 de *Caenorhabditis elegans*, qui semble notamment nécessaire à la mobilité des spermatozoïdes. La dysferline, dont la fonction reste pour le moment inconnue, est une protéine transmembranaire possédant 6 domaines C2, connus pour lier, entre autres, les ions Ca²⁺, les phospholipides et les bicouches lipidiques. Plus récemment, l'équipe de Christine Petit (Institut Pasteur, Paris, France) a identifié une protéine présentant 64 % de similarité avec la dysferline et impliquée dans une surdité prélinguale non syndromique autosomique récessive [1]. Cette protéine a été alors baptisée otoberline. La recherche d'autres protéines de

cette nouvelle famille vient de permettre l'identification d'un nouveau membre, dont le profil d'expression transcriptionnel et traductionnel semble assez large mais particulièrement abondant dans le muscle squelettique et le cœur, d'où sa dénomination, la myoferline [2]. Parmi les membres de la famille, qui possèdent tous un domaine transmembranaire et des domaines C2, la myoferline s'apparente davantage à la dysferline. Elle est retrouvée, en immuno-histochimie, liée à la membrane plasmique musculaire mais aussi, et à la différence de la dysferline, à la membrane nucléaire. Son expression semble significativement augmentée (275 %) dans le muscle de souris déficientes en dystrophine. Son expression essentiellement musculaire et sa similitude avec la dysferline font suggérer qu'elle puisse en partie compenser la perte de fonction de la dysferline et moduler la sévérité de l'atteinte clinique des LGMD2B.

- [1. Yasunaga S, et al. *Nat Genet* 1999; 21: 363-9.]
 [2. Davis DB, et al. *Hum Mol Genet* 2000; 9: 217-26.]

Hubert Vaudry
Youssef Anouar
Ludovic Galas
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.

Catherine Llorens Cortes

Inserm U. 36, Collège de France, 3, rue d'Ulm, 75005 Paris, France.

Fondation Mérieux Cours français de vaccinologie 2000

12 mai 2000

Production industrielle de vaccins
Hervé Chalumeau, Florence Fuchs

23 juin 2000

Vaccination des enfants et des adolescents
Nicole Guérin, Claire-Anne Siegrist

15 septembre 2000

Vaccination des adultes et des personnes âgées
Marcel Merlin, Claire-Anne Siegrist, Pascal Besse

27 octobre 2000

Vaccination du voyageur
Pierre Saliou, Catherine Goujon

Modules de vaccinologie 2001

21 mai-2 juin 2001

Centre de conférences Les Pensières, Veyrier-du-Lac
 (inscriptions : avril-décembre 2000)

Renseignements-Inscriptions

Site Internet :
<http://www.fond-merieux.org>
 Direction scientifique
 Fondation Mérieux
 17, rue Bourgelat, BP 2021
 69227 Lyon Cedex 02, France
 Fax : +33 (0)4 72 40 79 50
 e-mail : bdodet@fond-merieux.org