

La famille des récepteurs couplés aux protéines G et ses orphelins

Les récepteurs couplés aux protéines G partagent la même organisation structurale, répondent à une grande diversité de ligands et participent à la modulation des enzymes intracellulaires et des canaux ioniques par l'intermédiaire des protéines G hétérotrimériques. De nombreuses stratégies de criblage ont conduit au clonage de leurs gènes qui forment, chez les mammifères, une des plus grandes familles géniques : un grand nombre est caractérisé par les propriétés pharmacologiques. Il reste cependant un certain nombre de récepteurs dits « orphelins » car ils n'ont pu être attribués à des sous-familles connues, ni ne définissent de nouvelles sous-familles. C'est par l'étude de leur structure et de leur distribution tissulaire qu'on a pu en reconnaître certains. Les récepteurs restés orphelins constituent potentiellement l'un des éléments de nouveaux systèmes de communication intercellulaire et permettent à l'industrie pharmaceutique d'aborder des voies de recherche originales.

Marc Parmentier
Frédéric Libert
Gilbert Vassart

Remerciements

Nous remercions J.E. Dumont pour son continu support. Le travail réalisé dans le laboratoire des auteurs a été soutenu par le programme belge des Pôles d'Attraction Interuniversitaires initié par le Gouvernement Belge, Service du Premier ministre, Département de la Programmation Scientifique, ainsi que par le Fonds Médical Reine Elisabeth, le Fonds de la Recherche Scientifique Médicale et Boehringer Ingelheim. La responsabilité scientifique est assurée par les auteurs. M. Parmentier et F. Libert sont chercheurs qualifiés du Fonds National de la Recherche Scientifique.

ADRESSE

M. Parmentier, F. Libert : *chercheurs qualifiés du FNRS, IRIBHN*. G. Vassart : *chef du service de génétique médicale, Université libre de Bruxelles, Campus Erasme, 808, route de Lennik, B-1070 Bruxelles, Belgique.*

Les récepteurs couplés aux protéines G constituent de loin la plus grande famille de récepteurs membranaires, et vraisemblablement l'une des plus grandes familles multigéniques du génome des vertébrés. En effet, plus de 140 récepteurs ont été identifiés à ce jour (sans compter les récepteurs olfactifs), et il est probable que le nombre total de gènes dans cette famille (y compris les récepteurs olfactifs) dépasse de loin le millier. Un nombre important de gènes appartenant à cette famille ont été isolés, sans que leur fonction ne soit connue. Les récepteurs codés par ces gènes sont dès lors qualifiés d'« or-

phelins », en attendant l'identification de leur ligand et de leur fonction biologique.

Les récepteurs couplés aux protéines G répondent à des ligands aussi variés que des amines (noradrénaline, histamine, sérotonine...), des peptides (angiotensines, mélanocortines, endothélines...), de volumineuses hormones glycosylées (thyrotropine, hormone folliculo-stimulante...), des dérivés lipidiques (prostaglandines, leucotriènes...), des dérivés d'acides aminés (GABA), des nucléosides ou nucléotides (adénosine, ATP...), des ions (Ca^{2+}), une variété pratiquement infinie de substances odorantes (récepteurs olfactifs) ainsi que des

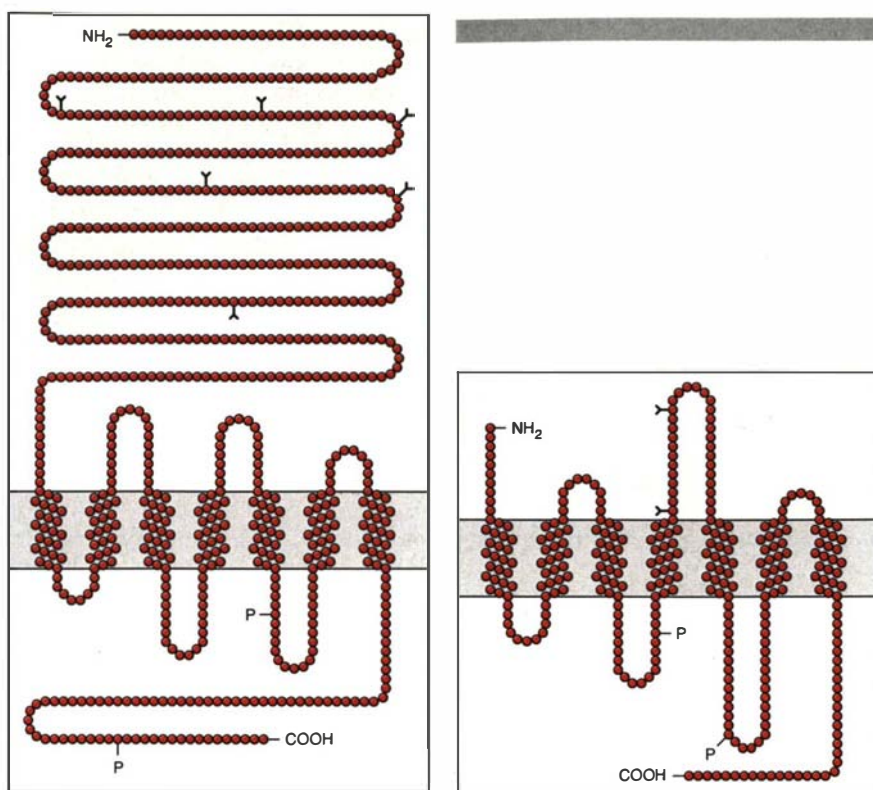


Figure 1. Organisation membranaire des récepteurs couplés aux protéines G. Les récepteurs humains de la thyrotropine (partie gauche) et A_1 de l'adénosine (partie droite) sont représentés à titre d'exemples. Les caractéristiques structurales rencontrées dans la presque totalité des récepteurs de cette famille sont indiquées. Les sites de glycosylation sont représentés par Y, les sites de phosphorylation par les protéine kinases A et C par P. Le récepteur de la thyrotropine se caractérise, comme les autres récepteurs des hormones glycoprotéiques, par son grand domaine amino-terminal extracellulaire, qui concourt à la liaison de l'hormone. Le récepteur A_1 de l'adénosine est parmi les plus petits récepteurs couplés aux protéines G. Son court domaine amino-terminal n'est pas glycosylé. Le récepteur porte, en revanche, deux sites de glycosylation dans sa deuxième boucle extracellulaire.

agents physiques (photons pour la rhodopsine et les pigments visuels). Cette très grande variété de signaux extracellulaires provoque l'activation d'un nombre limité de cascades intracellulaires, par l'intermédiaire de protéines trimériques liant le GTP (protéines G). Les protéines effectrices intracellulaires dont l'activité est modulée par les protéines G sont l'adénylyl cyclase (stimulation ou inhibition), les phospholipases C et A2 (stimulation), la GMPC phosphodiesterase, ainsi que les canaux calciques (ouverture ou fermeture) et potassiques (ouverture). Cette liste n'est pas nécessairement limitative, puisqu'il a par exemple été récemment

proposé que le récepteur AT_2 de l'angiotensine était couplé à l'inhibition d'une activité tyrosine phosphatase (*m/s n° 10, vol. 10, p. 1052, [1]*), et il est probable que d'autres cascades effectrices restent encore à découvrir. Les protéines G sont constituées par l'assemblage de sous-unités α , β et γ . Chacune de ces composantes présente une diversité structurale. C'est ainsi que chez les vertébrés, les sous-unités α , β et γ sont codées par respectivement 17, 4 et 7 gènes. La sous-unité α a longtemps été considérée comme responsable de la spécificité d'interaction à la fois avec le récepteur et la protéine effectrice. Un nombre important de tra-

voux récents démontre cependant la contribution de β et γ à la spécificité de l'interaction récepteur-protéine G, ainsi que du complexe $\beta\gamma$ au contrôle de l'activité de protéines effectrices telles que l'adénylyl cyclase, la phospholipase C et les canaux ioniques [2].

Les récepteurs couplés aux protéines G sont constitués d'une chaîne polypeptidique unique comprenant sept segments hydrophobes qui forment autant d'hélices α transmembranaires (*figure 1*). Cette structure rappelle celle de la bactériorhodopsine, pompe à protons de *Halobacterium halobium*, dont la structure tridimensionnelle a été déterminée par cryomicroscopie électronique à haute résolution [3]. La structure de la bactériorhodopsine a servi de base aux premières modélisations moléculaires de récepteurs couplés aux protéines G [4, 5]. Sur la base de leur structure primaire, les récepteurs couplés aux protéines G peuvent être classés en trois sous-familles qui ne présentent entre elles que peu de similitude (*figure 2*). L'une de ces sous-familles comporte les récepteurs métabotropiques du glutamate ainsi que le récepteur du Ca^{2+} de la parathyroïde (*m/s n° 4, vol. 10, p. 475*). Une deuxième sous-famille comprend une partie des récepteurs peptidergiques (calcitonine, parathormone, VIP, glucagon, GHRH...). La troisième sous-famille enfin, de loin la plus nombreuse, comprend tous les autres groupes. Il est possible cependant que l'homogénéité de structure partagée par pratiquement tous les récepteurs couplés aux protéines G puisse souffrir quelques exceptions. En effet, il a été proposé que le récepteur de l'IGF₂, qui ne comporte qu'un seul segment transmembranaire, soit couplé à l'ouverture d'un canal calcium par l'intermédiaire de la protéine G_i [6].

Les relations structure/fonction ont été étudiées sur un nombre limité de récepteurs couplés aux protéines G, pris comme modèles de l'ensemble de la famille. Ces études ont porté particulièrement sur les récepteurs adrénergiques et muscariniques, ainsi que sur la rhodopsine. Des revues récentes ont été consacrées aux conclusions de ces travaux [7, 8]. Pour les récepteurs adrénergiques, par exemple, toutes les données ex-

RÉFÉRENCES

1. Kambayashi Y, Bardhan S, Takahashi K, *et al.* Molecular cloning of a novel angiotensin II receptor isoform involved in phosphotyrosine phosphatase inhibition. *J Biol Chem* 1993 ; 268 : 24543-8.
 2. Emala CW, Schwindinger WF, Wand GS, Levine MA. Signal-transducing G proteins : basic and clinical applications. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 1994 ; 17 : 81-111.
 3. Henderson RJ, Baldwin J, Ceska TH, Zemlin F, Beckman L, Downing K. Model for the structure of bacteriorhodopsin based on high resolution cryomicroscopy. *J Mol Biol* 1990 ; 213 : 899-929.
 4. Findlay J, Eliopoulos E. Three-dimensional modelling of G protein-linked receptors. *Trends Pharmacol Sci* 1990 ; 11 : 492-9.
 5. Hibert MF, Trumpp-Kallmeyer S, Bruinvels A, Hoflack J. Three-dimensional models of neurotransmitter G protein-coupled receptors. *Mol Pharmacol* 1991 ; 40 : 8-15.
 6. Okamoto T, Katada T, Murayama Y, Ui M, Ogata E, Nishimoto I. A simple structure encodes G protein-activating function of the IGF-II/mannose 6-phosphate receptor. *Cell* 1990 ; 62 : 709-17.
 7. Kobilka B. Adrenergic receptors as models for G protein-coupled receptors. *Annu Rev Neurosci* 1992 ; 15 : 87-114.
 8. Hargrave PA, McDowell JH. Rhodopsin and phototransduction: a model system for G protein-linked receptors. *FASEB J* 1992 ; 6 : 2323-31.
 9. Nathans J, Hogness DS. Isolation and nucleotide sequence of the gene encoding human rhodopsin. *Proc Natl Acad Sci USA* 1984 ; 81 : 4851-5.
 10. Yarden Y, Rodriguez H, Wong SKF, *et al.* The avian β -adrenergic receptor: primary structure and membrane topology. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986 ; 83 : 6795-9.
 11. Dixon RAF, Kobilka BK, Strader DJ, *et al.* Cloning of the gene and cDNA for mammalian β -adrenergic receptor and homology with rhodopsin. *Nature* 1986 ; 321 : 75-9.
 12. Kubo T, Fukuda K, Mikami A, *et al.* Cloning, sequencing and expression of complementary DNA encoding the muscarinic acetylcholine receptor. *Nature* 1986 ; 323 : 411-6.
- périmentales convergent vers un modèle où le site de liaison est formé par la juxtaposition des segments transmembranaires et est profondément enfoui au sein de la membrane plasmique. La troisième boucle intracytoplasmique est principalement responsable de la spécificité d'interaction avec les protéines G, bien que la deuxième boucle intracellulaire et le premier segment de l'extrémité carboxy-terminale soient également concernés. La phosphorylation est impliquée dans les phénomènes de désensibilisation des récepteurs couplés aux protéines G, et la majorité des récepteurs de cette famille (*figure 1*) comportent des sites potentiels de phosphorylation par les protéine kinases A et C ainsi que par une famille de kinases spécifiques dont font partie la rhodopsine kinase et la kinase des récepteurs β -adrénergiques (β ARK).

Stratégies de clonage

Les premiers récepteurs couplés aux protéines G à avoir été clonés sont la rhodopsine [9], deux sous-types de récepteurs β -adrénergiques [10, 11], ainsi que le récepteur muscarinique M_1 de l'acétylcholine [12]. Les ADNc de ces récepteurs ont été clonés après qu'on a eu purifié les protéines correspondantes et déterminé la séquence peptidique de fragments protéolytiques. La notion que tous les récepteurs couplés aux protéines G (ou du moins la plupart d'entre eux) possèdent la même organisation transmembranaire, calquée sur le modèle de la bactériorhodopsine, résulte directement de ces travaux. Bien que quelques autres gènes de cette famille aient, par la suite, été isolés par la même approche de purification protéique, la majorité des clonages ultérieurs ont fait appel à des stratégies fondées sur l'expression des protéines recombinantes, ou sur l'analogie de structure existant entre les gènes codant pour ces récepteurs. Le criblage par expression dans l'ovocyte de xénope, fondé sur la détection (par la technique du voltage imposé) d'un courant chlorure en réponse à un agoniste, a tout d'abord été appliqué au clonage du récepteur de la substance K [13]. Bien que limitée au clonage de récepteurs couplés à la phospholipase C, cette méthode a

été particulièrement fructueuse, puisqu'elle a conduit au clonage de nombreux récepteurs activant cette cascade. Plus récemment, le criblage par expression, fondé sur la liaison de ligands radiomarqués à des cellules transfectées par des banques d'ADNc, a notamment mené au clonage des récepteurs opioïde δ [14] et angiotensine AT_2 [1].

Après qu'ait été reconnue l'homogénéité structurale des récepteurs couplés aux protéines G, le criblage par homologie a contribué largement à l'extension de la famille. L'hybridation à basse stringence a tout d'abord permis d'isoler des gènes fortement apparentés aux séquences connues, conduisant à l'accumulation rapide de nouveaux sous-types. La plupart des récepteurs adrénergiques, dopaminergiques et muscariniques ont été clonés de cette façon, de même que les premiers récepteurs orphelins. C'est le cas du clone G21, isolé par hybridation croisée avec le gène du récepteur β_2 adrénergique [15], et identifié ultérieurement comme codant pour un récepteur 5-HT_{1A} [16]. La méthode de clonage par homologie, fondée sur l'utilisation de la PCR et d'amorces dégénérées correspondant aux segments les mieux conservés parmi les récepteurs couplés aux protéines G, a encore accentué la vitesse à laquelle se sont accumulés les récepteurs clonés. Elle a en effet permis d'obtenir des sondes correspondant à des récepteurs structurellement éloignés, et donc d'isoler les premiers membres de nouveaux groupes. Nous avons été les premiers à développer cette approche dans le but de cloner le récepteur de la thyrotropine. Dans un premier temps, quatre nouveaux récepteurs ont été clonés à partir d'ADNc de thyroïde de chien [17]. Trois de ces récepteurs orphelins ont, depuis, été identifiés comme les récepteurs A_1 et A_{2a} de l'adénosine et le récepteur 5-HT_{1D} de la sérotonine [18-20]. Ultérieurement, plus de trente clones supplémentaires furent obtenus à partir d'ADN génomique ou d'ADNc, incluant le récepteur de la thyrotropine [21, 22]. Cette approche a depuis été utilisée très largement par d'autres groupes, menant à l'isolement et à la caractérisation de récepteurs tels que les récepteurs histamine H_2 [23], olfactifs [24-26] ou des

mélanocortines [27, 28]. Elle a aussi abouti à l'accumulation d'un grand nombre de récepteurs orphelins qui restent non caractérisés à ce jour.

Les récepteurs orphelins

Le criblage par homologie a conduit à isoler des gènes codant pour de nouveaux récepteurs de fonction inconnue. Le criblage à basse stringence a permis l'isolement de gènes étroitement apparentés aux gènes déjà identifiés. Comme une similitude de séquence va généralement de pair avec une analogie de fonction, l'identification pharmacologique des récepteurs clonés de cette façon a, dans la plupart des cas, été relativement directe. Cette approche a contribué à l'extension des groupes existants. C'est ainsi que le groupe des récepteurs de la sérotonine inclut actuellement des récepteurs (5-HT_{5A}, 5-HT_{5B}, 5-HT₆, 5-HT₇) dont la pharmacologie est partiellement caractérisée, mais dont le rôle biologique doit encore être précisé [29]. La PCR, utilisant des oligonucléotides dégénérés comme amorces, ainsi que des approches de criblage différentiel ou de séquençage systématique de génomes ont, de plus, permis l'isolement de récepteurs appartenant à des groupes totalement neufs. L'identification fonctionnelle de ces récepteurs orphelins s'est alors révélée plus complexe. La similitude plus ou moins grande de structure primaire avec les récepteurs caractérisés peut, dans certains cas, servir de base à l'établissement d'hypothèses quant à la nature des agonistes potentiels. Le criblage systématique de tous les ligands connus pour interagir avec des récepteurs couplés aux protéines G a été tenté dans certains cas, avec des succès limités. Le criblage fondé sur des expériences de liaison s'avère en effet peu réaliste : les ligands radiomarqués ne sont pas toujours aisément disponibles, et chaque protocole de liaison nécessite une mise au point et des contrôles spécifiques. Le criblage par tests fonctionnels fondé sur le dosage d'un second messenger intracellulaire est théoriquement plus simple à mettre en œuvre. La possibilité de coupler une cascade intracellulaire à l'activité transcriptionnelle d'un gène dont le produit est facilement détectable et

quantifiable (tel que le gène de la luciférase [30]) rend cette approche encore plus réaliste. L'impossibilité de déterminer *a priori* la cascade activée par un récepteur orphelin sur la base de sa seule structure primaire limite cependant l'efficacité d'un tel criblage de ligands, puisque différentes cascades doivent être envisagées. D'autres approches, faisant appel à des biodétecteurs capables de détecter la stimulation d'un récepteur, quelle que soit la cascade impliquée, sont disponibles depuis peu et constitueront une alternative intéressante dans l'avenir. C'est ainsi que l'activation d'une cascade intracellulaire s'accompagne généralement d'une modification du métabolisme cellulaire. Ces modifications de métabolisme peuvent être mesurées en temps réel [31], et cette approche peut donc constituer un moyen rapide de détecter le couplage d'un ligand à un récepteur orphelin exprimé dans une lignée cellulaire. Une autre approche consiste à exprimer le récepteur dans des mélanophores de xénope et à enregistrer, par caméra vidéo, les modifications de distribution de mélanosomes en réponse à la stimulation de ce récepteur [32]. Dans la grande majorité des cas, cependant, les identifications de récepteurs orphelins ont résulté de la détermination de la distribution tissulaire des transcrits par *Northern blot*, *RNase protection assay* et/ ou hybridation *in situ*, et de la corrélation de ces profils de distribution avec le profil attendu pour des récepteurs spécifiques. La vérification de l'hypothèse est dès lors simple, à la fois par des expériences de liaison et des tests fonctionnels.

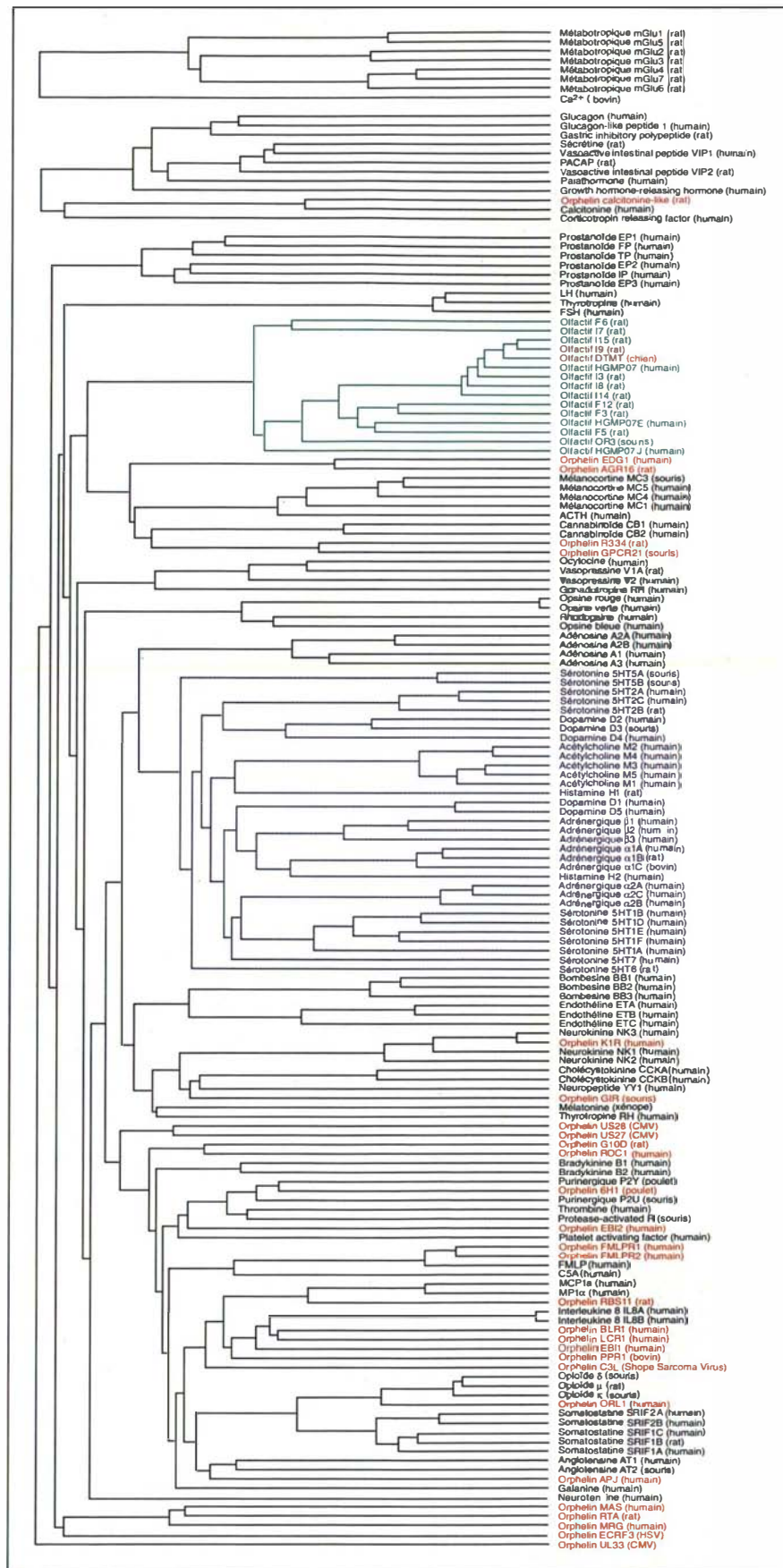
Dans notre expérience, la caractérisation de récepteurs orphelins a effectivement été guidée par les similitudes de structure, d'une part, et la distribution tissulaire, d'autre part. Le clone orphelin RDC4 [17] a ainsi été identifié comme codant pour un récepteur sérotonine sur la base de son analogie avec le récepteur 5HT_{1A}. Des expériences de liaison et de stimulation fonctionnelle ont ensuite démontré un profil pharmacologique correspondant au sous-type 5HT_{1D} [20]. Dans le cas d'un autre récepteur orphelin (HGMP09), nous avons déterminé par *Northern blot* que son expression était limitée au testi-

cule et à l'ovaire. Cette distribution suggéra que HGMP09 pouvait coder pour le récepteur de l'hormone folliculo-stimulante [21]. Cette hypothèse fut effectivement confirmée par la suite. Un clone structurellement apparenté était, pour sa part, exprimé exclusivement dans le tissu thyroïdien, et l'expression fonctionnelle confirma que ce clone codait pour le récepteur de la thyrotropine, qui constituait le but initial de notre recherche en ce domaine [21, 22]. Deux autres récepteurs orphelins (structurellement apparentés), baptisés RDC7 et RDC8, présentaient une faible similitude avec les récepteurs des amines mais ne possédaient pas dans leur troisième segment transmembranaire le résidu aspartate caractéristique de cette famille. L'hybridation *in situ* permit de démontrer l'expression préférentielle de RDC7 dans le cortex cérébral de rat, alors que les transcrits codant pour RDC8 étaient présents en abondance dans le striatum [33]. Cette distribution était compatible avec celle connue respectivement pour les récepteurs adénosine A₁ et A_{2a}. L'expression fonctionnelle des récepteurs recombinants permit de confirmer cette hypothèse et démontra l'identité du profil pharmacologique des récepteurs recombinants et de celui des récepteurs cérébraux naturels [18, 19]. D'autres exemples, pour lesquels la détermination de la distribution tissulaire fut déterminante dans la procédure de caractérisation de récepteurs orphelins, incluent le récepteur cannabinoïde (CB₁) central [34], le récepteur Y₁ du neuropeptide Y [35, 36] et les récepteurs MC₁ et MC₂ des mélanocortines [27]. Dans le cas des récepteurs D₁ de la dopamine [37], et H₂ de l'histamine [22], c'est la combinaison de la distribution tissulaire, et de la similitude de ces récepteurs avec les récepteurs aminergiques qui ont permis leur identification.

Par l'utilisation des différentes procédures de clonage énumérées ci-dessus, la plupart des récepteurs caractérisés par leur pharmacologie ont à présent été clonés. La *figure 2* rend compte des gènes codant pour des récepteurs couplés aux protéines G qui sont aujourd'hui disponibles, chez l'homme ou dans d'autres espèces de mammifères, et représente,

RÉFÉRENCES

13. Masu Y, Nakayama K, Tamaki H, Harada Y, Nakanishi S. cDNA cloning of substance K receptor through oocyte expression system. *Nature* 1987 ; 329 : 836-8.
14. Kieffer BL, Befort K, Gaveriaux-Ruff C, Hirth CG. The delta-opioid receptor: isolation of a cDNA by expression cloning and pharmacological characterization. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992 ; 89 : 12048-52.
15. Kobilka BJ, Frielle T, Collins T, *et al.* An intronless gene encoding a potential member of the family of receptors coupled to guanine nucleotide regulatory proteins. *Nature* 1987 ; 329 : 75-9.
16. Fargin A, Raymond JR, Lohse MJ, Kobilka BK, Caron M, Lefkowitz RJ. The genomic clone G-21 which resembles a beta-adrenergic receptor sequence encodes the 5-HT1A receptor. *Nature* 1988 ; 335 : 358-60.
17. Libert F, Parmentier M, Lefort A, *et al.* Selective amplification and cloning of four new members of the G protein-coupled receptor family. *Science* 1989 ; 244 : 569-72.
18. Maenhaut C, Van Sande J, Libert F, *et al.* RDC8 codes for an adenosine A2 receptor with physiological constitutive activity. *Biochem Biophys Res Commun* 1990 173 : 1169-78.
19. Libert F, Schiffmann S, Lefort A, *et al.* The orphan receptor RDC7 encodes an A1 adenosine receptor. *EMBO J* 1989 ; 10 : 1677-82.
20. Maenhaut C, Van Sande J, Massart C, *et al.* The orphan receptor RDC4 encodes a 5-HT1D serotonin receptor. *Biochem Biophys Res Commun* 1991 ; 180 : 1460-8.
21. Parmentier M, Libert F, Maenhaut C, *et al.* Molecular cloning of the thyrotropin receptor. *Science* 1989 ; 246 : 1620-2.
22. Vassart G, Parmentier M, Libert F, Dumont J. Le récepteur de la thyrotropine : un membre pas comme les autres de la famille des récepteurs couplés aux protéines G. *médecine/sciences* 1990 ; 6 : 985-90.
23. Gantz I, Schaffer M, Del Valle J, *et al.* Molecular cloning of a gene encoding the histamine H2 receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991 ; 88 : 429-33.



sous la forme d'un dendrogramme, les similitudes de structure existant entre eux. Parmi les entités pharmacologiques bien définies dont les gènes n'ont pas encore été clonés, on peut inclure les récepteurs 5-HT₄ de la sérotonine et H₃ de l'histamine, le récepteur GABA_B, les récepteurs du CGRP, de l'amyline, Y₂ du neuropeptide Y, V_{1B} de la vasopressine, ainsi que les récepteurs DP des prostaglandines et LTB₄, LTC₄ et LTD₄ des leukotriènes. Par comparaison, les récepteurs orphelins rapportés dans la littérature sont de plus en plus nombreux. Les séquences ont été publiées à ce jour pour une trentaine d'entre eux (*Tableau I*). Parmi ces récepteurs orphelins, certains appartiennent clairement à des groupes de récepteurs dont d'autres membres sont identifiés. C'est le cas de K1R (apparenté aux récepteurs des tachykinines), de ORL1 (apparenté aux récepteurs des opiacés), FMLPR1 et FMLPR2 (structurellement proches du récepteur FMLP) par exemple. Le récepteur ORL1 répond d'ailleurs à certains ligands opiacés à fortes concentrations [38]. Cette réponse biologique a permis de préciser la nature du couplage aux cascades intracellulaires (inhibition de l'adénylyl cyclase), et de confirmer par des critères fonctionnels son appartenance au groupe des récepteurs des opiacés. ORL1 ne répond cependant pas aux ligands naturels des récepteurs des opiacés, et les ligands endogènes

de ce récepteur, de même que son rôle biologique, restent encore à découvrir. La distribution de certains orphelins permet parfois de proposer leur implication dans une fonction biologique spécifique. Le récepteur DTMT (appartenant au groupe des récepteurs olfactifs) est, par exemple, présent dans la membrane des spermatozoïdes mûrs [39, 40], suggérant un rôle dans le contrôle de la fécondation. D'autres récepteurs orphelins constituent de véritables groupes non caractérisés. L'oncogène mas, ainsi que les récepteurs apparentés RTA et MRG, de même que G10d et RDC1 ne présentent d'analogies importantes avec aucun récepteur identifié (*figure 2* et *Tableau I*). Les récepteurs orphelins Edg1, Agr16, R334 et GPCR21 ne présentent qu'une faible similitude avec les récepteurs des cannabinoïdes et des mélanocortines.

De nombreux récepteurs orphelins sont apparentés aux récepteurs des chémokines. Ce sont par exemple RBS11, BLR1, EB11, LCR1, PPR1. Cela est à mettre en relation avec le grand nombre de chémokines découvertes récemment, et dont les sites de liaison n'ont pas été caractérisés en détail. Il convient de mentionner aussi plusieurs récepteurs, issus du séquençage de génomes viraux, dont l'expression dans les cellules infectées confère vraisemblablement au virus une protection en trompant le système immunitaire de l'hôte. Certains de ces récepteurs sont apparentés aux récepteurs des chémokines (C31), ou ont été démontrés comme liant des chémokines (US28).

Outre les récepteurs repris dans le *Tableau I*, de nombreux orphelins n'ont pas été publiés par les laboratoires qui les ont isolés, dans l'attente de leur identification fonctionnelle. De nos propres données, et de contacts établis avec différentes équipes, il ressort que le nombre de récepteurs clonés, mais non caractérisés à ce jour, dépasse vraisemblablement la centaine, et que leur caractérisation fera donc pratiquement doubler dans le futur le nombre d'entités pharmacologiques appartenant à cette famille. Certains de ces récepteurs orphelins correspondent vraisemblablement aux quelques récepteurs connus, mais non clonés actuellement. D'autres sont potentielle-

ment les récepteurs de ligands à la fonction actuellement mal définie, tels que les peptides issus de la chromogranine ou les dérivés de l'imidazole, ou encore de ligands dont l'action biologique classique passe par des récepteurs d'autres superfamilles (récepteurs nucléaires, récepteurs à activité tyrosine kinase). Des récepteurs membranaires de stéroïdes ont par exemple été décrits, mais ne sont pas actuellement caractérisés.

Parmi les récepteurs orphelins qui ont été, ou qui seront clonés dans le futur, il est raisonnable de postuler que nombre d'entre eux correspondent à des ligands totalement inconnus actuellement. La découverte récente d'une profusion de petits peptides appartenant aux familles des cytokines et chémokines démontre que de nombreuses molécules vectrices d'information ne sont pas connues. Les récepteurs orphelins constituent potentiellement l'un des éléments de ces nouveaux systèmes de communication intercellulaire, et pourraient dès lors représenter un moyen de les mettre en évidence. Cette nouvelle approche en recherche pharmacologique a été appelée pharmacologie inverse. Le rôle central des récepteurs membranaires dans le contrôle de la fonction cellulaire, et leur accessibilité font de ces molécules les cibles de choix pour les agents pharmacologiques. Les récepteurs orphelins constituent, dès lors, pour l'industrie pharmaceutique des voies de recherche originales pouvant mener vers de nouvelles classes d'agents thérapeutiques. Il est également possible, comme cela a été proposé pour les récepteurs orphelins de la famille des récepteurs nucléaires [41], que certains de ces récepteurs soient dotés d'une activité constitutive, indépendante de la liaison de ligands, et apte à modifier le niveau d'activité basal de certaines cascades intracellulaires.

Conclusions et perspectives

Étant donné le rythme auquel les récepteurs couplés aux protéines G ont été clonés au cours des dernières années, il est raisonnable de postuler que toutes les entités pharmacolo-

◀ **Figure 2. Dendrogramme représentant les similitudes existant entre les différents groupes de récepteurs couplés aux protéines G clonés à ce jour, dans les trois sous-familles structurelles. Les dendrogrammes ont été réalisés par le programme d'alignement multiple Pileup du GCG [46]. L'analyse tient compte, pour chaque récepteur, d'un segment de 120 acides aminés recouvrant les trois premiers segments transmembranaires, à l'exclusion du domaine amino-terminal extracellulaire. Les récepteurs orphelins sont en rouge. A titre d'exemple de groupes homogènes sur les plans structurel et fonctionnel, les récepteurs des amines sont en bistre, tandis que les récepteurs olfactifs sont en rose.**

Tableau I

RÉCEPTEURS ORPHELINS COUPLÉS AUX PROTÉINES G

| Nom | Espèce | No acc | Références | Similarité | Criblage | Distribution tissulaire et dans lignées cellulaires |
|---------------|--------|------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------|----------------------------------|-------------------------------------------------------------------------|
| GPCR | L. st. | Z23104 | Tensen <i>et al.</i> non publié | TSH, LH, FSH | | système nerveux |
| GHRA | A. el. | Z28332 | Nothacker <i>et al. Biochem Biophys Res Commun</i> 1993; 197: 1062 | TSH, LH, FSH | PCR | nd |
| DTMT | Chien | X64996 | Parmentier <i>et al.</i> 1992; <i>Nature</i> 355: 453 | olfactif | PCR | testicule |
| EDG1 | Humain | M31210 | Hla <i>et al. J Biol Chem</i> 1990; 265: 9308 | CB, MC | cribl. diff | cerveau; cellules musculaires lisses, fibroblastes et mélanocytes |
| AGR16 | Rat | S55602 | Okazaki <i>et al. Biochem Biophys Res Commun</i> 1993; 190: 1104 | CB, MC | PCR | poumon, cœur, estomac, intestin, surrénale, cerveau... |
| R334 | Rat | X61496 | Eidne <i>et al. FEBS Lett</i> 1991; 292: 243 | CB, MC | PCR | cerveau, hypophyse |
| | Souris | D21061 | Saeki <i>et al. FEBS Lett</i> 1993; 336: 317 | | | |
| GPCR21 | Souris | D21062 | Saeki <i>et al. FEBS Lett</i> 1993; 336: 317 | CB, MC | PCR | cerveau, testicule |
| US28 | CMV | X17403 | Chee <i>et al. Nature</i> 1990; 344: 774 | - | genom | na |
| US27 | CMV | X17403 | Chee <i>et al. Nature</i> 1990; 344: 774 | - | genom | na |
| G10D | Rat | L09249 | Harrison <i>et al. FEBS Lett</i> 1993; 316: 17 | RDC1 | PCR | poumon, surrénale, foie, rein, cœur, testicule, aorte, cerveau, rate... |
| RDC1 | Chien | L04672 X14048 | Eva <i>et al. DNA Cell Biol</i> 1993; 12: 393 Libert <i>et al. Science</i> 1989; 244: 569 | - | PCR | rein, cœur, thyroïde, cerveau, rate... |
| | Humain | M64749 | Sreedharan <i>et al. Proc Natl Acad Sci USA</i> 1991; 88: 4986 | | | |
| FMLPR1 | Humain | M76673 L14061 | Bao <i>et al. Genomics</i> 1992; 13: 437 Nomura <i>et al.</i> non publié | FMLP | hybrid | nd |
| FMLPR2 | Humain | M76672 M84562 | Bao <i>et al. Genomics</i> 1992; 13: 437 Murphy <i>et al. J Biol Chem</i> 1992; 267: 7637 | FMLP | hybrid | neutrophiles |
| | | M88107 | Ye <i>et al. Biochem Biophys Res Commun</i> 1992; 184: 582 | | | |
| | | X63819 | Perez <i>et al. Gene</i> 1992; 118: 303 | | | |
| RBS11 | Rat | D10922 U04808 | Nomura <i>et al.</i> non publié Harrison <i>et al. Neurosci Lett</i> 1994; 169: 85 | MIP1a, MCP1 | hybrid | cerveau, rein, utérus, intestin, testicule, canal déférent, prostate... |
| BLR1 | Humain | X68149 | Dobner <i>et al. Eur J Immunol</i> 1992; 22: 2795 | IL8 | cribl. diff | rate, amygdale, cerveau, hypophyse, surrénale |
| | Souris | X71788 | Kaiser <i>et al. Eur J Immunol</i> 1993; 23: 2539 | | cellules B, lymphomes de Burkitt | |
| LCR1 | Rat | | Kouba <i>et al. FEBS Lett</i> 1993; 321: 173 | | | |
| | Bovin | M86739 | Rimland <i>et al. Mol Pharmacol</i> 1991; 40: 869 | IL8 | PCR | cerveau, cœur, rein, foie, poumon, côlon... |
| | Humain | L01639 | Jazin <i>et al. Regul Peptides</i> 1993; 47: 247 | | | neutrophiles, cellules T activées, lymphomes de Burkitt |
| | | M99293 | Federspiel <i>et al. Genomics</i> 1993; 16: 707 | | | |
| EBI1 | Humain | X71635 L08176 | Loetscher <i>et al. J Biol Chem</i> 1994; 269: 232 Birkenbach <i>et al. J Virol</i> 1993; 67: 2209 | IL8 | cribl. diff | cellules B et T, rate, amygdale |
| PPR1 | Bovin | S63848 | Matsuoka <i>et al. Biochem Biophys Res Commun</i> 1993; 194: 504 | IL8 | PCR | poumon, muqueuses olfactives et gustatives, rein |
| C3L | SFV | L22013 | Massung <i>et al. Virology</i> 1993; 197: 511 | IL8 | genom | na |
| ORL1 | Humain | X77130 | Mollereau <i>et al. FEBS Lett</i> 1994; 341: 33 | opioïd | PCR | cerveau (septum, hypothalamus, hippocampe, amygdale) |

Tableau I (suite)

RÉCEPTEURS ORPHELINS COUPLÉS AUX PROTÉINES G

| Nom | Espèce | No acc | Références | Similarité | Criblage | Distribution tissulaire et dans lignées cellulaires |
|----------------------------------|--------|--------|------------------------------------------------------------------|--------------|------------------|---------------------------------------------------------------------|
| 6H1 | Souris | U04952 | Yasuda <i>et al.</i> non publié | P2 | hybrid | cellules T activées |
| | Rat | D16538 | Fukuda <i>et al.</i> <i>FEBS Lett</i> 1994; 343: 42 | | | |
| APJ | Poulet | U05239 | Meng <i>et al.</i> non publié | AT | PCR | cerveau |
| | | L06109 | Kaplan <i>et al.</i> <i>J Immunol</i> 1993; 151: 1 | | | |
| EBI2 | Humain | U03642 | O'Dowd <i>et al.</i> <i>Gene</i> 1993; 136: 355 | - | cribl. diff | cellules B, poumon, rate, amygdale |
| K1R | Humain | M84605 | Birkenbach <i>et al.</i> <i>J Virol</i> 1993; 67: 2209 | NK3 | panning | nd |
| GIR | Souris | M80610 | Xie <i>et al.</i> <i>Proc Natl Acad Sci USA</i> 1992; 89: 4124 | | | |
| Mas | Humain | M13150 | Harrigan <i>et al.</i> <i>Mol Endocrinol</i> 1991; 5: 1331 | NPY, CCK, NK | cribl. diff onco | cerveau, thymus, rate |
| | | M13150 | Young <i>et al.</i> <i>Cell</i> 1986; 45: 711 | | | |
| RTA | Rat | J03823 | Young <i>et al.</i> <i>Proc Natl Acad Sci USA</i> 1988; 85: 5339 | - | oligo | cerveau (hippocampe, cortex) |
| | Souris | X67735 | Metzger <i>et al.</i> non publié | | | |
| MRG | Rat | M35297 | Ross <i>et al.</i> <i>Proc Natl Acad Sci USA</i> 1990; 87: 3052 | Mas | hybrid | intestin, canal déférent, utérus, aorte, cervelet, tissu adipeux... |
| | | S78653 | Monnot <i>et al.</i> <i>Mol Endocrinol</i> 1991; 5: 1477 | | | |
| ECRF3 | Humain | M86409 | Nicholas <i>et al.</i> <i>Nature</i> 1991; 355: 362 | - | genom | na |
| UL33 | CMV | X17403 | Chee <i>et al.</i> <i>Nature</i> 1990; 344: 774 | - | genom | na |
| CT-like ZK643.3 | Rat | L27487 | Chang <i>et al.</i> non publié | CT | ? | nd |
| | C.el. | Z11126 | Sulston <i>et al.</i> <i>Nature</i> 1992; 356: 37 | | | |

Liste des récepteurs orphelins publiés, reprenant le nom utilisé lors de la publication initiale, les espèces pour lesquelles les séquences sont disponibles, les numéros d'accès (No acc) des séquences dans les banques de données Genbank/EMBL et les références correspondantes, les similitudes avec d'autres récepteurs de la famille, la stratégie de criblage qui a initialement mené à leur clonage et, quand elles sont disponibles, les informations concernant la distribution tissulaire de ces récepteurs. Abréviations : L. st.: *Limnaea stagnalis*; A. el.: *Anthopleura elegantissima*; CMV: cytomégalo-virus; SFV: Shope sarcoma virus; HSV: Herpes simplex virus; C. el.: *Caenorhabditis elegans*; IL8: interleukine 8, P2: purinergique P2; AT: angiotensine; NK: neurokinine; NPY: neuropeptide Y; CCK: cholécystokinine; CT: calcitonine; CB: cannabinoïde; MC: mélanocortine; cribl. diff: criblage différentiel; genom: séquençage systématique de génomes; hybrid: criblage par hybridation à basse stringence; oligo: criblage par oligonucléotide; panning: criblage par panning; onco: criblage fondé sur l'activité oncogénique; na: non applicable; nd: non déterminé.

giques connues seront clonées dans un futur proche. De même, les sous-types suspectés ou non suspectés de récepteurs connus seront clonés par homologie et caractérisés pour leurs propriétés pharmacologiques et fonctionnelles. Cela va permettre à l'industrie pharmaceutique de fonder toutes ses procédures de criblage primaire sur l'utilisation de récepteurs humains (la cible finale des médicaments développés) recombinants plutôt que sur des membranes d'origine animale. La disponibilité de ces récepteurs humains devrait permettre d'améliorer l'efficacité globale de la procédure de criblage, et de

développer des substances actives dotées d'une plus grande spécificité. La structure tridimensionnelle précise n'est connue pour aucun des membres de la famille des récepteurs couplés aux protéines G. Il est généralement admis qu'ils adoptent une conformation similaire à celle de la bactériorhodopsine. Sur la base de cette probable analogie de structure, des modèles de structure tridimensionnelle ont été élaborés pour certains récepteurs [4, 5, 42]. Cependant, la faible similitude et la grande distance évolutive entre les récepteurs couplés aux protéines G et la bactériorhodopsine font que la mo-

délisation moléculaire est vraisemblablement imprécise. La disponibilité de récepteurs recombinants en quantité chimique devrait permettre, dans l'avenir, de cristalliser certaines de ces molécules et de déterminer leur structure réelle. La connaissance de la structure tertiaire de quelques récepteurs représentatifs de la famille pourrait alors servir de base à une modélisation plus précise de tous les récepteurs couplés aux protéines G, et plus particulièrement de leur site de liaison, permettant une conception plus rationnelle de ligands spécifiques à activités agoniste ou antagoniste.

RÉFÉRENCES

24. Buck L, Axel R. A novel multigene family may encode odorant receptors: a molecular basis for odor recognition. *Cell* 1991 ; 65 : 175-87.
25. Parmentier M, Libert F, Schurmans S, *et al.* Members of the putative olfactory receptor gene family are expressed in mammalian germ cells. *Nature* 1992 ; 355 : 453-5.
26. Parmentier M, Vanderhaegen P, Schurmans S, Libert F, Vassart G. Génétique moléculaire des récepteurs olfactifs. *médecine/sciences* 1994 ; 10 : 1083-90.
27. Mountjoy KG, Robbins LS, Mortrud MT, Cone RD. The cloning of a family of genes that encode the melanocortin receptors. *Science* 1992 ; 257 : 1248-51.
28. Labbé O, Desarnaud F, Eggerickx D, Vassart G, Parmentier M. Molecular cloning of a mouse melanocortin 5 receptor gene widely expressed in peripheral tissues. *Biochemistry* 1994 ; 33 : 4543-9.
29. Martin GR, Humphrey PPA. Receptors for 5-hydroxytryptamine: current perspectives on classification and nomenclature. *Neuropharmacology* 1994 ; 33 : 261-73.
30. Himmler A, Stratowa C, Czernilowski AP. Functional testing of dopamine D1 and D5 receptors expressed in stable cAMP-responsive luciferase reporter cell lines. *J Recept Res* 1993 ; 13 : 79-94.
31. McConnell HM, Owicki JC, Parce JW, *et al.* The cytosensor microphysiometer: biological applications of silicon technology. *Science* 1992 ; 257 : 1906-12.
32. Lerner MR. Tools for investigating functional interactions between ligands and G-protein-coupled receptors. *Trends Neurosci* 1994 ; 17 : 142-6.
33. Schiffmann SN, Libert F, Vassart G, Dumont JE, Vanderhaegen JJ. A cloned G protein-coupled receptor with a distribution restricted to striatal medium-sized neurons. Possible relationship with D1 dopamine receptor. *Brain Res* 1990 ; 519 : 333-7.
34. Matsuda LA, Lolait SJ, Brownstein MJ, Bonner TI. Structure of a cannabinoid receptor and functional expression of the cloned cDNA. *Nature* 1990 ; 346 : 561-4.
35. Larhammer D, Blomqvist AG, Yee F, Jazin E, Yoo H, Wahlestedt C. Cloning and functional expression of a human neuropeptide Y/peptide YY receptor of the Y1 type. *J Biol Chem* 1992 ; 267 : 10935-8.
36. Castan I, Valet P, Lafontan M. Le récepteur du PYY : un élément important du système antilipolytique de l'adipocyte. *médecine/sciences* 1994 ; 10 : 196-201.
37. Zhou QY, Grandy DK, Thambi L, *et al.* Cloning and expression of human and rat D1 dopamine receptors. *Nature* 1990 ; 347 : 76-80.
38. Mollereau C, Parmentier M, Mailleux P, *et al.* ORL1, a novel member of the opioid receptor family: cloning, functional expression and localization. *FEBS Lett* 1994 ; 341 : 33-8.
39. Vanderhaeghen P, Schurmans S, Vassart G, Parmentier M. Olfactory receptors are displayed on dog mature sperm cells. *J Cell Biol* 1993 ; 123 : 1441-52.
40. Vanderhaegen P, Schurmans S, Parmentier M, Vassart G. Les spermatozoïdes ont-ils du nez ? *médecine/sciences* 1994 ; 10 : 1136-40.
41. McDonnell DP, Vegeto E, Gleason MAG. Nuclear hormone receptors as targets for new drug discovery. *Bio/Technology* 1993 ; 11 : 1256-61.
42. Baldwin JM. The probable arrangement of the helices in G protein-coupled receptors. *EMBO J* 1993 ; 12 : 1693-703.
43. Fields S, Song OK. A novel genetic system to detect protein-protein interactions. *Nature* 1989 ; 340 : 245-6.
44. Cwirla SE, Peters EA, Barrett RW, Dower WJ. Peptides on phage: a vast library of peptides for identifying ligands. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990 ; 87 : 6378-82.
45. Devlin JJ, Panganiban LC, Devlin PE. Random peptide libraries: a source of specific protein binding molecules. *Science* 1990 ; 249 : 404-6.
46. Devereux J, Haeberli P, Smithies O. A comprehensive set of sequence analysis programs for the VAX. *Nucleic Acids Res* 1984 ; 12 : 387-95.

Dans le même temps, les récepteurs orphelins vont probablement continuer à s'accumuler, comme conséquence de l'utilisation des procédures de criblage par homologie, mais aussi comme l'une des retombées des divers programmes de séquençage à grande échelle. L'impact potentiel de la découverte de nouveaux médiateurs dans les domaines de la physiologie et de la pharmacologie va certainement stimuler les recherches académique et industrielle quant à l'analyse de ces récepteurs orphelins. En dehors de l'information facilement accessible pour chacun de ces récepteurs, incluant la distribution tissulaire et la localisation génomique, la détermination de leurs caractéristiques fonctionnelles ne sera sans doute pas un processus aisé. Des procédures rapides et fiables pour mesurer l'activation d'un récepteur recombinant devront être développées, de façon à rechercher des activités biologiques dans des mélanges complexes (homogénats tissulaires), et à permettre la purification ultérieure des composés actifs. Des méthodes de criblage génétique, similaires dans leur conception à celles utilisées actuellement en routine pour le clonage de facteurs impliqués dans des mécanismes d'interaction protéine-protéine intracellulaire (*m/s n° 2, vol. 10, p. 206*) [43], pourraient également simplifier la procédure d'identification des ligands. Le criblage de banques de peptides aléatoires [44, 45] est, pour sa part, susceptible de mener à la caractérisation de ligands artificiels dotés d'activités agonistes ou antagonistes. La recombinaison homologue dans les cellules embryonnaires souches de souris devenant pratiquement une technique de routine, la destruction fonctionnelle des gènes codant pour les récepteurs orphelins pourrait permettre de définir globalement leur fonction dans la physiologie du développement et chez l'animal adulte, si toutefois la redondance fonctionnelle ne masque pas les effets du déficit génétique ■

TIRÉS À PART

M. Parmentier.

Summary

G protein-coupled orphan receptors

G protein-coupled receptors are encoded by one of the mammalian largest gene families. These receptors share a common transmembrane organization, respond to a large variety of structurally different ligands, and regulate intracellular enzymes and channels through heterotrimeric G proteins. The first genes encoding receptors of this family were isolated following the purification of the protein and sequencing of peptides generated by proteolytic cleavage. Subsequently, a number of G protein-coupled receptor genes were cloned through expression screening procedures based either on the binding of a specific ligand, or on the functional coupling of the recombinant receptor to a transduc-

tion cascade. Most members in this gene family were however obtained by homology cloning, using cross-hybridization or low-stringency polymerase chain reaction. The result is the availability of more than 140 receptor types and subtypes (olfactory receptors excluded). With a few exceptions, all pharmacologically well-defined receptors have now been cloned. Molecular cloning confirmed the existence of poorly characterized subtypes and uncovered other unsuspected subtypes. Genes encoding uncharacterized receptors have also been made available, either related to identified subfamilies, or defining new subfamilies by themselves. These so-called « orphan » receptors are waiting for the

identification of the corresponding ligands and of their biological function. The availability of cloned human receptors is expected to speed up the search for more specific drugs. Determination of the three dimensional structure of selected recombinant receptors, and computer modelling of receptor-ligand interaction and ligand-mediated receptor activation will probably allow in the long run the rational design of specific agonists and antagonists. The increasing number of reported orphan receptors will certainly be instrumental in the discovery of new regulatory pathways linking cells, with the potential of opening new avenues in pharmacology.