

Les récepteurs P_2 : une famille en pleine expansion

L'ATP (adénosine 5'-triphosphate) est un composant intracellulaire riche en énergie libre qui joue un rôle fondamental dans le métabolisme énergétique des cellules, ainsi que dans la régulation cellulaire (substrat des protéines kinases, activateur allostérique de certains canaux potassium...). Bien que l'activité biologique de l'ATP extracellulaire ait été décrite dès 1929, il a fallu attendre les années 1980 pour que soit accepté le concept que l'ATP et d'autres nucléotides exercent une fonction complètement différente de leur rôle intracellulaire: celle de médiateur intercellulaire. Les multiples actions des nucléotides extracellulaires sont relayées par des récepteurs spécifiques, appelés récepteurs purinergiques P_2 . Les premiers clones d'ADNc et de gènes codant pour les récepteurs P_2 ont été publiés en 1993. Le développement de cette approche moléculaire nous révèle que la famille P_2 est beaucoup plus riche que ce qu'on imaginait et comprend des récepteurs aux propriétés inattendues.

Classification pharmacologique des récepteurs P_2

L'ATP est présent dans le cytoplasme à une concentration de 3 à 5 mM. De plus, dans certaines cellules (plaquettes, neurones), il est concentré dans des vésicules sécrétoires. L'ATP peut être libéré dans l'espace extracellulaire à la suite de la lyse cellulaire, la perméabilisation sélective de la membrane ou l'exocytose de grains sécrétoires (pour revue voir [1]). Des données récentes montrent que l'ATP peut être transporté hors de la cellule par la glycoprotéine P, dont

le rôle dans la résistance aux agents de chimiothérapie anticancéreuse est par ailleurs bien connu [2], et peut être par la protéine CFTR, dont le dysfonctionnement est responsable de la mucoviscidose (*m/s* n° 11, vol. 11, p. 1612) [3, 4]. En général, la durée de vie des nucléotides extracellulaires est courte: en effet, des ectonucléotidases, exposées à la surface des cellules, notamment les cellules endothéliales des vaisseaux, catalysent l'hydrolyse séquentielle de l'ATP en ADP, puis en AMP et finalement en adénosine [5]. Dès 1929, Drury et Szent-Györgyi avaient observé que l'injection intraveineuse d'ATP diminuait la fréquence cardiaque [6]. Depuis lors, la liste des actions des nucléotides extracellulaires n'a cessé de s'allonger, tous les systèmes de l'organisme étant concernés (pour revue voir [1]). En 1978, Burnstock introduisit le concept selon lequel les actions des nucléotides extracellulaires sont relayées par des récepteurs spécifiques, qu'il baptisa « purinergiques P_2 », par opposition au terme « purinergiques P_1 » réservé aux récepteurs de l'adénosine [7]. Plusieurs sous-types de récepteurs P_2 ont été individualisés ultérieurement, sur la base de la nature des effets observés et des mécanismes de transduction sous-jacents, d'une part, de la puissance relative des nucléotides naturels et de différents analogues de synthèse, d'autre part (Tableau 1). Les récepteurs P_{2T} représentent un cas particulier, puisque leur agoniste naturel est l'ADP, l'ATP se comportant comme un antagoniste compétitif. Ces récepteurs P_{2T} sont le seul sous-type pour lequel des antagonistes sélectifs sont disponibles: il s'agit d'analogues de

l'ATP qui exercent une action anti-thrombotique *in vivo* chez l'animal, montrant ainsi l'importance de l'ADP et des récepteurs P_{2T} dans la pathogénie des thromboses artérielles [8]. Malgré leurs différences, les récepteurs rassemblés dans le Tableau 1 présentent une propriété commune: la forme d'ATP qu'ils lient n'est pas le complexe ATP-magnésium ($MgATP^{2-}$), forme prédominante dans les liquides physiologiques et substrat des ATPases et kinases, mais bien la forme tétra-anionique (ATP^{4-}), qui ne représente qu'environ 2 % de l'ATP total [9].

Classification moléculaire des récepteurs P_2

C'est en 1993 que la biologie moléculaire a fait irruption dans le domaine des récepteurs P_2 . L'ADNc d'un récepteur P_{2Y} a été cloné à partir d'ADNc de cerveau de poulet sur la base d'une homologie fortuite avec le récepteur orphelin RDC1 [10, 11]. Parallèlement, une stratégie de clonage par expression a conduit au clonage de l'ADNc du récepteur P_{2U} à partir d'ADNc d'une lignée hybride de neuroblastome-gliome de souris [12]. Dans la foulée, les ADNc des récepteurs P_{2Y} de dinde [13], de souris [14], de rat [14] et de bœuf [15], ainsi que ceux des récepteurs P_{2U} humain [16] et de rat [17] ont également été clonés. Ces récepteurs appartiennent tous à la superfamille des récepteurs heptahélicoïdaux couplés aux protéines G et activent la phospholipase C. La comparaison des séquences des récepteurs P_{2Y} et P_{2U} révèle 39 % d'identité en acides aminés: ce pourcentage tombe en dessous de 30%

lorsque ces séquences sont comparées à celles de tous les autres récepteurs heptahélicoïdaux. Les récepteurs P_{2Y} et P_{2U} constituent donc une sous-famille particulière au sein de cette superfamille. Contrairement à ce qu'on aurait pu imaginer, les récepteurs P_{2Y} et P_{2U} ne présentent qu'une homologie réduite avec les récepteurs de l'adénosine, ou avec le récepteur de l'AMP cyclique de *Dicotyostelium discoideum*.

En 1994, deux sous-types distincts de récepteur P_{2X} ont été clonés simultanément, l'un à partir de cellules PC12 de phéochromocytome de rat [18], l'autre à partir de canal déférent de rat [19]. L'ADNc d'un troisième sous-type de récepteur P_{2X}, exprimé dans les fibres afférentes

nociceptives de type C, a été cloné tout récemment [20, 21]. La comparaison des trois séquences révèle une identité en acides aminés de l'ordre de 40%. Exprimés séparément dans des ovocytes de xénope, les trois récepteurs se comportent comme des canaux cationiques non sélectifs activés par l'ATP. La synthèse simultanée de deux sous-types distincts engendre un canal aux propriétés particulières, suggérant la formation d'hétéropolymères. L'architecture de ces récepteurs est tout à fait caractéristique: deux zones hydrophobes transmembranaires séparées par un domaine extracellulaire riche en cystéines. Curieusement, cette architecture est très différente de celle d'autres récepteurs possédant une activité

intrinsèque de canal ionique, comme les récepteurs nicotiques de l'acétylcholine; en revanche, elle est apparentée à la structure de certains canaux potassium et sodium, comme par exemple le canal sodium épithélial sensible à l'amiloride (*m/s n° 3, vol. 10, p. 365*) [18, 19] (figure 1).

A la suite du clonage des ADNc des récepteurs P_{2U}, P_{2X} et P_{2Y}, une réorganisation complète de la classification des récepteurs P₂ a été proposée et s'est rapidement imposée [22]. Dans cette nouvelle nomenclature, les récepteurs possédant une activité intrinsèque de canal cationique sont baptisés P_{2X}, tandis que les récepteurs heptahélicoïdaux couplés aux protéines G sont appelés P_{2Y}: les récepteurs P_{2Y} et P_{2U} sont, dès lors,

Tableau I				
CLASSIFICATION PHARMACOLOGIQUE DES RÉCEPTEURS P ₂				
Type	Agonistes préférentiels	Mécanisme effecteur	Localisation	Réponse typique
P _{2T}	2-MeSADP > ADP (ATP = antagoniste)	canal Ca ²⁺ ↓ adénylyl cyclase ↑ PLC (?)	plaquettes	agrégation plaquettaire ¹
P _{2U}	UTP = ATP > ADP	↑ PLC	endothélium vasculaire, épithélium respiratoire...	libération de prostacycline et NO, sécrétion de Cl ⁻²
P _{2X}	APCPP > ATP > 2MeSATP	canal cationique (Ca ²⁺ , Na ⁺)	muscle lisse	contraction du muscle lisse
P _{2Y}	2-MeSATP > ADP = ATP	↑ PLC	endothélium vasculaire, foie ...	libération de prostacycline et NO
P _{2Z}	BzATP > ATP > ADP	pore non sélectif (< 900 Da)	macrophages, lymphocytes	mort cellulaire

¹ Cette action est à la base du développement d'antagonistes, qui exercent une action antithrombotique in vivo chez l'animal et font actuellement l'objet d'essais cliniques [8].

² Des essais préliminaires suggèrent que l'UTP en aérosol pourrait jouer un rôle dans le traitement symptomatique de la mucoviscidose [28].
2-MeSADP: 2-méthylthio-ADP; 2-MeSATP: 2-méthylthio-ATP; APCPP: α,β-méthylène-ATP; Bz-ATP: 3'-O-(benzoyl)-benzoyl-ATP.

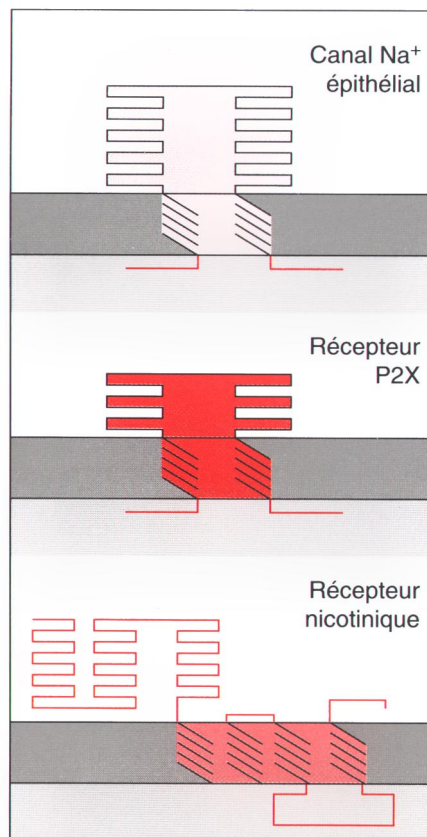


Figure 1. Représentation schématique comparative de la topographie de trois canaux cationiques: canal sodium épithélial sensible à l'amiloride, récepteur P_{2X} et récepteur nicotinique.

Tableau II					
CLASSIFICATION MOLÉCULAIRE DES RÉCEPTEURS P ₂					
P2Y : Couplage aux protéines G					
dénomination dans la classification moléculaire	équivalent dans la classification pharmacologique	source du clonage	localisation	mécanisme effecteur	agonistes préférentiels
P2Y ₁	P _{2Y}	ADNc de cerveau de poulet	cerveau, muscle squelettique, tube digestif	↑ PLC ↑ [Ca ²⁺] _i	2-MeSATP > ADP > UDP
P2Y ₂	P _{2U}	ADNc de neuroblastome-gliome de souris	muscle squelettique, épithélium des voies aériennes, placenta	↑ PLC ↑ [Ca ²⁺] _i	ATP = UTP > ADP = UDP
P2Y ₃	–	ADNc de cerveau de poulet	cerveau	↑ PLC ↑ [Ca ²⁺] _i	ADP > ATP
P2Y ₄	–	ADN génomique humain	placenta	↑ PLC ↑ [Ca ²⁺] _i	UTP = UDP > ATP > ADP
P2X : Activité intrinsèque de canal ionique					
dénomination dans la classification moléculaire	équivalent dans la classification pharmacologique	source du clonage	localisation	mécanisme effecteur	agonistes préférentiels
P2X ₁	P _{2X}	ADNc de canal déférent de rat	canal déférent et vessie	canal Ca ²⁺ et Na ⁺	ATP = 2-MeSATP > APCPP > ADP
P2X ₂	P _{2X}	ADNc du phéochromocytome PC12 de rat	hypophyse, canal déférent, moelle épinière	canal Na ⁺ et K ⁺	ATP = 2-MeSATP > APCPP
P2X ₃	P _{2X}	ADNc de ganglions de la racine dorsale de rat	fibres afférentes nociceptives ¹	canal Ca ²⁺ et Na ⁺	ATP = 2-MeSATP > ATPγS > ADP

¹ Cette localisation suggère que l'ATP joue un rôle dans la genèse de certaines formes de douleur. PLC : phospholipase C ; 2-MeSATP : 2-méthylthio-ATP ; APCPP : α,β-méthylène-ATP.

rebaptisés respectivement P2Y₁ et P2Y₂ (Tableau II). La place des récepteurs P_{2T} et P_{2Z} dans cette nouvelle classification pourra être définie après le clonage de leur ADNc : ce travail est en cours dans plusieurs laboratoires, mais n'a pas encore abouti.

Différentes stratégies de clonage par homologie ont permis le clonage des ADNc d'autres sous-types de récepteur P2Y, qui n'ont pas leur équivalent dans la classification pharmacologique. C'est le cas du récepteur P2Y₃, dont l'ADNc a également été

cloné à partir de cerveau de poulet et qui n'a été décrit que de manière très partielle jusqu'à présent [23], et du récepteur P2Y₄, dont le gène a été cloné à partir d'ADN génomique humain et est exprimé principalement dans le placenta humain [24].

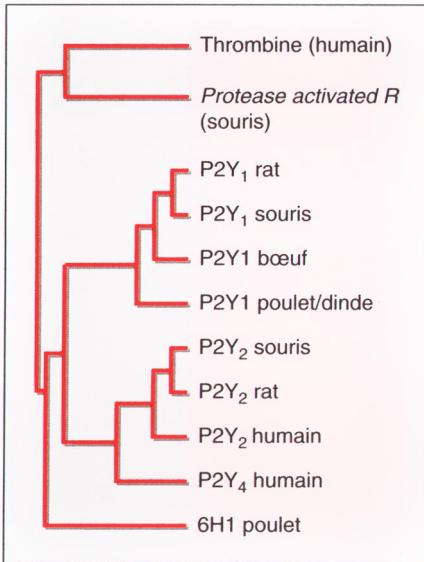
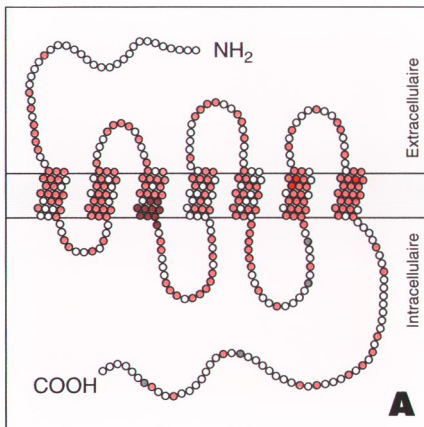


Figure 2. **Dendrogramme représentant les parentés de structure entre récepteurs P2Y et leurs voisins les plus proches au sein de la superfamille des récepteurs couplés aux protéines G.**



Ce récepteur est analysé en détail ci-après. Il faut ajouter que les ADNc de plusieurs autres sous-types de récepteurs P2Y et P2X ont été clonés dans notre laboratoire et dans d'autres, et sont à différents stades de caractérisation. Enfin, il ressort d'une comparaison de séquences que le récepteur orphelin 6H1, dont l'ADNc a été cloné à partir de lymphocytes T activés, pourrait lui aussi appartenir à la famille P2Y, bien qu'une réponse fonctionnelle aux nucléotides n'ait pas encore été mise en évidence jusqu'à présent [25]. La figure 2 illustre les parentés structurales au sein de la famille des récepteurs P2Y. Elle montre aussi que curieusement le récepteur heptahélicoïdal le plus proche de la famille P2Y est le récepteur de la thrombine. L'examen de la séquence des récepteurs P2X a révélé la présence dans la boucle extracellulaire de motifs apparentés à G(X_i)GK (G = Gly, X = n'importe quel acide aminé, K = Lys), séquence consensus retrouvée dans de nombreuses protéines qui lient l'ATP [18, 19]. En revanche, ce motif ne se retrouve pas dans la séquence des récepteurs P2Y [10, 12]. Des expériences de mutagenèse

rales au sein de la famille des récepteurs P2Y. Elle montre aussi que curieusement le récepteur heptahélicoïdal le plus proche de la famille P2Y est le récepteur de la thrombine. L'examen de la séquence des récepteurs P2X a révélé la présence dans la boucle extracellulaire de motifs apparentés à G(X_i)GK (G = Gly, X = n'importe quel acide aminé, K = Lys), séquence consensus retrouvée dans de nombreuses protéines qui lient l'ATP [18, 19]. En revanche, ce motif ne se retrouve pas dans la séquence des récepteurs P2Y [10, 12]. Des expériences de mutagenèse

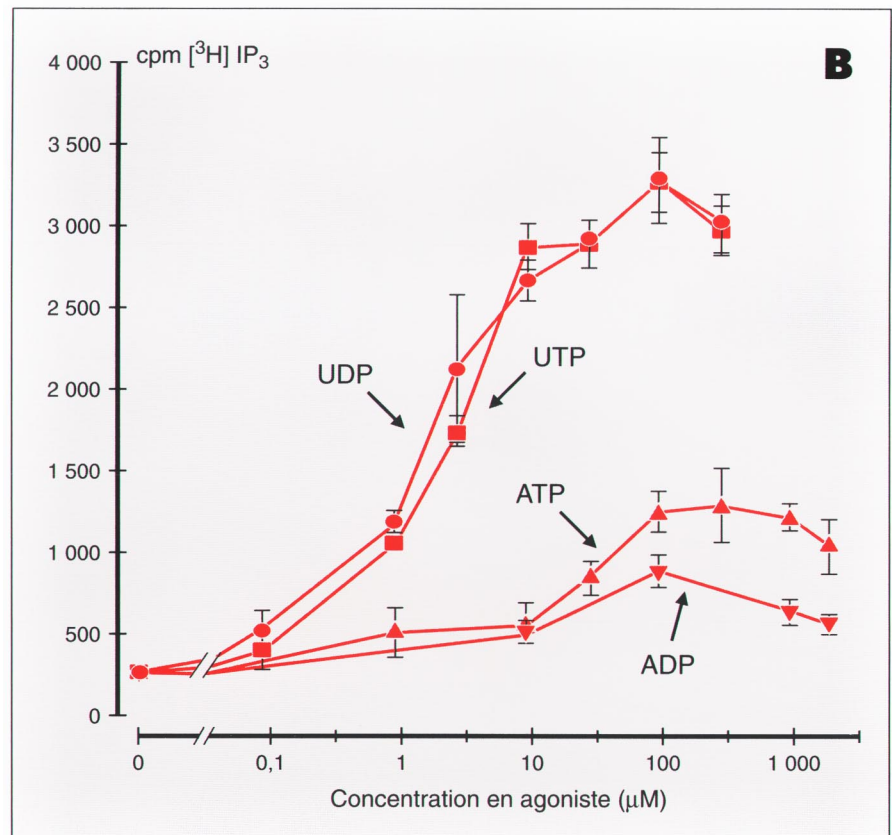


Figure 3. **Le récepteur P2Y₄. A. Représentation graphique du récepteur P2Y₄.** Les cercles roses représentent une séquence consensus commune à tous les récepteurs P2Y clonés à ce jour. Les cercles bistres représentent les acides aminés conservés entre le récepteur P2Y₄ et le récepteur P2Y₂. Les cercles rouges représentent les trois acides aminés chargés positivement, dont la mutagenèse dirigée a montré qu'ils jouaient un rôle critique dans la liaison de l'ATP et de l'UTP au récepteur P2Y₂ et qui sont parfaitement conservés dans le récepteur P2Y₄. Les cercles gris représentent des sites de phosphorylation potentiels par la kinase C et les kinases calmoduline-dépendantes. A noter l'absence de sites potentiels de N-glycosylation dans la partie exofaciale, une caractéristique peu fréquente parmi les récepteurs couplés aux protéines G. **B. Expression fonctionnelle du récepteur P2Y₄ dans les cellules 1321N1.** Cette lignée cellulaire provient d'un astrocytome humain. A la différence de la plupart des lignées cellulaires, elle a l'avantage d'être dépourvue de récepteurs P₂ endogènes. La figure montre l'accumulation d'inositol triphosphate (IP₃) en réponse aux nucléotides.

dirigée ont mis en évidence le rôle de résidus chargés positivement, présents à l'extrémité extracellulaire des domaines transmembranaires 6 et 7, dans la liaison de l'ATP et de l'UTP au récepteur P2Y₂ [26]. La mutation de His²⁶², Arg²⁶⁵ ou Arg²⁹² réduit dramatiquement l'affinité de l'ATP, suggérant que ces acides aminés interviennent dans la neutralisation des charges négatives de l'ATP⁺ qui, rappelez-le, est la forme d'ATP qui se lie aux récepteurs.

Existence de récepteurs pyrimidinergiques

A la fin des années 1980, il est apparu que l'UTP extracellulaire exerce des effets sur de nombreux tissus et cellules, d'une manière similaire à l'ATP. A l'époque, il a été proposé que les effets de l'UTP seraient relayés par des récepteurs pyrimidinergiques spécifiques, distincts des récepteurs purinergiques P₂ [27]. L'existence de récepteurs nucléotidiques ou P_{2U}, communs à l'ATP et l'UTP, constituait évidemment une explication alternative en faveur de laquelle des arguments expérimentaux se sont progressivement accumulés, en particulier l'absence d'additivité et la désensibilisation croisée des réponses à l'ATP et l'UTP. La démonstration finale de ce concept est venue avec le clonage de l'ADNc et l'expression fonctionnelle du récepteur P2Y₂, qui est activé de manière équivalente par l'ATP et l'UTP. Cependant, le clonage du gène codant pour le récepteur P2Y₄ relance la question. Ce récepteur, dont le gène a été cloné à partir d'ADN génomique humain [24], est plus proche du récepteur P2Y₂ (51 % d'identité en acides aminés) que du P2Y₁ (35 % d'identité en acides aminés) (figure 2): en particulier les trois acides aminés chargés positivement qui jouent un rôle dans la liaison des nucléotides au récepteur P2Y₂ sont parfaitement conservés dans le récepteur P2Y₄ (figure 3A). Dans des cellules transfectées synthétisant ce récepteur de manière stable, la formation d'inositol phosphates est stimulée par l'UTP et l'UDP (figure 3B); en revanche, l'ATP se comporte comme un agoniste partiel de

faible affinité et l'effet de l'ADP est à peine détectable. On peut donc conclure que le récepteur P2Y₄ se comporte fonctionnellement comme un récepteur pyrimidinergique bien que, structurellement, il appartienne à la famille des récepteurs purinergiques P2Y. Cette famille comporte donc des récepteurs purinergiques sélectifs (P2Y₁), des récepteurs communs aux nucléotides adényliques et uridyliques (P2Y₂) et des récepteurs pyrimidinergiques (P2Y₄). Bien que la présence d'UTP ou d'UDP dans l'espace extracellulaire soit très peu documentée, la simple existence des récepteurs P2Y₄ suggère que les nucléotides uridyliques jouent un rôle de médiateurs intercellulaires, indépendamment des nucléotides adényliques.

En conclusion, la biologie moléculaire a permis non seulement de cloner des récepteurs dont l'existence avait été établie sur la base de critères pharmacologiques, mais aussi d'en découvrir de nouveaux dont la signification physiologique reste à déterminer. Au rythme où évoluent les clonages dans différents laboratoires, on peut s'attendre à un foisonnement de récepteurs P₂ dans les prochaines années ■

Didier Communi Marc Parmentier

Institut de Recherche Interdisciplinaire, Faculté de Médecine, Université Libre de Bruxelles, 808, route de Lennik, 1070 Bruxelles, Belgique.

Jean-Marie Boeynaems

Service de Chimie Médicale, Hôpital Erasme et Institut de Recherche Interdisciplinaire, Faculté de Médecine, Université Libre de Bruxelles, 808, route de Lennik, 1070 Bruxelles, Belgique.

RÉFÉRENCES

1. Sévigny J, Beauduin AR. Le monde des nucléotides extracellulaires. *médecine/sciences* 1994; 10: 836-44.
2. Lepage P, Gros P. La glycoprotéine P: de la résistance croisée aux médicaments au transport des lipides biliaires. *médecine/sciences* 1995; 11: 357-66.
3. Al-Awqati Q. Regulation of ion channels by ABC transporters that secrete ATP. *Science* 1995; 269: 805-6.
4. Puchelle E. CFTR (*cystic fibrosis transmembrane conductance regulator*): une protéine à multiples fonctions. *médecine/sciences* 1994; 10: 627-9.
5. Gordon EL, Pearson JD, Slakey LL. The hydrolysis of extracellular adenine nucleotides by cultured endothelial cells from pig aorta. *J Biol Chem* 1986; 261: 15496-504.
6. Drury AN, Szent-Györgyi A. The physiological activity of adenine compounds with special reference to their action upon the mammalian heart. *J Physiol* 1929; 68: 213-37.
7. Burnstock G. A basis for distinguishing two types of purinergic receptors. In: Straub RW, Bolis L, eds. *Cell membrane receptors for drugs and hormones, a multidisciplinary approach*. New York: Raven Press, 1978: 107-18.
8. Humphries RG, Robertson MJ, Leff P. A novel series of P_{2T} purinoceptor antagonists: definition of the role of ADP in thrombosis. *Trends Physiol Sci* 1995; 16: 179-81.
9. Motte S, Piroton S, Boeynaems JM. Evidence that a form of ATP uncomplexed with divalent cations is the ligand of P_{2U} and nucleotide/P_{2U} receptors on aortic endothelial cells. *Br J Pharmacol* 1993; 109: 967-71.
10. Webb TE, Simon J, Krishek BJ, Bateson AN, Smart TG, King BF, Burnstock G, Barnard EA. Cloning and functional expression of a brain G-protein-coupled ATP receptor. *FEBS Lett* 1993; 324: 219-25.
11. Parmentier M, Libert F, Vassart G. La famille des récepteurs couplés aux protéines G et ses orphelins. *médecine/sciences* 1995; 11: 222-31.
12. Lustig KD, Shiau AK, Brake AJ, Julius D. Expression cloning of an ATP receptor from mouse neuroblastoma cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90: 5113-7.
13. Filtz TM, Li Q, Boyer JL, Nicholas RA, Harden TK. Expression of a cloned P2Y purinergic receptor that couples to phospholipase C. *Mol Pharmacol* 1994; 46: 8-14.
14. Tokuyama Y, Hara M, Jones EMC, Fan Z, Bell GI. Cloning of rat and mouse P_{2U} purinoceptors. *Biochem Biophys Res Commun* 1995; 211: 211-8.
15. Henderson DJ, Elliot DG, Smith GM, Webb TE, Dainty IA. Cloning and characterization of a bovine P_{2U} receptor. *Biochem Biophys Res Commun* 1995; 212: 648-56.

RÉFÉRENCES

16. Parr CE, Sullivan DM, Paradiso AM, Lazarowski ER, Burch LH, Olsen JC, Erb L, Weissman GA, Boucher RC, Turner JT. Cloning and expression of a human P_{2U} nucleotide receptor, a target for cystic fibrosis pharmacotherapy. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994 ; 91 : 3273-9.

17. Rice WR, Burton FM, Fiedeldej DT. Cloning and expression of the alveolar type II cell P_{2U}-purinergic receptor. *Am J Resp Cell Mol Biol* 1995 ; 12 : 27-32.

18. Valera S, Hussy N, Evans RJ, Adami N, North RA, Surprenant A, Buell G. A new class of ligand-gated ion channel defined by P_{2X} receptor for extracellular ATP. *Nature* 1994 ; 371 : 516-9.

19. Brake AJ, Wagenbach MJ, Julius D. New structural motif for ligand-gated ion channels defined by an ionotropic ATP receptor. *Nature* 1994 ; 371 : 519-23.

20. Chen C, Akoplan AN, Sivilotti L, Colquhoun D, Burnstock G, Wood JN. A P_{2X} purinoceptor expressed by a subset of sensory neurons. *Nature* 1995 ; 377 : 428-31.

21. Lewis C, Neidhart S, Holy C, North RA, Buell G, Surprenant A. Coexpression of P_{2X₂} and P_{2X₃} receptor subunits can account for ATP-gated currents in sensory neurons. *Nature* 1995 ; 377 : 432-5.

22. Fredholm BB, Abbracchio MP, Burnstock G, Harden TK, Jacobson KA, Leff P, Williams M. Nomenclature and classification of purinoceptors. *Pharmacol Rev* 1994 ; 46 : 143-56.

23. Barnard EA, Burnstock G, Webb TE. G protein-coupled receptors for ATP and other nucleotides : a new receptor family. *Trends Physiol Sci* 1994 ; 15 : 67-70.

24. Communi D, Pirotton S, Parmentier M, Boeynaems JM. Cloning and functional expression of a human uridine nucleotide receptor. *J Biol Chem* 1995 ; 270 : 30849-52.

25. Kaplan MH, Smith DI, Sundick RS. Identification of a G protein coupled receptor induced in activated T cells. *J Immunol* 1993 ; 151 : 628-36.

26. Erb L, Garrad R, Wang Y, Quinn T, Turner JT, Weisman GA. Site-directed mutagenesis of P_{2U} receptors. *J Biol Chem* 1995 ; 270 : 4185-8.

27. Seifert R, Schultz G. Involvement of pyrimidinoceptors in the regulation of cell functions by uridine and by uracil nucleotides. *Trends Physiol Sci* 1989 ; 10 : 365-9.

28. Knowles MR, Clarke LL, Boucher RC. Activation by extracellular nucleotides of chloride secretion in the airway epithelia of

patients with cystic fibrosis. *N Engl J Med* 1991 ; 325 : 533-8.

TIRÉS À PART

J.M. Boeynaems.