

Récepteurs, nociception, locomotion

Du nouveau du côté des récepteurs du système nerveux central. Un récepteur, proche de ceux des opiacés, reconnaît en fait un peptide endogène aux effets inverses de ceux des agonistes des opiacés, augmentant la perception nociceptive au lieu de la diminuer. Lorsque des expériences de recombinaison homologue chez la souris auront permis d'invalider les deux allèles du gène de ce récepteur, la fonction réelle de ce système nociceptif pourra être mieux comprise. Une telle invalidation du gène du récepteur D2 de la dopamine a permis de confirmer le rôle essentiel des systèmes dopaminergiques dans le contrôle de la locomotion et, généralement, des mouvements volontaires, altéré dans la maladie de Parkinson. Les récepteurs de la nociceptine et de la dopamine appartiennent à la famille des molécules à sept passages transmembranaires couplées aux protéines G, comme l'immense majorité des récepteurs des neurotransmetteurs et, en tout cas, des neuropeptides. Cependant, un récepteur canal, dit « ionotropique » par opposition aux récepteurs métabotropiques, vient d'être caractérisé chez l'escargot. Chose singulière, il reconnaît le FRMFamide dont les équivalents, chez les mammifères, se comportent comme les inhibiteurs de l'action analgésique des opiacés.

La nociceptine et son récepteur

Les récepteurs de substances bioactives, naturelles ou de synthèse (médicaments) appartiennent à des familles structurellement homogènes dont la plus nombreuse est celle des récepteurs couplés aux protéines de transduction G (RCPG). Les récepteurs de cette famille ont en commun de contenir sept domaines hydrophobes formant, potentiellement, autant d'hélices α transmembranaires. Des stratégies de clonage fondées sur l'amplification sélective d'ADN génomique à partir d'amorces « dégénérées » conçues pour interagir avec toute séquence codant les domaines les mieux conservés (transmembranaires) entre RCPG ont conduit à isoler les gènes de membres jusqu'alors inconnus de cette famille de récepteurs [1-3]. D'où l'émergence d'une nouvelle pharmacologie, dite « inverse » qui, de la connaissance des gènes « orphelines », pourrait conduire à l'identification des effecteurs naturels de ces cibles et, partant, à la conception de nouveaux médicaments [4, 5]. La découverte de la nociceptine est à cet égard exemplaire (*m/s n°1, vol. 12, p. 116*).

Le récepteur orphelin ORL

C'est précisément en cherchant à cloner – sur la base de leur probable analogie de séquence avec celle du récepteur des opiacés de type δ [6, 7], – l'un des deux autres types μ ou κ , voire de nouveaux sous-types de récepteur des opiacés, que plusieurs laboratoires [8-14] ont isolé une séquence génique jusqu'alors inconnue, codant pour une protéine dont la structure primaire ressemble fort à celles des récepteurs des opiacés (*figure 1*). D'où le nom d'ORL (*opioid receptor like*) que nous avons

donné à ce récepteur orphelin [8]. En termes d'analogie de séquence, ORL est à peu près équidistant (65 %) des trois types, μ , δ et κ de récepteurs des opiacés. Il présente néanmoins une particularité qu'on ne retrouve que dans le récepteur κ , à savoir que près du tiers des acides aminés qui composent sa seconde boucle extracellulaire sont de type acide (*figure 1*). C'est cette boucle acide qui confère au récepteur κ une affinité très élevée pour son agoniste naturel, la dynorphine A, un heptadécapeptide basique [15, 16]. Nous y reviendrons.

Produit de manière transitoire dans des cellules COS ou stable dans des cellules CHO, le récepteur ORL ne montre d'affinité élevée, intrinsèque ou apparente, ni pour les substances opiacées ni pour les antagonistes des opiacés. ORL n'est pas un récepteur des opiacés. Néanmoins, le récepteur ORL est activé par l'étorphine, un puissant opiacé, et cette activation se traduit, dans une lignée de cellules CHO exprimant le récepteur orphelin, par une inhibition de l'enzyme adénylyl cyclase [8]. Même si les doses d'étorphine requises pour stimuler ORL sont mille fois plus élevées que celles requises pour stimuler un récepteur des opiacés [17], qu'il soit de type μ , δ ou κ , cette action spécifique de l'opiacé sur ORL démontre le couplage fonctionnel entre récepteur et adénylyl cyclase. C'est sur la base de ce couplage dans la lignée CHO recombinante que nous avons pu « suivre » le ligand endogène du récepteur orphelin au cours des diverses étapes de sa purification.

Les ARNm du récepteur ORL sont particulièrement abondants dans le système nerveux central (régions limbiques, hypothalamus, tronc

cérébral et moelle épinière) et, en y regardant de plus près, dans de nombreuses zones dont on sait qu'elles sont impliquées dans la sensation de douleur. De fait, malgré l'absence d'outils pharmacologiques classiques (agonistes et antagonistes d'ORL), nous avons pu étayer la notion qu'ORL interviendrait dans la nociception en bloquant *in vivo* la synthèse du récepteur orphelin. Ainsi, l'administration intracérébro-ventriculaire (i.c.v.) répétée d'un oligonucléotide anti-ARNm d'ORL (antisens) induit-elle, chez la souris, un allongement notable du temps de réaction des animaux à une stimulation nociceptive thermique cutanée (épreuve de la plaque chaude), en d'autres termes, une analgésie.

ORL a vraisemblablement d'autres fonctions physiologiques car son gène est exprimé non seulement dans le SNC en dehors des régions dédiées à la nociception mais aussi à la périphérie, notamment dans l'intestin, le canal déférent, la rate [12] et dans les lymphocytes [18, 19]. En outre, le gène du récepteur ORL contient, dans sa partie codante, deux introns : l'un est situé dans la séquence correspondant à l'extrémité N-terminale de la première boucle cytoplasmique, l'autre dans celle codant pour le troisième résidu glutamyl de la seconde boucle extracellulaire [8, 20]. Des formes d'ORL résultant d'un épissage alternatif de son gène ont effectivement été détectées, en particulier une forme « longue » avec une insertion de 28 acides aminés dans la boucle EL2 [12].

Le ligand endogène du récepteur ORL

Le récepteur ORL étant structurellement apparenté aux récepteurs des opiacés, eux-mêmes des récepteurs de peptides, les endomorphines, il était légitime de penser que le ligand endogène d'ORL fût lui aussi un peptide. En outre, le fait qu'ORL possède un domaine acide analogue à celui qui, dans le récepteur des opiacés de type κ fixe la dynorphine A, suggérait que le ligand endogène du récepteur orphelin fût aussi un

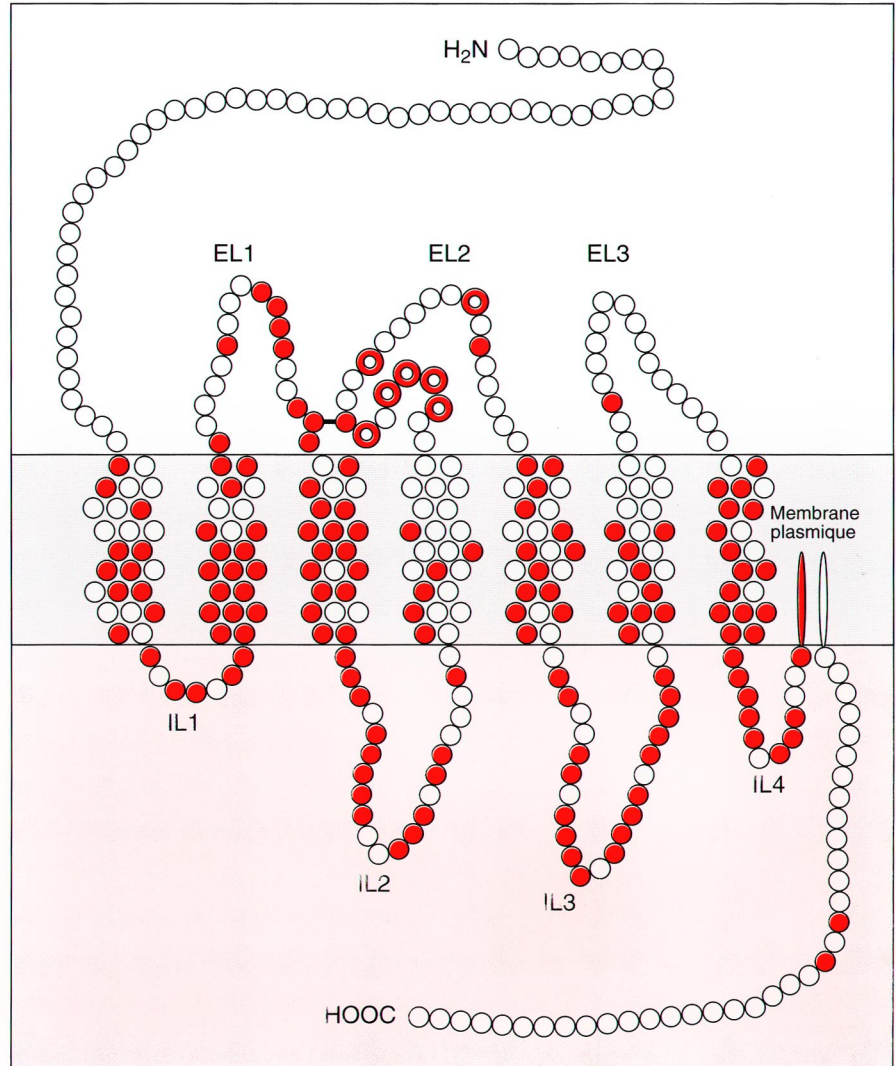


Figure 1. **Structure bidimensionnelle supposée du récepteur ORL.** EL : boucle extracellulaire, IL : boucle cytoplasmique. Les disques rouges représentent les acides aminés communs au récepteur ORL et aux récepteurs des opiacés de type μ , δ et κ . On notera que les identités sont particulièrement abondantes non seulement dans les domaines transmembranaires II, III, V et VII (numérotés de la gauche vers la droite) mais aussi, et surtout, dans les boucles cytoplasmiques. Les cercles rouges épais représentent les résidus acides (Asp ou Glu) de la seconde boucle extracellulaire.

peptide au caractère basique marqué. C'est à partir de ces hypothèses que nous avons isolé, d'un extrait d'une vingtaine (environ 35 g) de cerveaux de Rat, une substance ayant la propriété d'inhiber l'adénylyl cyclase dans la lignée CHO qui exprime le récepteur ORL [21]. Comme escompté, la substance en question est un peptide dont la séquence de 17 acides aminés révèle quelques analogies avec celle de la

dynorphine A (figure 2). En particulier, le peptide contient deux résidus arginyl (R) et deux résidus lysyl (K), tous concentrés dans sa portion médiane qui, de ce fait, correspondrait au domaine « adresse » -, lui aussi fortement basique, de la dynorphine A [22].

L'heptadécapeptide de synthèse est un puissant agoniste du récepteur ORL car, dans la lignée CHO exprimant ORL, il inhibe l'adénylyl cyclase

se à des concentrations voisines de 10^{-9} mol/l. Il est inactif dans la lignée cellulaire « sauvage » et très peu actif dans des lignées CHO recombinantes exprimant l'un quelconque des trois types de récepteur des opiacés.

In vivo, le peptide de synthèse exerce une action contraire à celle de l'administration chronique de l'oligonucléotide anti-ARN messager d'ORL. En effet, injecté par voie i.c.v. chez la souris, il diminue de manière très significative le temps de réaction (redressement, saut) des animaux à un *stimulus* nociceptif (épreuve de la plaque chaude). C'est au vu de cette action hyperalgésiante que nous avons baptisé « nociceptine » le nouveau peptide.

Trois semaines environ après nous, une équipe suisse a publié l'isolement et la structure, sous la dénomination d'« orphanine FQ », de la nociceptine [23]. Les auteurs montrent que l'orphanine FQ, administrée par voie i.c.v. chez la Souris, diminue considérablement le délai de retrait de la queue dans le test nociceptif du même nom. En revanche, ils n'observent pas d'effet hyperalgésique de l'orphanine FQ dans l'épreuve de la plaque chaude. Ce désaccord entre les deux laboratoires pourrait s'expliquer par les différences de doses utilisées car, à forte dose, le peptide pourrait stimuler les récepteurs des opiacés, induisant ainsi des effets analgésiques ou incapacitants

moteurs qui annihileraient ses effets hyperalgésiques.

La nociceptine est bien endogène au cerveau car nous avons isolé d'une banque de cerveau de Rat, et identifié, l'ADNc qui code pour son précurseur, la pronociceptine [21]. De fait, la pronociceptine contient la séquence de 17 acides aminés de la nociceptine, encadrée par les signaux canoniques Lys-Arg d'excision protéolytique. Elle contient aussi d'autres séquences potentiellement « excisibles » qui pourraient représenter des peptides neuroactifs jusqu'alors inconnus et dont les fonctions méritent certainement d'être explorées. Les études de biologie moléculaire ont aussi révélé que la séquence de la nociceptine est identique chez la Souris, le Rat et l'Homme.

Bilan et perspectives

Ces résultats démontrent la valeur heuristique de la démarche pharmacologique dite « inverse » qui, d'ADN de récepteur orphelin à ligand endogène, a conduit à identifier un système peptidergique jusqu'alors totalement inconnu du système nerveux central. La découverte de ce nouveau couple effecteur-cible pourrait trouver des applications en neurophysiopathologie, de la douleur notamment, car des antagonistes de la nociceptine devraient avoir des propriétés analgésiques. C'est du moins ce que l'on est en droit d'attendre au

vu de l'action hypoalgésiante de l'oligonucléotide antisens [21] et hyperalgésiante de la nociceptine [21, 23] et cela même si, comme l'écrit fort à propos l'éditeur de la revue *Nature* [24], il reste à prouver que la nociceptine agit bien sur les neurones dont l'activité est responsable de la sensation douloureuse. Il est probable que de tels antagonistes, non peptidiques de préférence, existent déjà dans les chimiothèques de l'industrie pharmaceutique.

En tout état de cause, les fonctions du couple ORL-nociceptine restent à établir, en particulier son implication dans la régulation de la nociception. Cela devrait pouvoir être prouvé à l'aide de lignées de souris transgéniques qui ne produisent pas ou, au contraire, qui produisent trop le récepteur ORL ou bien encore par la mise en évidence de modifications du gène codant pour le récepteur ORL dans certaines maladies génétiques comme par exemple, l'insensibilité congénitale à la douleur ■

Remerciements

Les recherches sur la nociceptine et son récepteur à l'IPBS bénéficient du soutien financier de l'Association pour la Recherche sur le Cancer (ARC, Appel d'Offres 1994 « La Douleur »).

Jean-Claude Meunier Catherine Mollereau

Unité de neuropharmacologie moléculaire, Institut de pharmacologie et de biologie structurale, Cnrs Upr 8221, 205, route de Narbonne, 31077 Toulouse Cedex, France.

Jean Costentin

Unité de neuropsychopharmacologie expérimentale, Cnrs Ura 1969, Faculté de médecine et de pharmacie, avenue de l'Université, BP 97, 76803 Saint-Étienne-du-Rouvray, France.

Marc Parmentier Gilbert Vassart

IRIBHN, Université libre de Bruxelles, campus hospital Érasme, 808, route de Lennik, 1070 Bruxelles, Belgique.

β-endorphine	YGGFMTSEK S QTPLVTLFKNAIIK N VHKK G Q
Met-enképhaline	YGGFM
Leu-enképhaline	YGGFL
α-néoendorphine	YGGFLRKYPK
dynorphine	YGGFLRRIRPKL K WD N Q
nociceptine	F GG F TG A R K S A R K L A N Q

Figure 2. **Comparaison des séquences de la nociceptine et de quelques endorphines.** Les acides aminés en rouge sont communs à la nociceptine et, respectivement, aux cinq endorphines dont la β-endorphine et la dynorphine. Sur la base des relations structure-activité connues de la dynorphine [20] la nociceptine pourrait être divisée en un domaine « message », FGGF lui conférant son activité biologique, et un domaine « adresse » basique, GARKSARK, lui conférant sa forte affinité pour le récepteur ORL, via notamment l'interaction avec la boucle acide (EL2) de ce dernier.

RÉFÉRENCES

- Libert F, Parmentier M, Lefort A, Dinsart C, Van Sande J, Maehnaute C, Simons MJ, Dumont JE, Vassart G. Selective amplification and cloning of four new members of the G protein-coupled receptor family. *Science* 1989; 244: 569-72.
- Parmentier M, Libert F, Vassart G. La famille des récepteurs couplés aux protéines G et leurs orphelins. *médecine/sciences* 1995; 11: 222-31.
- Bockaert J. Les récepteurs à sept domaines transmembranaires: physiologie et pathologie de la transduction. *médecine/sciences* 1995; 11: 382-94.
- Schwartz JC. La biologie moléculaire des récepteurs et l'essor d'une nouvelle pharmacologie. *médecine/sciences* 1993; 9: 9-11.
- Mills A, Duggan MJ. Orphan seven transmembrane domain receptors: reversing pharmacology. *Trends Pharmacol Sci* 1993; 14: 394-6.
- Kieffer B, Befort K, Gaveriaux-Ruff C, Hirth C. The δ -opioid receptor: isolation of a cDNA by expression cloning and pharmacological characterization. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; 89: 12048-52.
- Evans CJ, Keith Jr DE, Morrison H, Magendzo K, Edwards RH. Cloning of a delta opioid receptor by functional expression. *Science* 1992; 258: 1952-5.
- Mollereau C, Parmentier M, Mailleux P, Butour JL, Moisand C, Chalon P, Caput D, Vassart G, Meunier JC. ORL1, a novel member of the opioid receptor family: cloning, functional expression and localization. *FEBS Lett* 1994; 341: 3338.
- Fukuda K, Kato S, Mori K, Nishi M, Takeshima H, Iwabe N, Miyata T, Houtani T, Sugimoto T. cDNA cloning and regional distribution of a novel member of the opioid receptor family. *FEBS Lett* 1994; 343: 42-46.
- Chen Y, Fan Y, Liu J, Mestek A, Tian M, Kozak CA, Yu L. Molecular cloning, tissue distribution and chromosomal localization of a novel member of the opioid receptor gene family. *FEBS Lett* 1994; 347: 279-83.
- Bunzow JR, Saez C, Mortrud M, Bouvier C, Williams JT, Low M, Grandy DK. Molecular cloning and tissue distribution of a putative member of the rat opioid receptor gene family that is not a μ , δ or κ opioid receptor type. *FEBS Lett* 1994; 347: 284-8.
- Wang JB, Johnson PS, Imai Y, Persico AM, Ozenberger BA, Eppler CM, Uhl GR. cDNA cloning of an orphan opiate receptor gene family member and its splice variant. *FEBS Lett* 1994; 348: 75-9.
- Wick MJ, Minnerath SR, Lin X, Elde R, Law PY, Loh HH. Isolation of a novel cDNA encoding a putative membrane receptor with high homology to the cloned μ , δ and κ opioid receptors. *Mol Brain Res* 1994; 27: 37-44.
- Lachowicz JE, Shen Y, Monsma Jr FJ, Sibley DR. Molecular cloning of a novel G protein-coupled receptor related to the opiate receptor family. *J Neurochem* 1995; 64: 34-40.
- Wang JB, Johnson PS, Wang WF, Uhl GR. Human κ opiate receptor second extracellular loop elevates dynorphin's affinity for human μ/κ chimeras. *J Biol Chem* 1994; 269: 25966-9.
- Xue JC, Chen C, Zhu J, Kunapuli S, De Riel JK, Yu L, Tiu-Chen LY. Differential binding domains of peptide and non-peptide ligands in the cloned rat κ opioid receptor. *J Biol Chem* 1994; 269: 30195-9.
- Noel F, Iourgenko V, Pouille Y, Hanoune J. Les mécanismes d'action moléculaire des opiacés. *médecine/sciences* 1994; 10: 1116-26.
- Halford WP, Gebhardt BM, Carr DJJ. Functional role and sequence analysis of a lymphocyte orphan opioid receptor. *J Neuroimmunol* 1995; 59: 91-101.
- Wick MJ, Minnerath SR, Roy S, Ramakrishnan S, Loh HH. Expression of alternative forms of brain opioid « orphan » receptor mRNA in activated peripheral blood lymphocytes and lymphocytic cell lines. *Mol Brain Res* 1995; 32: 342-7.
- Nishi M, Takeshima H, Mori M, Nakagawara KI, Takeuchi T. Structure and chromosomal mapping for the mouse κ -opioid receptor and an opioid receptor homologue (MOR-C). *Biochem Biophys Res Commun* 1994; 205: 1353-7.
- Meunier JC, Mollereau C, Toll L, Suaudeau C, Moisand C, Alvinerie P, Butour JL, Guillemot JC, Ferrara P, Monsarrat B, Mazarguil H, Vassart G, Parmentier M, Costentin J. Isolation and structure of the endogenous agonist of opioid receptor-like ORL1 receptor. *Nature* 1995; 377: 532-5.
- Chavkin C, Goldstein A. Specific receptor for the opioid peptide dynorphin: structure-activity relationships. *Proc Natl Acad Sci USA* 1981; 78: 6543-7.
- Reinscheid RK, Nothacker HP, Bourson A, Ardati A, Henningsen RA, Bunzow JR, Grandy DK, Langen H, Monsma Jr FJ, Civelli O. Orphanin FQ: a neuropeptide that activates an opioid like G protein-coupled receptor. *Science* 1995; 270: 792-4.
- Julius D. Home for an orphan endorphin. *Nature* 1995; 377: 476.

TIRÉS À PART

J.C. Meunier.