

## Les endozépines, ligands endogènes des récepteurs des benzodiazépines

Marie-Christine Tonon  
Fatima Smih-Rouet  
Marek Lamacz  
Estelle Louiset  
Georges Pelletier  
Hubert Vaudry

Les benzodiazépines, en raison de leurs propriétés anxiolytiques, sédatives et myo-relaxantes, représentent l'une des catégories de médicaments les plus utilisées au monde. L'action des benzodiazépines est relayée par deux classes de récepteurs, les récepteurs associés au complexe GABA<sub>A</sub>-canal chlore, encore appelés récepteurs de type central, et les récepteurs localisés sur la membrane mitochondriale, également connus sous le nom de récepteurs de type périphérique. L'existence de sites de liaison bien caractérisés pour les benzodiazépines a naturellement incité plusieurs équipes à postuler l'existence de ligands endogènes susceptibles d'interagir avec les récepteurs des benzodiazépines. Ces recherches ont conduit à l'identification d'une nouvelle famille de neuropeptides appelés endozépines.

### ADRESSES

M.-C. Tonon : directeur de recherche à l'Inserm.  
F. Smih-Rouet : allocataire d'enseignement et de recherche. M. Lamacz : maître de conférence.  
E. Louiset : chargée de recherche à l'Inserm.  
G. Pelletier : professeur à l'université Laval, Québec.  
H. Vaudry : directeur de recherche à l'Inserm. Institut européen de recherches multidisciplinaires sur les peptides, laboratoire de neuro-endocrinologie cellulaire et moléculaire, Inserm U.413, UA Cnrs université de Rouen, 76821 Mont-Saint-Aignan, France.

### TIRÉS A PART

H. Vaudry.

m/s n° 4 vol. 10, avril 94

L'acide  $\gamma$ -aminobutyrique (GABA) est considéré comme le principal neurotransmetteur inhibiteur du système nerveux central ; environ 35 % des terminaisons nerveuses sont GABA-ergiques. Le GABA intervient dans un grand nombre de processus physiologiques tels que la régulation de l'appétit et de la pression sanguine, la thermorégulation, le sommeil et l'adaptation au stress. Un dysfonctionnement des systèmes GABAergiques est associé à diverses maladies neurologiques : épilepsie, encéphalopathie

d'origine hépatique, maladie de Parkinson, chorée de Huntington...

De nombreuses données comportementales, pharmacologiques et électrophysiologiques suggèrent que les benzodiazépines sont capables de moduler une grande partie des effets induits par le GABA. Les études de liaison réalisées avec le [<sup>3</sup>H]diazepam, chef de file des benzodiazépines, ont mis en évidence, dans le cerveau des mammifères, l'existence de sites de reconnaissance spécifiques, saturables et de forte affinité pour les benzodiazépines [1]. La synthèse de nombreuses

## RÉFÉRENCES

1. Mohler H, Okada T, Heitz P, Ulrich J. Biochemical identification of the site of action of benzodiazepines in human brain by [<sup>3</sup>H]diazepam binding. *Life Sci* 1978; 22: 985-96.
2. Braestrup C, Squires RF. Specific benzodiazepine receptors in rat brain characterized by high-affinity [<sup>3</sup>H]diazepam binding. *Proc Natl Acad Sci USA* 1977; 74: 3805-9.
3. Bowery NG, Price GW, Hudson AL, Hill DR, Wilkin GP, Turhull MJ. GABA receptor multiplicity: visualization of different receptor types in the mammalian CNS. *Neuropharmacology* 1984; 219-31.
4. Anholt RRH, Pederson PL, DeSouza EB, Snyder SH. The peripheral-type benzodiazepine receptor: localization to the mitochondrial outer membrane. *J Biol Chem* 1986; 261: 576-83.
5. Schofield PR, Darlison MG, Fujita N, et al. Sequence and functional expression of the GABA<sub>A</sub> receptor shows a ligand-gated receptor super-family. *Nature* 1987; 328: 221-7.
6. Puia G, Vicini S, Seeburg PH, Costa E. Different sites of action of neurosteroids and benzodiazepines on natural and recombinant GABA<sub>A</sub> receptors. In: Biggio G, Concas A, Costa E, eds. *GABAergic synaptic transmission. Molecular, pharmacological, and clinical aspects*. New York: Raven Press, 1992: 103-10.
7. Herb A, Wisden W, Luddens H, Puia G, Vicini S, Seeburg PH. The third  $\gamma$ -subunit of the  $\gamma$ -aminobutyric acid type A receptor family. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; 89: 1433-7.
8. Knoflach F, Backus KH, Giller T, et al. Pharmacological and electrophysiological properties of recombinant GABA<sub>A</sub> receptors comparing the  $\alpha_3$ ,  $\beta_1$  and  $\gamma_2$  subunits. *Eur J Neurosci* 1992; 4: 1-9.
9. Olsen RW, Bergman MO, van Ness PC, et al.  $\gamma$ -aminobutyric acid receptor binding in mammalian brain. Heterogeneity of binding sites. *Mol Pharmacol* 1981; 19: 217-27.
10. Shivers BD, Killisch I, Sprengel R, et al. Two novel GABA<sub>A</sub> receptor subunits exist in distinct neuronal subpopulations. *Neuron* 1989; 3: 327-37.
11. De Blas AL, Vitorica J, Friedrich P. Localization of the GABA<sub>A</sub> receptor in the rat brain with a monoclonal antibody to the 57,000 Mr peptide of the GABA<sub>A</sub> receptor/benzodiazepine receptor/Cl<sup>-</sup> channel complex. *J Neurosci* 1988; 8: 602-14.
12. Pritchett DB, Sontheimer H, Shivers BD, et al. Importance of a novel GABA<sub>A</sub> receptor subunit for benzodiazepine pharmacology. *Nature* 1989; 338: 582-5.
13. Sigel E, Baur R, Trube G, Mohler H, Malherbe P. The effect of subunit composition of rat brain GABA<sub>A</sub> receptors on channel function. *Neuron* 1990; 5: 703-11.
14. Mohler H, Benke D, Mertens S, Fritschy JM. GABA<sub>A</sub>-receptor subtype differing in  $\alpha$ -subunit composition display unique pharmacological properties. In: Biggio G, Concas A, Costa E, eds. *GABAergic synaptic transmission. Molecular, pharmacological, and clinical aspects*. New York: Raven press, 1992: 41-53.
15. Pritchett DB, Seeburg PH.  $\gamma$ -aminobutyric acid receptor  $\alpha 5$ -subunit creates novel type II benzodiazepine receptor pharmacology. *J Neurochem* 1990; 54: 1802-4.
16. Wieland HA, Luddens H, Seeburg PH. Molecular determinants in GABA<sub>A</sub>/BZ receptor subtypes. In: Biggio G, Concas A, Costa E, eds. *GABAergic synaptic transmission. Molecular, pharmacological, and clinical aspects*. New York: Raven press, 1992: 29-40.
17. Pritchett DB, Seeburg PH.  $\gamma$ -aminobutyric acid type A receptor point mutation increases the affinity of compounds for the benzodiazepine site. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88: 1421-5.
18. Wieland HA, Luddens H, Seeburg PH. A single histidine in GABA<sub>A</sub> receptors is essential for benzodiazepine agonist binding. *J Biol Chem* 1992; 267: 1426-9.
19. Papadopoulos V. Peripheral-type benzodiazepine/diazepam binding inhibitor receptor: biological role in steroidogenic cell function. *Endocrinol Rev* 1993; 14: 222-40.
20. Berkovich A, Ferrarese C, Cavaletti G, et al. Topology of two DBI receptors in human lymphocytes. *Life Sci* 1993; 52: 1265-77.
21. Oke BO, Suarez-Quian CA, Riond J, Ferrara P, Papadopoulos V. Cell surface localization of the peripheral-type benzodiazepine receptor (PBR) in adrenal cortex. *Mol Cell Endocrinol* 1992; 87: 1-6.
22. Benavides J, Quarteron D, Imbault F, et al. Labeling of « peripheral-type » benzodiazepine binding sites in the rat brain by using [<sup>3</sup>H]PK 11195, an isoquinoline carboxamide derivative: kinetic studies and autoradiographic localization. *J Neurochem* 1983; 41: 1744-50.
23. Hertz L, Bender AS. Astrocytic benzodiazepine receptors: their possible role in regulation of brain excitability. In: Kimelberg HK, ed. *Glial cell receptors*. New York: Raven Press, 1988: 159-81.
24. Sprengel R, Werner P, Seeburg PH, et al. Molecular cloning and expression of cDNA encoding a peripheral-type benzodiazepine receptor. *J Biol Chem* 1989; 264: 20415-21.

benzodiazépines a permis de démontrer que ces récepteurs pouvaient être classés en deux catégories: les sites dits de type central, présents dans le cerveau et liant spécifiquement le clonazepam et le flumazenil, et les sites dits de type périphérique, en raison de leur présence dans différents organes, et liant le Ro 5-4864 et le PK 11195 [2]. L'occupation des récepteurs centraux par les benzodiazépines augmente l'affinité du GABA pour les sites GABA<sub>A</sub> mais reste sans effet sur l'affinité des sites GABA<sub>B</sub> [3]. Les récepteurs de type périphérique ont été également identifiés dans certaines structures cérébrales mais ils diffèrent des récepteurs de type central notamment par le fait qu'ils n'interagissent pas avec les sites liant le GABA. Par ailleurs, les récepteurs périphériques, contrairement aux sites de type central localisés sur la membrane ectoplasmique, semblent être principalement associés aux membranes mitochondriales [4].

### Organisation structurale du complexe récepteur GABA<sub>A</sub>/benzodiazépines

Le récepteur GABA<sub>A</sub>-benzodiazépines est un complexe macromoléculaire associé à un canal chlore (*m/s n° 8, vol. 6, p. 773*). La dissection moléculaire du récepteur révèle l'existence de quatre types de sous-unités ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  et  $\delta$ ) qui elles-mêmes sont constituées de différents sous-types. Chez le rat, on ne compte pas moins de six sous-unités  $\alpha$ , cinq sous-unités  $\beta$  et trois sous-unités  $\gamma$  différentes. Le site GABA<sub>A</sub> proprement dit est localisé sur la chaîne  $\beta$  du complexe macromoléculaire récepteur. L'expression sélective des différentes sous-unités dans une cellule donnée confère des caractéristiques pharmacologiques spécifiques aux récepteurs GABA<sub>A</sub>-benzodiazépines présents dans ce type cellulaire. La transfection simultanée des ADNc codant pour les chaînes  $\alpha$  et  $\beta$  permet l'expression d'un récepteur associé à un canal chlore dont la probabilité d'ouverture est augmentée par le GABA [5] et modulée positivement ou négativement par les neurostéroïdes [6]. Cependant, ce type de récepteurs ne pos-

$\alpha_1$	QPSQDELKDNTTVFTRILDRLLDGYDNRLRPGLGE	35
$\alpha_2$	NIQE•A•N•I•I•.....D	35
$\alpha_3$	QGESRRQEPGDFVKQDIGGLSPKHAPDIP•DST•I•I•.....D	60
$\alpha_4$	NSKDE•LCPEI•.....S•.....F•G	33
$\alpha_5$	QMPTSSV•••TN•I•I•.....G•.....	39
$\alpha_6$	QLE••GNFYSENVS•••N•E•.....F•G	34
$\alpha_1$	RVTEVKTDIFVTSFGPVSDDHMEYTTIDVFFRQSWKDERLKFKGPMTVLRLNLMASKIWT	95
$\alpha_2$	SI•••F•N•Y•.....T•.....K•.....NI•.....	95
$\alpha_3$	A••••••Y•.....T•H•.....D•KI•P•L•.....	120
$\alpha_4$	P••••••Y•.....VE••M•••T•I•K••YD•IEI••M•VT•V••	93
$\alpha_5$	•I•Q•R••Y•.....TE•.....R•••QR•P••L•.....	99
$\alpha_6$	A••••••Y•.....VE••M•••TRT•••••AEI•S•••V•.....	94
$\alpha_1$	PDTFFHNGKKSVAHNMTMPNKLRLIQDDGTLTYMRLTVQAECPMHLEDFPMDAHSCLPK	155
$\alpha_2$	.....TE•.....R•.....A•.....	155
$\alpha_3$	.....M•.....T•.....LV•N•.....IH•.....V•A•.....	180
$\alpha_4$	.....R•.....S•.....A•F•MRN•I•.....IS•.....R•V•.....G•A•.....	153
$\alpha_5$	.....I•.....T•.....LE•.....MIS•.....Q•.....A•.....	159
$\alpha_6$	.....R•.....I•.....T•F•LMHN•I•.....IN•D•R•VN•G•A•.....	154
$\alpha_1$	FGSYAYTRAEVVYEWTRPARSVVVAEDGSRLNQYDLLGQTVDSGI*VQSSTGEYVVMTTH	215
$\alpha_2$	.....TS•T•I•YNASD•Q•P•.....SIGKETIK•.....T•A•.....	215
$\alpha_3$	.....K•I•S•LGKNK•E•Q•.....HV•GTE•IR•.....	240
$\alpha_4$	.....PKS•MI•T•KG•EK•E•PKES•S•V•I•S•ETIK•I•I•VY	213
$\alpha_5$	.....PNS•V•V•NGSTK•.....H•M•G•TENIST•TI•A•	219
$\alpha_6$	.....PKS•II•T•KKG•LY•E•P•ES•S•L•I•S•ETIK•N•I•VY	214
$\alpha_1$	FHLKRRKIGYFVIQTYLPCIMTVILSQVSFWLNRESVPARTVFGVTTVLTMTTLSISA....	275
$\alpha_2$	.....	275
$\alpha_3$	.....	300
$\alpha_4$	.....R•M•M•I•.....I•K•.....I•.....	273
$\alpha_5$	.....	279
$\alpha_6$	.....Q•M•M•I•T•.....I•K•.....I•.....	274

Figure 1. **Séquences partielles des différentes sous-unités  $\alpha$  du récepteur des benzodiazépines connues à ce jour.** L'alignement des régions N-terminales de six sous-unités  $\alpha$  du récepteur GABA<sub>A</sub> benzodiazépines montre la conservation de nombreux résidus (points rouges). Le résidu glycyI en position 200 de la chaîne  $\alpha_1$  (astérisque) confère au site de liaison des benzodiazépines associé au complexe  $\alpha_1\beta_2\gamma_2$  un profil pharmacologique de type I. L'insensibilité au diazepam du complexe  $\alpha_6\beta_2\gamma_2$  est liée au remplacement d'une histidine par une arginine en position 100 de la chaîne  $\alpha_6$  (astérisque).



## RÉFÉRENCES

25. Parola AL, Stump DG, Pepperl DJ, Krueger KE, Regan JW, Laird II HU. Cloning and expression of a pharmacologically unique bovine peripheral-type benzodiazepine receptor isoquinoline binding protein. *J Biol Chem* 1991; 266: 14082-7.
26. Riond J, Mattei MG, Kaghad M, *et al.* Molecular cloning and chromosomal localization of a human peripheral-type benzodiazepine receptor. *Eur J Biochem* 1991; 195: 305-11.
27. McEnery MW, Snowman AM, Trifiletti RR, Snyder S. Isolation of the mitochondrial benzodiazepine receptor: association with the voltage-dependent anion channel and the adenine nucleotide carrier. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; 89: 3170-4.
28. Parola AL, Yamamura HI, Laird II HE. Peripheral-type benzodiazepine receptors. *Life Sci* 1993; 52: 1329-42.
29. Gavish M, Katz Y, Bar-Ami S, Weizman R. Biochemical, physiological, and pathological aspects of the peripheral benzodiazepine receptor. *J Neurochem* 1992; 58: 1589-601.
30. Braestrup C, Nielsen M, Olsen CE. Urinary and brain  $\beta$ -carboline-3-carboxylates as potent inhibitors of brain benzodiazepine receptors. *Proc Natl Acad Sci USA* 1980; 77: 288-92.
31. Wisden W, Morris BJ, Darlison MG, Hunt SP, Barnard EA. Distinct GABA<sub>A</sub> receptor alpha subunit mRNAs show differential patterns of expression in bovine brain. *Neuron* 1988; 1: 937-47.
32. Sigel E, Baur R. Allosteric modulation by benzodiazepine receptor ligands of the GABA<sub>A</sub> receptor channel expressed in *Xenopus* oocytes. *J Neurosci* 1988; 8: 289-95.
33. Sangameswaran L, Fales HM, Friedrich M, De Blas AL. Purification of a benzodiazepine from bovine brain and detection of benzodiazepine-like immunoreactivity in human brain. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986; 83: 9236-40.
34. Rothstein JD, Garland W, Puia G, Guidotti A, Weber RJ, Costa E. Purification and characterization of naturally occurring benzodiazepine receptor ligands in rat and human brain. *J Neurochem* 1992; 58: 2102-15.
35. De Blas AL, Park D, Friedrich P. Endogenous benzodiazepine-like molecules in the human, rat and bovine brains studied with a monoclonal antibody to benzodiazepines. *Brain Res* 1987; 413: 275-84.
36. Rothstein JD, Guidotti A, Costa E. Release of endogenous benzodiazepine receptor ligands (endozepines) from cultured neurons. *Neurosci Lett* 1992; 143: 210-4.
37. Klotz U. Occurrence of natural benzodiazepines. *Life Sci* 1991; 48: 209-15.
38. Guidotti A, Forchetti CM, Corda MG, Kondel D, Bennett CD, Costa E. Isolation, characterization and purification to homogeneity of an endogenous polypeptide with agonistic action on benzodiazepine receptors. *Proc Natl Acad Sci USA* 1983; 80: 3531-3.
39. Gray PW, Gaister D, Seeburg PH, Guidotti A, Costa E. Cloning and expression of cDNA for human diazepam binding inhibitor, a natural ligand of an allosteric regulatory site of the  $\gamma$ -aminobutyric acid type A receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986; 83: 7547-51.
40. Webb NR, Rose TM, Malik N, *et al.* Bovine and human cDNA sequences encoding a putative benzodiazepine receptor ligand. *DNA* 1987; 6: 71-9.
41. Mochetti E, Einstein R, Brosius J. Putative diazepam-binding inhibitor peptide: cDNA clones from rat. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986; 83: 7547-51.
42. Snyder MJ, Feyereisen R. A diazepam binding inhibitor (DBI) homolog from the tobacco hornworm, *Manduca sexta*. *Mol Cell Endocrinol* 1993; 94: 1-4.
43. Rose TM, Schultz ER, Todaro GJ. Molecular cloning of the gene for the yeast homolog (ACB) of diazepam binding inhibitor/endozepine/acyl-CoA-binding protein. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; 89: 11287-91.
44. Todaro GJ, Rose TM, Shoyab M. Human DBI (endozepine): relationship to a homologous membrane associated protein (MA-DBI). *Neuropharmacology* 1991; 30: 1373-80.
45. DeBernadi MA, Crowe RR, Mochetti I, Shows BT, Eddy RL, Costa E. Chromosomal location of the human diazepam-binding inhibitor gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988; 85: 6561-5.
46. Berkovich A, McPhie P, Campagnone M, Guidotti A, Hensley P. A natural processing product of rat diazepam-binding inhibitor, triakontatetrapeptide (diazepam-binding inhibitor (17-50)) contains an  $\alpha$ -helix, which allows discrimination between benzodiazepine binding site subtypes. *Mol Pharmacol* 1990; 37: 164-72.

sède pas toutes les propriétés pharmacologiques du complexe natif. En particulier, la modulation de la réponse au GABA par les benzodiazépines nécessite la cotransfection d'ADNc codant pour les sous-unités  $\alpha$ ,  $\beta$  et  $\gamma_2$  [7, 8], suggérant que, par analogie avec le récepteur nicotinique, le complexe GABA<sub>A</sub>-benzodiazépines présente une structure pentamérique de type  $2\alpha_2\beta_1\gamma_2$ . L'existence de deux sous-classes de récepteurs GABA<sub>A</sub> a été démontrée par des techniques de liaison de GABA tritié à des préparations membranaires. Les sites de forte affinité (15-20 nM) ne correspondent qu'à 15 % à 20 % des sites GABA<sub>A</sub> totaux au niveau du cortex cérébral [9] et présentent une distribution comparable à celle de la sous-unité  $\delta$  [10]. Ces récepteurs pourraient correspondre aux récepteurs GABA<sub>A</sub> insensibles aux benzodiazépines. Les sites GABA<sub>A</sub> de basse affinité (100-140 nM) sont étroitement associés aux récepteurs des benzodiazépines [11]. De ce fait, les récepteurs GABA<sub>A</sub> de faible affinité sont plus généralement assimilés au complexe GABA-benzodiazépines-canal chlore.

### **Propriétés physico-chimiques et pharmacologiques des sites de liaison des benzodiazépines associés aux récepteurs GABA<sub>A</sub>**

Des études électrophysiologiques ont montré que les benzodiazépines telles que le diazepam potentialisent l'action du GABA sur le canal chlore en déplaçant la courbe d'activité vers les faibles concentrations de GABA. Cet effet potentialisateur connu sous le terme de «phénomène de GABA-shift» correspond à une augmentation d'affinité du récepteur pour le GABA. La modulation allostérique de la liaison du GABA par les benzodiazépines se ferait *via* les récepteurs de type central (RBZc) et serait à l'origine de leurs effets anticonvulsivants, anxiolytiques, myorelaxants et sédatifs. Les RBZc sont constitués de plusieurs sous-types: les récepteurs de type I, qui possèdent une affinité

nanomolaire, et les récepteurs de type II, qui présentent une affinité micromolaire. La densité des récepteurs de type I et II varie selon les régions du cerveau. Ainsi par exemple, chez le rat, 90 % des récepteurs de type I sont localisés au niveau du cervelet alors que les récepteurs de type II sont fortement exprimés dans les parties superficielles du colliculus supérieur. Dans d'autres régions comme le cortex et l'hippocampe, les deux types de récepteurs coexistent (*m/s n° 8, vol. 6, p. 773*).

L'étude de l'expression des ARNm codant pour les différentes sous-unités du récepteur GABA<sub>A</sub> a montré que les complexes composés des chaînes  $\alpha$ ,  $\beta$  et  $\gamma_2$  possèdent tou-

jours un site de liaison pour les benzodiazépines [12]. En outre, l'effet potentialisateur des benzodiazépines sur le courant chlore induit par le GABA est dix fois plus important dans les structures de type  $\alpha_x\beta_2\gamma_2$  que dans celles de type  $\alpha_x\beta_1\gamma_2$  [13]. L'isolement du complexe récepteur GABA/benzodiazépines par immunoprécipitation à l'aide d'anticorps monoclonaux spécifiques dirigés contre les sous-unités  $\alpha_1$ ,  $\alpha_3$  ou  $\alpha_5$  révèle que les complexes macromoléculaires ainsi obtenus lient tous le flunitrazepam et le GABA. En outre, 90 % d'entre eux possèdent une chaîne  $\alpha_1$  dans leur composition et seules les combinaisons de type  $\alpha_1\beta_1\gamma_2$  présentent les caractéristiques pharmacologiques du récepteur de

type I [14]. Les sites des benzodiazépines de type II constituent une population hétérogène à laquelle appartiennent les complexes de type  $\alpha_2\beta_x\gamma_2$ ,  $\alpha_3\beta_x\gamma_2$  et  $\alpha_5\beta_x\gamma_2$  [15, 16]. L'ensemble de ces données indique que la pharmacologie des récepteurs des benzodiazépines dépend très largement du type de sous-unité  $\alpha$  mis en jeu. La comparaison des structures primaires des sous-unités  $\alpha$  (*figure 1*) révèle que la chaîne  $\alpha_1$  diffère des autres, notamment par la présence d'un résidu glycy en position 200. Le simple remplacement, dans la sous-unité  $\alpha_3$ , de l'acide glutamique 225 par une glycine permet la conversion d'un récepteur des benzodiazépines de type II ( $\alpha_3\beta_2\gamma_2$ ) en un

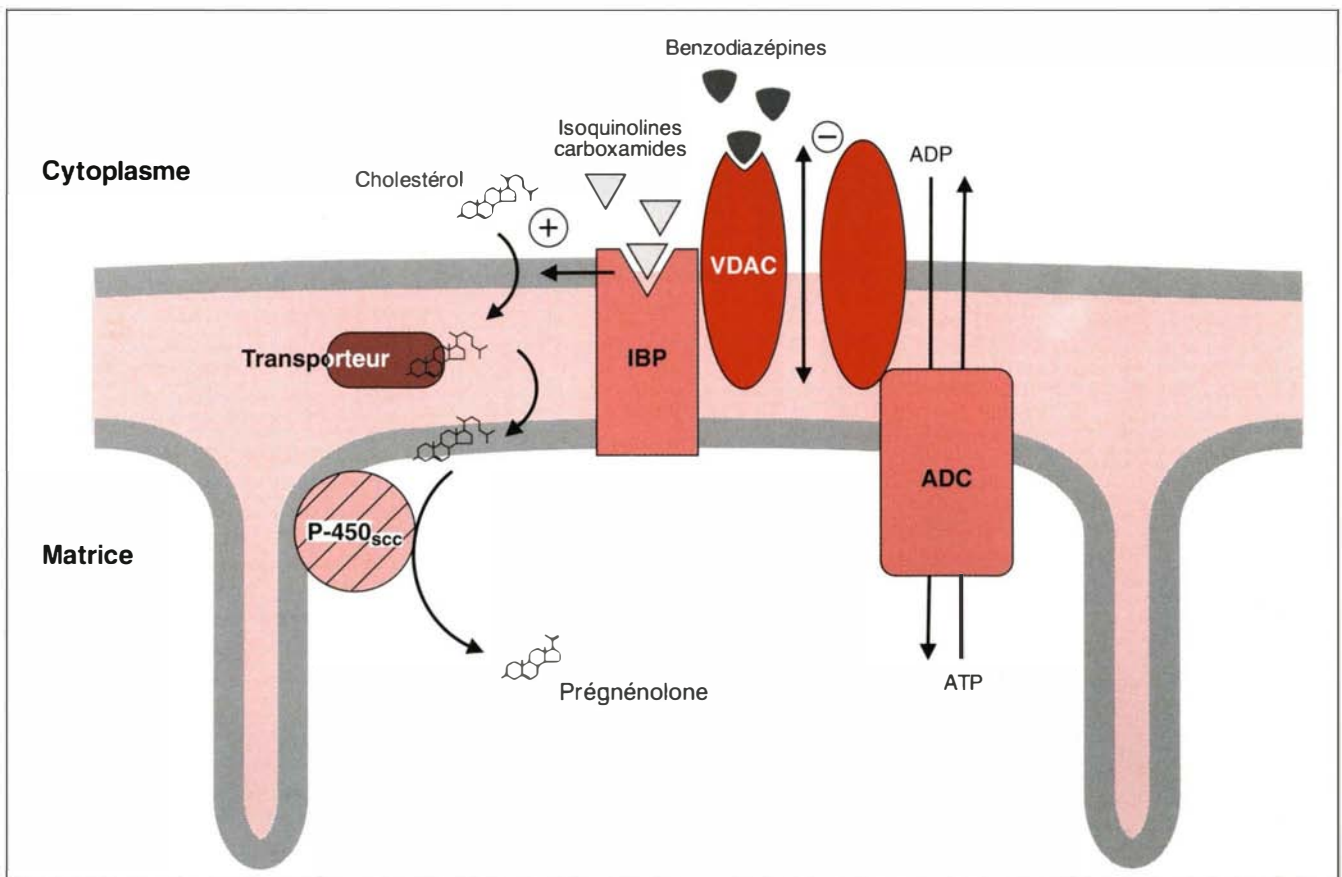


Figure 2. **Représentation schématique des sites de liaison mitochondriaux des benzodiazépines.** Les récepteurs mitochondriaux des benzodiazépines sont formés de trois sous-unités : une protéine liant les isoquinolines carboxamides (IBP), un canal anionique dépendant du voltage (VDAC) liant les benzodiazépines et un transporteur de nucléotides à adénine (ADC), ce dernier étant localisé sur la membrane interne de la mitochondrie. L'activation du récepteur favorise la translocation du cholestérol à l'intérieur de la mitochondrie où il est transformé en prégnénolone par le cytochrome P-450<sub>scc</sub>.



## RÉFÉRENCES

47. Guidotti A. Role of DBI in brain and its posttranslational processing products in normal and abnormal behavior. *Neuropharmacology* 1991; 30: 1425-33.
48. Tonon MC, Désy L, Nicolas P, Vaudry H, Pelletier G. Immunocytochemical localization of the endogenous benzodiazepine ligand octadecaneuropeptide (ODN) in the rat brain. *Neuropeptides* 1990; 15: 17-24.
49. Alho H, Costa E, Ferrero P, Fujimoto M, Cosenza-Murphy D, Guidotti A. Diazepam-binding inhibitor: a neuropeptide located in selected neuronal populations of rat brain. *Science* 1985; 229: 179-82.
50. Tong Y, Tonon MC, Désy L, Nicolas P, Vaudry H, Pelletier G. Localization of the endogenous benzodiazepine receptor ligand octadecaneuropeptide (ODN) and peripheral type benzodiazepine receptors in the rat pituitary. *J Neuroendocrinol* 1990; 2: 189-92.
51. Ferrarese C, Vaccarino F, Alho H, Mellstrom B, Costa E, Guidotti A. Subcellular location and neuronal release of diazepam-binding inhibitor. *J Neurochem* 1987; 48: 1093-102.
52. Malagon M, Vaudry H, Vallarino M, Gracia-Navarro F, Tonon MC. Distribution and characterization of endozepine-like immunoreactivity in the central nervous system of the frog *Rana ridibunda*. *Peptides* 1992; 13: 99-107.
53. Malagon M, Vallarino M, Tonon MC, Vaudry H. Localization and characterization of endozepine-like peptides in the brain of the trout (*Salmo gairdneri*). *Brain Res* 1992; 576: 208-17.
54. Steyaert H, Tonon MC, Smih-Rouet F, Testart J, Pelletier G, Vaudry H. Distribution and characterization of endogenous benzodiazepine receptor ligand (endozepine)-like peptides in the rat gastrointestinal tract. *Endocrinology* 1991; 129: 2101-9.
55. Bovolin P, Schlichting J, Miyata M, Ferrarese C, Guidotti A, Alho H. Distribution and characterization of diazepam-binding inhibitor (DBI) in peripheral tissues of rat. *Regul Pep* 1990; 29: 267-81.
56. Rhéaume E, Tonon MC, Smih-Rouet F, et al. Localization of the endogenous benzodiazepine ligand octadecaneuropeptide (ODN) in the rat testis. *Endocrinology* 1990; 127: 1986-94.
57. Johansson O, Hilliges M, Ostenson CG, Sandberg E, Fendic S, Mutt V. Immunohistochemical localization of porcine diazepam-binding inhibitor (DBI) to rat endocrine pancreas. *Cell Tissue Res* 1991; 263: 395-8.
58. Sandberg E, Hoog A, Ostenson CG, et al. Porcine diazepam binding inhibitor occurs in the  $\delta$ -cells of porcine and human islets, and modulates pancreatic hormone secretion. *Diabetologia* 1989; 32: 537A.
59. Pelletier G, Tong Y, Rhéaume E, Simard J, Tonon MC, Vaudry H. Localization of endogenous benzodiazepine ligand octadecaneuropeptide (ODN) and peripheral benzodiazepine receptors in the rat prostate. *Mol Androl* 1991; 3: 95-108.
60. Besman MJ, Yanagibashi K, Lee TD, Kawamura M, Hall PF, Shively JE. Identification of des-(Gly-Ile)-endozepine as an effector of corticotropin-dependent adrenal steroidogenesis: stimulation of cholesterol delivery is mediated by the peripheral benzodiazepine receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; 86: 4897-901.
61. Ferrero P, Guidotti A, Conti-Tronconi B. A brain octadecaneuropeptide generated by tryptic digestion of DBI (diazepam binding inhibitor) functions as a proconflict ligand of benzodiazepine recognition sites. *Neuropharmacology* 1984; 23: 1359-62.
62. Kavaliers M, Hirst M. An octadecaneuropeptide (ODN) derived from diazepam binding inhibitor increases aggressive interactions in mice. *Brain Res* 1986; 383: 343-9.
63. Bormann J, Ferrero P, Guidotti A, Costa E. Neuropeptide modulation of GABA receptor Cl<sup>-</sup> channels. *Regul Pept* 1985; 4: 33-8.
64. Tonon MC, Adjeroud S, Lamacz M, et al. Central-type benzodiazepines and the octadecaneuropeptide (ODN) modulate the effects of  $\gamma$ -aminobutyric acid on the release of  $\alpha$ -melanocyte stimulating hormone from frog neurointermediate lobe in vitro. *Neuroscience* 1989; 31: 485-93.
65. Louiset E, Vaudry H, Cazin L. Allosteric modulation of the GABA-induced chloride current in frog melanotrophs. In: Vaudry H, Eberle AN, eds. *The melanotropic peptides*. New York: Ann NY Acad Sci, 1993: 564-6.
66. Yanagibashi K, Ohno Y, Nakamichi N, et al. Peripheral-type benzodiazepine receptors are involved in the regulation of cholesterol side chain cleavage in adrenocortical mitochondria. *J Biochem* 1989; 106: 1026-9.
- type I (Gly225- $\alpha_3\beta_2\gamma_2$  [17]. La sous-unité  $\alpha_6$  est uniquement exprimée au niveau du cortex cérébelleux. La co-expression des sous-unités  $\alpha_6$ ,  $\beta_2$  et  $\gamma_2$  conduit à la formation d'une population de récepteurs des benzodiazépines dont les propriétés pharmacologiques sont très particulières. En effet, ces sites sont insensibles aux benzodiazépines telles que le diazepam et lient uniquement le Ro 15-4513. La sensibilité des complexes de type  $\alpha_1\beta_2\gamma_2$  au diazepam est due à la présence d'un résidu histidyl en position 101 sur la chaîne  $\alpha_1$ : la chaîne  $\alpha_6$  possède en position 100 une arginine dont le remplacement par une histidine permet la formation d'un complexe His100- $\alpha_6\beta_2\gamma_2$  sensible au diazepam [18]. De l'ensemble des données de la littérature il ressort que les combinaisons de type  $\alpha_1\beta_2\gamma_2$  représentent les formes les plus fréquentes du complexe récepteur GABA<sub>A</sub>/benzodiazépines. Ce type de combinaison associe le site de faible affinité pour le GABA et celui de forte affinité pour les benzodiazépines (récepteur des benzodiazépines de type II).

### Structure moléculaire des sites de liaison mitochondriaux

Les études pharmacologiques ont révélé l'existence d'un autre type de récepteurs des benzodiazépines qui ne reconnaissent pas le clonazepam ni le flumazenil (ligands possédant une grande affinité pour les RBZc) mais qui, en revanche, lient spécifiquement certains composés comme le Ro 5-4864 et le PK 11195. Ces sites de liaison ont été nommés récepteurs périphériques (RBZp) car ils ont été initialement découverts dans des glandes endocrines telles que la surrénale et le testicule, et dans d'autres organes comme le rein, le poumon et le foie [19]. Les RBZp sont généralement associés à la membrane externe des mitochondries [4]. Cependant, quelques études font état de récepteurs de type RBZp au niveau de la membrane plasmique [20, 21]. En outre, les sites dits de type « périphérique » sont également présents dans certaines régions du système nerveux cen-

tral comme le plexus choroïde et le bulbe olfactif chez le rat [22]. Des études de liaison du Ro 5-4864 sur des cellules gliales en culture révèlent que les astrocytes possèdent aussi une forte densité de RBZp [23]. Les différentes tentatives de purification du RBZp ont conduit à l'isolement de plusieurs protéines de 32, 30 et 18 kDa. L'ADNc codant pour la molécule de 18 kDa a été cloné chez le rat, l'homme et le bœuf [24-26]. La protéine correspondante est constituée de 169 acides aminés et présente cinq domaines transmembranaires potentiels. Sa structure primaire est bien conservée d'une espèce à l'autre et montre une certaine analogie de séquence avec la protéine bactérienne CrtK. Selon les espèces, la protéine 18 kDa possède ou non des sites potentiels de phosphorylation dans sa partie COOH terminale. Curieusement, ces molécules ne présentent pas d'enchaînement en acides aminés pouvant correspondre à la séquence consensus d'ancrage de protéine dans la membrane mitochondriale. La protéine 18K a une grande affinité pour les isoquinolines carboxamides telles que le PK 11195 ou le PK 14105. A l'inverse, elle présente une très faible affinité pour les benzodiazépines spécifiques des RBZp. Le flunitrazepam, le Ro 5-4864 et son dérivé isothiocyanate, le AHN 086, se lient préférentiellement aux protéines 30K et 32K, correspondant res-

pectivement à un canal anionique dépendant du voltage (*voltage dependent anion channel*, VDAC) et un transporteur de l'adénosine (*adenine nucleotide carrier*, ADC) [27]. L'affinité des RBZp pour le Ro 5-4864 est variable d'une espèce à l'autre et dépend largement de la protéine 18K exprimée [28], ce qui montre que les trois protéines sont étroitement associées (*figure 2*). Le rôle des RBZp est encore mal connu. L'activation de ces récepteurs produit divers effets tels que l'augmentation de la conversion du cholestérol en prégnénolone et de la synthèse de stéroïdes, l'inhibition de la prolifération cellulaire, la modulation de la production de cytokines, une activation de la libération hormonale par des cellules antéhypophysaires tumorales (ATt20), la régulation de l'activité cardiaque ou encore la production d'un état proconflictuel et anxio-gène [19, 29].

### Les ligands endogènes des récepteurs des benzodiazépines

L'existence de sites de liaison spécifiques pour les benzodiazépines a conduit naturellement plusieurs groupes à rechercher les ligands endogènes de ces récepteurs. Trois familles de molécules ont ainsi été identifiées : les  $\beta$ -carbolines, les benzodiazépines endogènes et une famille de peptides appelés endozé-

pines en raison de leur capacité de déplacer les benzodiazépines de leurs sites de liaison.

### Les $\beta$ -carbolines

En 1980, Braestrup *et al.* [30] ont isolé à partir de l'urine et du cerveau humains un composé, l'éthyl- $\beta$ -carboline-3-carboxylate ( $\beta$ -CCÉ), qui présente une affinité nanomolaire pour les récepteurs des benzodiazépines. Par la suite, il a été montré que cette molécule n'était qu'un artefact apparu au cours du processus d'extraction. Cependant, ces travaux ont eu le mérite de conduire au développement d'une nouvelle classe de ligands pour les récepteurs des benzodiazépines. Les méthyl- $\beta$ -carboline-3-carboxylate ( $\beta$ -CCM) et méthyl 6,7-diméthoxy-4-éthyl- $\beta$ -carboline-3-carboxylate (DMCM) comptent parmi les  $\beta$ -carbolines les plus étudiées à ce jour. Administrées par voie intracérébroventriculaire ou intrapéritonéale ces substances produisent des effets opposés à ceux des benzodiazépines, à savoir anxiété et convulsions [31]. Elles possèdent également, à faible dose, une activité psychostimulante. Les  $\beta$ -carbolines, qui inhibent l'action du GABA en diminuant la fréquence d'ouverture des canaux chlore [32], agissent comme des agonistes inverses des benzodiazépines au niveau des RBZc.

### Les benzodiazépines endogènes

Plusieurs groupes ont envisagé l'exis-

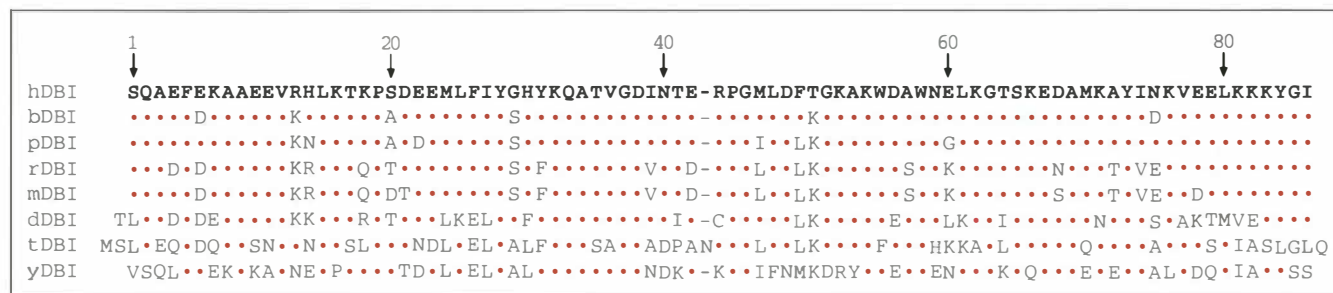


Figure 3. Comparaison des séquences en acides aminés du précurseur des endozépines, le diazepam-binding inhibitor (DBI) de différentes espèces. Les points rouges correspondent aux acides aminés conservés. h : homme ; b : boeuf ; p : porc ; r : rat ; m : souris ; d : canard ; t : tabac ; y : levure.



## RÉFÉRENCES

67. Papadopoulos V, Nowzari FB, Krueger KE. Hormone-stimulated steroidogenesis is coupled to mitochondrial benzodiazepine receptors. *J Biol Chem* 1991; 266 : 3682-7.
68. Boujrad N, Hudson JR, Papadopoulos V. Inhibition of hormone-stimulated steroidogenesis in cultured Leydig tumor cells by a cholesterol-linked phosphorothioate oligodeoxynucleotide antisense to diazepam-binding inhibitor. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90 : 5728-31.
69. Bender AS, Hertz L. Pharmacological evidence that the non-neuronal diazepam binding site in primary cultures of glial cells is associated with a calcium channel. *Eur J Pharmacol* 1985; 110 : 287-8.
70. Costa E, Guidotti A. Diazepam binding inhibitor (DBI) : a peptide with multiple biological actions. *Life Sci* 1991; 49 : 325-44.
71. Papadopoulos V, Guarneri P, Krueger KE, Guidotti A, Costa E. Pregnenolone biosynthesis in C6-2B glioma cell mitochondria : regulation by a mitochondrial diazepam binding inhibitor receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; 89 : 5113-7.
72. Taupin V, Herbelin A, Descamps-Latscha B, Zavala F. Endogenous anxiogenic peptide, ODN-diazepam-binding inhibitor, and benzodiazepines enhance the production of interleukin-1 and tumor necrosis factor by human monocytes. *Lymphokine Cytokine Res* 1991; 10 : 7-13.
73. Taupin V, Gogusev J, Descamps-Latscha B, Zavala F. Modulation of tumor necrosis factor- $\alpha$ , interleukin-1 $\beta$ , interleukin-6, interleukin-8, and granulocyte/macrophage colony-stimulating factor expression in human monocytes by an endogenous anxiogenic benzodiazepine ligand, triakontatetrapeptide : evidence for a role of prostaglandins. *Mol Pharmacol* 1993; 43 : 64-9.
74. Chen ZW, Agerberth B, Gell K, et al. Isolation and characterization of porcine diazepam-binding inhibitor, a polypeptide not only of cerebral occurrence but also common in intestinal tissues and with effects on regulation on insulin release. *Eur J Biochem* 1988; 174 : 239-45.
75. Sjöholm A, Funakoshi A, Efendic S, Ostenson CG, Hellerstrom C. Long term inhibitory effects of pancreastatin and diazepam binding inhibitor on pancreatic  $\beta$ -cell deoxyribonucleic acid replication, polyamine content, and insulin secretion. *Endocrinology* 1991; 128 : 3277-82.
76. Mogensen IB, Schulenberg H, Hansen HO, Sopenier F, Knudsen J. A novel acyl-CoA-binding protein from bovine liver. *Biochem J* 1987; 241 : 189-92.

tence de composés structurellement apparentés aux benzodiazépines dans le cerveau des mammifères. A l'aide d'anticorps monoclonaux dirigés contre les benzodiazépines, l'équipe de De Blas a isolé, par chromatographie d'affinité, des composés capables de déplacer les benzodiazépines de leurs sites de liaison. L'analyse par HPLC et spectrométrie de masse a montré que la structure de ces substances était chimiquement apparentée à celle des benzodiazépines [33, 34]. Plusieurs observations plaident en faveur d'une synthèse endogène de ces molécules. Ainsi, la présence de composés *benzodiazepin-like* dans des tissus humains conservés dans la paraffine depuis 1940, c'est-à-dire quinze ans avant la synthèse de la première benzodiazépine, a été mise en évidence par des techniques immunohistochimiques [35]. En outre, des lignées cellulaires, cultivées trois mois dans un milieu défini, produisent des molécules qui s'apparentent par leur structure aux benzodiazépines [36]. Toutefois, des études plus récentes ont révélé que les microorganismes tels que *Penicillium cyclopium* ou *Streptomyces rufoveus* produisent des benzodiazépines et que ces molécules sont également présentes dans de nombreux végétaux (céréales, riz et pommes de terre) ainsi que dans divers produits d'origine animale [37], ce qui tendrait à montrer que les benzodiazépines endogènes pourraient être d'origine alimentaire ou provenir de contaminations accidentelles.

### Les endozépines

Le nom d'endozépines est un terme générique qui désigne une famille de peptides endogènes capables de se lier aux récepteurs des benzodiazépines. Toutes les molécules connues à ce jour dérivent d'un polypeptide de 10 kDa appelé *diazepam-binding inhibitor* (DBI) initialement isolé à partir du cerveau de rat en raison de sa capacité à déplacer de façon compétitive les benzodiazépines et les  $\beta$ -carboline de leurs sites de liaison [38].

#### • Structure des endozépines

Des séquences peptidiques partielles du DBI de rat ont été déterminées et, à partir de ces séquences, l'ADNc

codant pour le DBI a été cloné chez un certain nombre d'espèces [39-43]. Ces ADNc codent pour des polypeptides (86 acides aminés environ) hydrophiles et dépourvus de peptide signal. La structure primaire du DBI a été également déterminée par le séquençage de peptides purifiés à partir de divers tissus périphériques. La comparaison des séquences en acides aminés du DBI de rat et de souris, deux espèces qui ont divergé il y a 50 à 100 millions d'années, révèle 97 % d'analogie entre elles (figure 3). Les séquences bovine et humaine ont respectivement 85 % et 78 % d'analogie avec celle du DBI de rat. L'endozépine isolée à partir du cortex surrénalien de bœuf est une molécule de 84 acides aminés qui diffère du peptide d'origine cérébrale par l'absence des 2 acides aminés C-terminaux (glycine et isoleucine). L'existence de ce des(Gly-Ile)DBI pourrait résulter, soit d'une maturation post-traductionnelle spécifique du précurseur dans la surrénale, soit d'un artefact lié à la technique d'extraction. Par ailleurs, le DBI bovin présente 60 % de similitude de séquence avec la région NH<sub>2</sub> terminale d'une protéine transmembranaire de 533 acides aminés (*membrane associated protein-DBI, MA-DBI*), clonée à partir d'une banque de cerveau de bœuf [44]. Chez le rat et l'homme, la recherche des séquences génomiques par *Southern blot* a révélé la présence de six fragments de restriction dont la taille serait compatible avec l'existence de plusieurs gènes codant pour le DBI. Cependant, une sonde correspondant à l'extrémité 5' non traduite de l'ADNc du DBI ne s'hybride qu'avec un seul fragment de restriction de l'ADN génomique, ce qui suggère l'existence d'un seul gène actif et de plusieurs pseudogènes. Chez l'homme, ces gènes ou pseudogènes se trouvent principalement sur la région q12-21 du chromosome 2 mais aussi sur les chromosomes 5 et 6 [39, 45].

La présence de plusieurs acides aminés basiques, susceptibles de correspondre à des sites de clivage potentiels, indique que le DBI pourrait être le précurseur de peptides biologiquement actifs (figure 4). Le DBI



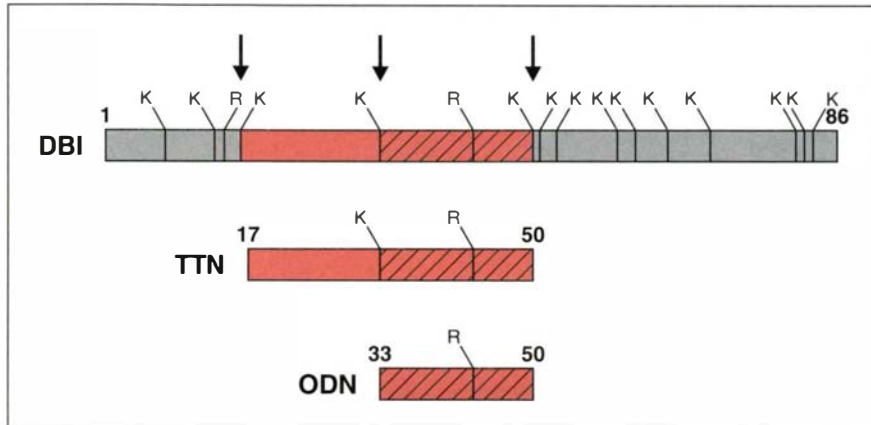


Figure 4. **Schéma de maturation du diazepam-binding inhibitor (DBI) de rat.** Toutes les endozépines connues à ce jour dérivent d'un polypeptide de 10 kDa appelé diazepam-binding inhibitor (DBI), capable de déplacer de façon compétitive les benzodiazépines et les  $\beta$ -carboline de leurs sites de liaison. Le clivage du DBI au niveau des lysines 32 et 50 produit l'octadécaneuropeptide (ODN); le clivage au niveau des lysines 16 et 50 produit le triakontatétraneuropeptide (TTN).

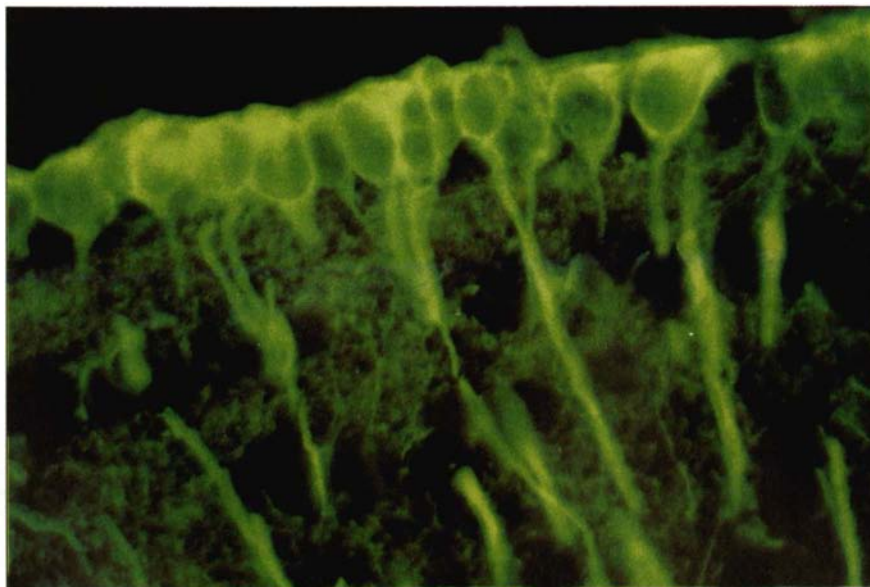


Figure 5. **Localisation par immunofluorescence des endozépines dans le cerveau de la grenouille.** Les cellules gliales bordant le ventricule latéral du télencéphale sont spécifiquement marquées par des anticorps dirigés contre l'octadécaneuropeptide (ODN) ( $\times 750$ ).

donne naissance, par protéolyse enzymatique, à plusieurs fragments dont un triakontatétraneuropeptide (DBI 17-50 connu sous le terme de TTN) et un octadécaneuropeptide (DBI 33-50 désigné par le sigle ODN) (figure 4) qui possèdent des propriétés physicochimiques très différentes. Le TTN présente une séquence hydrophobe, dans sa région C-terminale, qui lui permet d'adopter une structure secondaire en hélice  $\alpha$  dans un environnement apolaire. Cette configuration semble jouer un rôle important dans la sélectivité des sites de liaison: le TTN possède une affinité plus grande pour les RBZp que pour les RBZc [46]. A l'inverse, l'ODN se lie préférentiellement au site des benzodiazépines associé au complexe récepteur GABA<sub>A</sub>/benzodiazépines [47].

• *Distribution anatomique et localisation cellulaire des endozépines*

Le développement d'anticorps dirigés contre les endozépines a permis de montrer que ces peptides sont largement distribués dans l'ensemble du système nerveux central et dans de nombreux tissus périphériques. Les concentrations les plus fortes ont été mesurées dans l'hypothalamus, le cervelet, le foie, le rein et le duodénum. Des études immunohistochimiques indiquent que, dans le cerveau, l'immunoréactivité est essentiellement associée à des éléments de type gliaux; en particulier, de nombreux astrocytes immunoréactifs sont observés dans les différentes couches du cortex cérébral [48]. En revanche, au niveau de la substance blanche, seules quelques cellules gliales localisées dans le *corpus callosum* sont marquées [49]. Dans l'hypothalamus, les endozépines sont localisées dans les cellules épendymaires qui bordent le troisième ventricule, les astrocytes des noyaux paraventriculaires, arqué et supraoptique, ainsi que dans les tanyocytes de l'éminence médiane (figure 5). Les endozépines sont également synthétisées dans les pituicytes au niveau du lobe postérieur de l'hypophyse et dans quelques cellules du lobe intermédiaire; à l'inverse, le lobe antérieur en est totalement dépourvu [50]. Les études réalisées en microscopie électro-

nique ont montré que, dans le cer-velet, les endozépines sont exclusive-ment exprimées dans les cellules de Bergmann et qu'elles sont distri-buées de façon diffuse dans le cyto-plasme. Le fait que les endozépines ne soient pas empaquetées dans des grains de sécrétion est en accord avec l'absence de peptide signal dans la séquence du DBI. Paradoxa-lement, la présence d'endozépines a été observée dans des vésicules au niveau d'éléments neuronaux dans plusieurs régions du cerveau telles que l'hippocampe, le cer-velet et l'hypothalamus [49, 51]. La nature des cellules qui expriment les endo-zépines semble avoir changé au cours de l'évolution puisqu'un pep-tide apparenté à l'ODN est présent dans les cellules gliales chez la gre-nouille [52], alors que chez le pois-son, la localisation du peptide est strictement neuronale [53].

Au niveau des organes ou tissus périphériques, les endozépines sont stockées dans des cellules spéciali-sées: les cellules épithéliales du trac-tus gastrointestinal [54], les cellules de Leydig du testicule [55, 56], les cellules  $\alpha$  et  $\delta$  du pancréas [57, 58] et les cellules acineuses de la pros-tate [59]. Au niveau de la surrénale la localisation des endozépines est strictement limitée à la zone glomé-rulée du cortex [60]. L'analyse par *Northern blot* ou par hybridation *in situ* montre toujours une bonne cor-rélation entre la localisation du DBI et les sites d'expression de son ARNm.

• *Activités biologiques des endozépines*  
Administrés par voie intracérébro-ventriculaire, le DBI et l'ODN indui-sent des comportements de type proconflictuel et un état d'anxiété comparables à ceux observés après l'injection de  $\beta$ -carboline [61, 62]. Les effets du DBI et de l'ODN sont totalement bloqués par l'administra-tion de flumazénil, un antagoniste spécifique des RBZc. Au niveau cel-lulaire, le DBI réduit l'amplitude du courant chlore induit par le GABA sur les cellules de moelle épinière de souris [63]. De même, dans les cellules mélanotropes de l'hypo-physe, l'ODN bloque l'effet inhibi-teur du GABA sur la sécrétion hor-monale (figure 6) [64] et abolit totale-ment l'action du GABA sur le cou-

rant chlore [65]. En modulant néga-tivement la transmission GABAergi-que, le DBI et son fragment 33-50 se comportent donc comme des ago-nistes inverses des benzodiazépines et l'action inhibitrice des endozépi-nes serait à l'origine de leurs effets anxiogènes et convulsivants.

Au niveau des organes périphéri-ques, il existe une bonne corrélation entre le taux d'expression des endo-zépines et celui des RBZp. Ainsi, la surrénale, qui est l'un des organes les plus riches en DBI, présente une concentration élevée de récepteurs mitochondriaux des benzodiazépi-nes. Il est intéressant de noter que le DBI est exprimé dans divers types de cellules stéroïdogènes (cellules du cortex surrénalien et cellules de Leydig). L'activation des récepteurs mitochondriaux par les benzodiazé-pines ou le DBI stimule la synthèse des stéroïdes [66, 67]. Le TTN mime les effets du DBI dans deux lignées de cellules tumorales, les lignées Y-1 (cellules du cortex sur-rénalien) et MA-10 (cellules de Ley-dig) tandis que l'ODN est beaucoup moins actif. L'étape limitante de la stéroïdogénèse est le transport du cholestérol dans la mitochondrie où il est ensuite converti en prégnéno-lone par le cytochrome P-450<sub>SCC</sub> (*side-chain cleavage*). Il est bien établi que le passage du cholestérol vers la mitochondrie, qui est inhibé par le cycloheximide, nécessite la synthèse d'une protéine à renouvellement rapide. La demi-vie du DBI est trop longue, trois à six heures, pour qu'il puisse correspondre à cette protéine labile. En outre, les facteurs endo-crines qui stimulent la stéroïdogen-èse n'affectent pas la synthèse d'endozépines. Néanmoins, une étude récente très élégante a mon-tré que des oligonucléotides antisens dirigés contre les ARNm du DBI inhibent à la fois la synthèse de DBI et la production de prégnénone induite par les gonadotropines dans les cellules MA-10 [68]. Ces oligonu-cléotides antisens étant sans effet sur l'activité du cytochrome P-450<sub>SCC</sub>, il est clair que les endozépines, *via* l'activation des RBZp, jouent un rôle clé dans les premières étapes de la biosynthèse des stéroïdes.

Les cellules gliales, qui expriment la majorité des RBZp du système ner-

veux central [69], montrent une forte capacité de liaison du TTN [70]. Par ailleurs, les cellules gliales synthétisent une série de neu-rostéroïdes (prégnénone sulfate, dihydroépiandrostérone sulfate, 3 $\alpha$ -hydroxy-5 $\alpha$ -pregnan-20-one ou 3 $\alpha$ -21-dihydroxy-5 $\alpha$ -pregnan-20-one) qui sont capables de moduler posi-tivement ou négativement le fonc-tionnement du récepteur GABA<sub>A</sub> [6]. Une étude réalisée sur des mitochondries, isolées à partir d'un gliome de rat (lignée cellulaire C6-2B), a montré que le DBI et le TTN augmentent la synthèse de pré-gnénone, alors que l'ODN est sans effet [71]. On peut donc concevoir que les endozépines, dont le lieu de synthèse est essentiellement situé dans les cellules gliales, puissent moduler la transmission GABAergi-que en contrôlant la biosynthèse des neurostéroïdes. Une étude récente montre que les endozépines sont libérées par les astrocytes et peuvent agir directement sur ces mêmes cel-lules par un mécanisme de type autocrine ou paracrine. En particu-lier, sur des astrocytes en culture, l'ODN provoque des modifications de la concentration de calcium intracellulaire ( $[Ca^{2+}]_i$ ) qui sont fonction de la dose de peptide administrée: à des concentrations nanomolaires, l'ODN induit une élé-vation de la  $[Ca^{2+}]_i$ , tandis qu'à doses micromolaires il diminue la  $[Ca^{2+}]_i$ . La mobilisation du  $Ca^{2+}$  induite par les faibles doses d'ODN n'est bloquée ni par le flumazénil, ni par le PK 11195, suggérant l'exis-tence d'un nouveau type de récep-teur pour les endozépines. A l'inverse, la diminution de la  $[Ca^{2+}]_i$  induite par les fortes doses d'ODN est bloquée par le flumaze-nil, indiquant qu'à des concentra-tions micromolaires, l'ODN exerce son effet *via* des RBZc (communica-tion personnelle, Lamacz *et al.*, sou-mis pour publication).

Un certain nombre d'éléments per-mettent d'envisager un rôle des endozépines dans la réponse immu-nitaire. Dans les monocytes humains, le TTN et l'ODN potentialisent l'action d'une endotoxine bacté-rienne (lipopolysaccharide, LPS) sur la production d'interleukine 1 (IL1) et du TNF (*tumor necrosis factor*).



L'effet des endozépines sur la production de cytokines est mimé par le Ro 5-4864 [72, 73]. Les cellules du système immunitaire expriment l'une des composantes du RBZp, la protéine 18K, qui est localisée à la fois sur la membrane mitochondriale et la membrane plasmique [20]. L'ensemble de ces données suggère que les peptides apparentés au DBI pourraient jouer un rôle physiologique dans le contrôle de la réaction inflammatoire. Certaines actions du DBI ne semblent pas être liées à l'activation des récepteurs des benzodiazépines. Chez le rat, les endozépines diminuent la libération d'insuline induite par le glucose sur une préparation de pancréas isolé [74]. Le diabète est souvent associé à une baisse de la réplication de l'ADN dans les cellules  $\beta$  du pancréas. Or, Sjöholm *et al.* [75] ont observé que le DBI provoque une diminution de l'incorporation de thymidine tritiée dans les

cellules  $\beta$  chez le rat, suggérant que les endozépines pourraient être impliquées dans certaines formes de diabète insulinodépendant. Quelques années après la découverte du DBI, une protéine appelée *Acyl Co-A binding protein* (ACBP) a été purifiée et caractérisée à partir du foie de bœuf sur la base de sa capacité de stimuler la synthèse d'acides gras [76]. Or, les recherches d'analogie de structure ont montré que l'ACBP possède exactement la même séquence que le DBI. Il apparaît donc que le DBI pourrait exercer certaines fonctions métaboliques, telles que la régulation de la biosynthèse des acides gras (élongation des acides gras à 8-12 carbones), indépendamment de son rôle de ligand des récepteurs des benzodiazépines.

## Conclusion

Les endozépines constituent une

famille de polypeptides ubiquitaires dont la structure a été conservée au cours de l'évolution, depuis les unicellulaires jusqu'à l'homme. La plupart des effets des endozépines s'exercent par l'intermédiaire, soit des récepteurs des benzodiazépines associés au site GABA<sub>A</sub>, soit des récepteurs des benzodiazépines dits de type périphérique, localisés sur la membrane mitochondriale ou sur la membrane plasmique. Bien que les endozépines présentent de nombreuses activités pharmacologiques, leurs fonctions physiologiques et leurs modes d'action restent mal connus. Les travaux récents indiquent que les endozépines pourraient agir à la fois comme des messagers intercellulaires et des médiateurs intracellulaires. D'autres études en cours devraient permettre de déterminer le rôle des endozépines, notamment dans le système nerveux central et dans les glandes endocrines ■

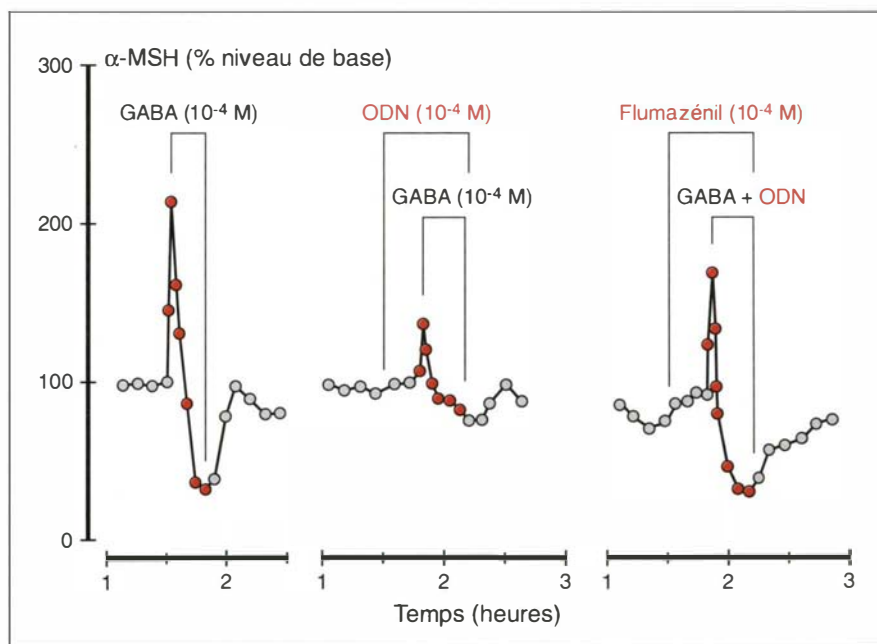


Figure 6. **Effet de l'endozépine ODN sur la réponse au GABA des cellules du lobe intermédiaire de l'hypophyse.** Administré *in vitro*, le GABA provoque sur la sécrétion d'hormone mélanotrope ( $\alpha$ -MSH) (points rouges) un effet biphasique qui est aboli en présence de l'octadécaneuropeptide (ODN). L'action de l'ODN est inhibée par un antagoniste spécifique des récepteurs des benzodiazépines, le flumazénil.

## Summary

### Endozepines : endogenous ligands for benzodiazepine receptors

Because of their anxiolytic, sedative and myo-relaxant properties, benzodiazepines are among the most commonly used drugs in clinical practice. The actions of benzodiazepines are mediated by two classes of receptors i.e. receptors associated with the GABA<sub>A</sub>-chloride channel complex also named central-type benzodiazepine receptors and receptors localized in the mitochondrial membrane called peripheral-type benzodiazepine receptors. The existence of binding sites for benzodiazepines has suggested the existence of endogenous ligands capable of interacting with either central or peripheral type benzodiazepine receptors. This hypothesis has led to the discovery of a family of regulatory peptides named endozepines which displace diazepam from its neuronal binding sites and exert a wide range of biological activities.