

Où l'on apprend comment la grenouille pourrait se faire aussi grosse que le bœuf... Découverte chez les amphibiens d'un nouveau neuropeptide stimulant l'appétit chez les mammifères

Nicolas Chartrel, Jean Costentin, Hubert Vaudry

Inserm U.413, CNRS
UMR 6036, Institut Fédératif
de Recherches
Multidisciplinaires
sur les Peptides n° 23,
Université de Rouen,
76821 Mont-Saint-Aignan,
France.
nicolas.chartrel@univ-rouen.fr
jean.costentin@univ-rouen.fr
hubert.vaudry@univ-rouen.fr

> L'histoire du 26RFa débute il y a plus de 500 millions d'années avec l'apparition des cnidaires dont le système nerveux rudimentaire exprime déjà des neuropeptides présentant le motif Arg-Phe-NH₂ à l'extrémité carboxy-terminale de leur séquence, désignés sous le terme générique de peptides RFamide [1]. Chez divers groupes d'invertébrés, les peptides RFamide exercent des fonctions multiples notamment dans la régulation de l'activité cardiaque, le maintien de l'équilibre hydrique ou encore la neurotransmission. Il est maintenant bien établi que les peptides RFamide sont largement représentés chez tous les invertébrés; à titre d'exemple, chez le ver *C. elegans*, 22 gènes codant pour 59 peptides RFamide distincts ont été identifiés [2]. En 1985, la purification du neuropeptide FF (NPFF), à partir d'un extrait de cerveau de bœuf, a montré pour la première fois que les peptides RFamide sont également présents chez des vertébrés et qu'ils y exercent des fonctions importantes [3]. Toutefois, 20 ans après la découverte du NPFF, seulement 3 gènes codant pour des précurseurs de peptides RFamide ont été identifiés chez les mammifères. Un laboratoire public (Inserm U.413, Rouen, France) et deux compagnies pharmaceutiques (Schering-Plough à Kenilworth, USA et Takeda Chemical Industries à Ibaraki,

Japon) viennent simultanément de caractériser, chez l'homme, l'ADNc codant pour le précurseur d'un peptide RFamide totalement nouveau, le 26RFa. Ces équipes montrent que le 26RFa est le ligand endogène du récepteur orphelin GPR103 et qu'il exerce des activités remarquables chez les rongeurs [4-6], suggérant que la famille des peptides RFamide est peut-être beaucoup plus diversifiée chez les mammifères qu'on ne le supposait. L'identification d'un nouveau neuropeptide chez l'homme constitue toujours un événement majeur qui mérite que l'on s'y attarde. De plus, dans le cas présent, les chercheurs de l'Inserm, de Schering-Plough et de Takeda ont utilisé des approches distinctes pour identifier le 26RFa (Figure 1), lesquelles constituent une bonne illustration des différentes stratégies actuellement mises en œuvre pour découvrir de nouveaux neuropeptides.

Le 26RFa, un même neuropeptide chez la grenouille et chez l'homme

Pour isoler le 26RFa, les chercheurs de l'Inserm U.413 ont appliqué une stratégie maintenant bien rodée qui consiste à purifier à partir du cerveau d'un vertébré poïkilotherme - la grenouille - des neuropeptides jusqu'alors inconnus, puis à rechercher les orthologues de ces nou-

veaux neuropeptides d'amphibiens chez les mammifères par clonage moléculaire assisté d'une analyse bio-informatique (Figure 1). La pertinence de cette approche comparative avait déjà été validée avec la découverte de la sécrétoneurine [7], de la cortistatine [8] et de l'urotensine II [9] chez l'homme, trois neuropeptides initialement isolés à partir du cerveau de la grenouille [10-12]. Afin de rechercher de nouveaux membres de la famille des peptides RFamide chez les vertébrés, les chercheurs rouennais ont criblé des fractions pré-purifiées d'un extrait de cerveaux de grenouille à l'aide d'un anticorps dirigé contre le motif Arg-Phe-NH₂. Ils ont ainsi pu isoler deux peptides possédant la signature RFamide, l'un de 12 acides aminés qui a été nommé *Rana* RFamide (R-RFa) [13] et le second de 26 acides aminés qui a été désigné par le sigle 26RFa [4]. La comparaison de la séquence du R-RFa avec celles des autres peptides RFamide connus chez les mammifères a révélé que le peptide de grenouille est l'orthologue du RFRP-1 des mammifères, un peptide RFamide identifié *in silico*, qui se lie avec une forte affinité au récepteur orphelin OT7T022 [14]. En revanche, l'analyse structurale a montré que le 26RFa ne présente que très peu d'identité de séquence avec les autres peptides RFamide de vertébrés,



mis à part la signature RFamide commune à tous les peptides de cette grande famille (Figure 2) : le 26RFa est donc un neuropeptide totalement nouveau. La recherche, dans les banques de données protéiques et nucléotidiques, de peptides apparentés au 26RFa a permis d'identifier, dans le génome humain et dans les EST de rat, deux séquences nucléotidiques codant pour un peptide RFamide fortement apparenté au 26RFa, indiquant donc que ce nouveau neuropeptide n'était pas une particularité des amphibiens mais qu'il était vraisemblablement présent aussi chez les mammifères. Les ADNc codant pour le précurseur du 26RFa ont alors pu être aisément isolés chez le rat et chez l'homme. Chez les deux espèces, le peptide 26RFa occupe la région carboxy-terminale du précurseur (Figure 3), une localisation classique

pour de nombreux neuropeptides régulateurs tels que la somatostatine, l'urotensine II, le CRF (*corticotropin-releasing factor*), la β -endorphine, la MCH (*melanin-concentrating hormone*), etc. Les chercheurs de l'Inserm U.413 ont ensuite localisé, chez le rat, les ARNm du prépro-26RFa dans deux noyaux du diencéphale - le noyau hypothalamique ventromédian et l'aire hypothalamique latérale - qui sont tous deux connus pour être impliqués dans le contrôle de la prise alimentaire. En accord avec cette distribution neuroanatomique, les chercheurs de l'UMR CNRS 6036 à Rouen (France) ont pu montrer que le 26RFa, injecté par voie intracérébro-ventriculaire, provoque une augmentation importante de la consommation de nourriture chez la souris. La découverte, à partir du cerveau de grenouille, d'un neuropeptide orexigène chez les mammifères

souligne une nouvelle fois que nos lointains ancêtres amphibiens sont de précieux alliés pour les biologistes en quête de nouveaux peptides bioactifs [15].

Le 26RFa, ligand endogène du GPR103

La démarche qui a permis aux chercheurs de Schering-Plough d'identifier l'ADNc du 26RFa humain [6] associe une approche de pharmacologie inverse, qui a déjà été à plusieurs reprises décrite dans les colonnes de *médecine/sciences* [16-19], à l'analyse bio-informatique (Figure 1). La compagnie Schering-Plough, comme beaucoup d'autres groupes pharmaceutiques, s'est lancée dans un programme de « désorphanisation » de récepteurs couplés aux protéines G. Les chercheurs de cette compagnie se sont notamment intéressés à un récepteur orphelin, le GPR103 (aussi nommé AQP27

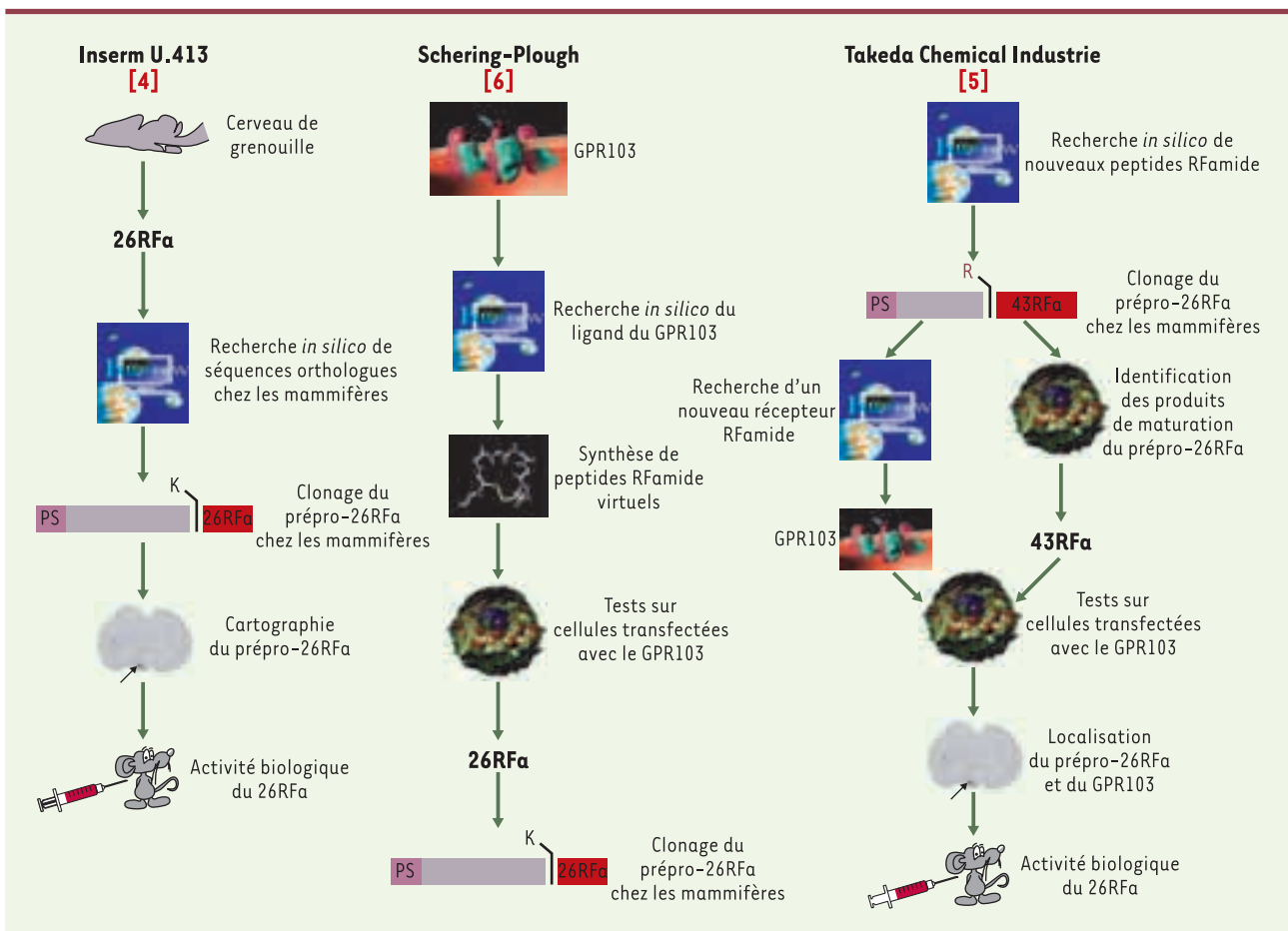


Figure 1. Comparaison des approches utilisées par les chercheurs de l'Inserm U.413, de Schering-Plough et de Takeda Chemical Industries pour l'identification du 26RFa.



ou SP9155) qui présente une importante identité de séquence (49%) avec les récepteurs de types 1 et 2 du NPFF. Cette forte parenté structurale suggèrait que le ligand naturel du GPR103 pouvait être un peptide de la famille RFamide. Ils ont donc recherché dans le génome humain

des séquences contenant le motif Arg-Phe-Gly suivi d'un doublet basique, site potentiel de clivage pour les prohormones convertases. Toutes les séquences ainsi identifiées ont été analysées et celles présentant un peptide signal présumptif, mais exemptes de domaine

transmembranaire, ont été sélectionnées pour servir de base à la synthèse de peptides virtuels de type RFamide. En évaluant la capacité de ces peptides à mobiliser le calcium intracellulaire dans des cellules transfectées avec le GPR103, il est apparu que seule la réplique synthétique correspondant à la séquence humaine du 26RFa présentait une forte affinité pour le GPR103. Les chercheurs ont alors cloné le précurseur du 26RFa chez l'homme et chez la souris, et ont étudié la distribution du prépro-26RFa et du GPR103 dans le cerveau et dans divers organes périphériques. Ils ont observé que, dans le cerveau de la souris, les ARNm du prépro-26RFa sont majoritairement exprimés dans l'hypothalamus, confirmant ainsi les données obtenues par les chercheurs rouennais dans le cerveau du rat. Les ARNm du GPR103 sont, eux aussi, fortement exprimés dans l'hypothalamus, ce qui valide l'idée selon laquelle le 26RFa a pour cible certains noyaux hypothalamiques. Les résultats complémentaires obtenus par les chercheurs de Rouen et ceux de Kenilworth montrent que le 26RFa est produit dans le cerveau, que ce neuropeptide est le ligand endogène du GPR103 et que l'administration de 26RFa provoque une forte stimulation de la prise alimentaire.

Peptide	Séquence
26RFa (homme)	TSGPLGNLAEELNGYSRKKGGFSFRF-NH₂
26RFa (bœuf)	VGGLLGT LAEELNGYSRKKGGFSFRF-NH₂
26RFa (rat)	ASGLLGT LAEELSSYSRRKGGFSFRF-NH₂
26RFa (grenouille)	VG TALGS LAEELNGYNRKKGGFSFRF-NH₂
NPFF (bœuf)	FLFQPQRF-NH₂
NPAF (bœuf)	AGEGLSSPFWSLAAPQRF-NH₂
RFRP-1 (bœuf)	SLTFEEVKDWPAPI KMNKPVVNKMPPSAANLPLRF-NH₂
RFRP-3 (bœuf)	AMAHLP LRLGKNREDSLSRWPNLPQRF-NH₂
PrRP (bœuf)	TPDINPAWYAGRGI RPVGRF-NH₂
GnIH (caïlle)	SIKPSAYLPLRF-NH₂
GnIH-RP-2 (caïlle)	SSIQSLLNLPQRF-NH₂
fGRP-RP-1 (grenouille)	SIPNLPQRF-NH₂
R-RFa (grenouille)	SLKPAANLPLRF-NH₂
C-RFa (carpe)	SPEIDPFWYVGRGVRP IGRF-NH₂

Figure 2. Comparaison de la structure primaire du 26RFa avec celle d'autres peptides de la famille RFamide identifiés chez les vertébrés. Les acides aminés identiques à ceux présents dans la séquence du 26RFa humain sont indiqués en rouge. NPFF: neuropeptide FF; NPAF: neuropeptide AF; RFRP-1 à -3: *RFamide-related peptide-1 to -3*; PrRP: *prolactin-releasing peptide*; GnIH: *gonadotropin-inhibiting hormone*; GnIH-RP-2: *gonadotropin-inhibiting hormone-related peptide-2*; fGRP-RP-1: *frog growth hormone-releasing peptide-related peptide-1*; R-RFa: *Rana RFamide*; C-RFa: *Carassius RFamide*.

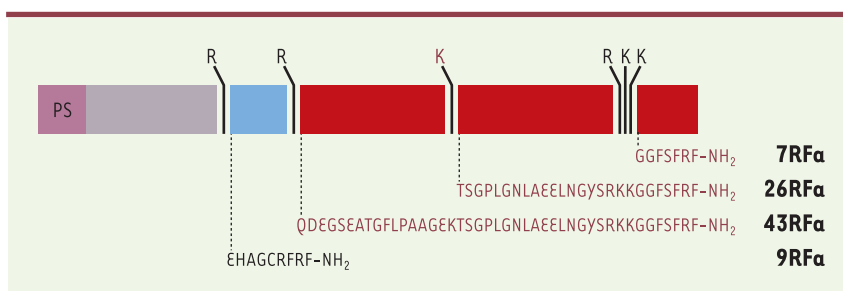


Figure 3. Structure du précurseur du 26RFa chez l'homme. Les acides aminés basiques, sites potentiels de clivage par les prohormones convertases (K, lysine; R, arginine), sont indiqués par des barres verticales. Quatre peptides RFamide peuvent être engendrés à partir du précurseur: (1) le 7RFa, qui correspond à l'heptapeptide carboxy-terminal du 26RFa, dont la séquence est totalement conservée chez toutes les espèces où le prépro-26RFa a été caractérisé; (2) le 26RFa, qui a été caractérisé dans le cerveau de grenouille; (3) le 43RFa, correspondant à une forme allongée de 17 acides aminés en amino-terminal du 26RFa, qui peut être produit *in vitro*; et (4) le 9RFa, un peptide RFamide flanquant le 26RFa dans le précurseur humain, dont la maturation à partir du précurseur n'a pas encore été montrée. Les séquences des différents peptides RFamide sont indiquées sous le schéma du prépro-26RFa. PS: peptide signal.

Le 43RFa, ligand sélectif du GPR103

L'identification du 43RFa (encore désigné QRFP), forme étendue du 26RFa, par les chercheurs de Takeda comme ligand sélectif du GPR103 [5] est le résultat d'une démarche intermédiaire entre celles mises en œuvre par l'Inserm U.413 et Schering-Plough (Figure 1). Comme les chercheurs rouennais, l'équipe d'Ibaraki a émis l'hypothèse que des peptides RFamide restaient à découvrir chez les mammifères. Leur stratégie a consisté à rechercher dans le génome humain l'existence de peptides RFamide présumptifs en utilisant les mêmes critères de sélection que les chercheurs de Kenilworth, à savoir la présence du motif Arg-Phe-Gly suivi d'un résidu basique, site potentiel de clivage, dans les pro-

téines hypothétiques arborant un peptide signal. Par cette approche, les chercheurs d'Ibaraki ont identifié la même séquence que leurs compétiteurs de Rouen et de Kenilworth et ont ensuite cloné l'ADNc codant pour le précurseur du 26RFa chez l'homme, le bœuf, le rat et la souris. Ils ont alors postulé que le peptide RFamide contenu dans ce précurseur pouvait être le ligand d'un récepteur orphelin et ils ont misé sur le GPR103 en raison de sa forte identité structurale avec les récepteurs connus de peptides RFamide. Les chercheurs de Takeda ont tout d'abord synthétisé un peptide de 7 acides aminés, le 7RFa, correspondant au domaine carboxy-terminal du 26RFa (région totalement conservée chez toutes les espèces et précédée d'un triplet basique) (Figure 3) et ils ont observé que ce peptide présentait une faible affinité pour le GPR103. Ils ont alors émis l'hypothèse selon laquelle une forme allongée de cet heptapeptide pourrait être un meilleur ligand du GPR103. Afin de déterminer quels peptides RFamide pouvaient être engendrés à partir du précurseur du 26RFa, ils ont transfecté des cellules HEK avec l'ADNc du 26RFa et ils ont isolé une forme allongée du 26RFa, possédant 43 acides aminés, le 43RFa. Les chercheurs de Takeda ont ensuite montré que le 43RFa est légèrement plus affiné que le 26RFa vis-à-vis du GPR103. De plus, ils ont observé que le GPR103 est fortement exprimé dans le cortex surrénalien, notamment dans les zones glomérulée et fasciculée, suggérant que le ligand de ce récepteur pouvait être impliqué dans le contrôle de la sécrétion des corticostéroïdes. De fait, l'injection par voie intraveineuse de 43RFa, stimule la sécrétion d'aldostérone chez le rat sans modifier les taux de testostérone ou de corticostérone. Une fois de plus, les résultats obtenus par l'équipe de Takeda sont complémentaires de ceux publiés par les chercheurs de l'Inserm et de Schering-Plough dans la mesure où ils révèlent que le précurseur du 26RFa peut engendrer, en plus du 26RFa lui-

même, une forme allongée du neuropeptide qui possède une forte activité biologique.

Conclusions

L'identification du 26RFa constitue sans aucun doute une avancée importante tant sur le plan conceptuel que pour ses applications physiopathologiques potentielles. D'une part, ces travaux montrent que la famille des peptides RFamide est certainement plus diversifiée chez les vertébrés qu'on ne l'imaginait jusqu'à présent. D'autre part, la mise en évidence de l'effet orexigène du 26RFa associée à la connaissance de la structure du peptide et de celle de son récepteur permettent d'envisager le développement d'agonistes ou d'antagonistes spécifiques qui pourraient être utilisés dans le traitement des troubles du comportement alimentaire. Toutefois, la découverte du 26RFa et de sa forme allongée, le 43RFa, soulève plusieurs questions qui restent pour l'instant sans réponse. Par exemple, alors que le 26RFa et le 43RFa sont tous deux biologiquement actifs, on ignore à l'heure actuelle si un seul des ces neuropeptides ou les deux sont produits chez l'homme et si leur précurseur subit une maturation différentielle en fonction des tissus dans lesquels il est exprimé. De même, on ne sait pas si le 26RFa et le 43RFa possèdent, comme la plupart des neuropeptides, plusieurs sous-types de récepteurs. Il serait notamment intéressant de déterminer si, en plus du GPR103, le 26RFa est capable d'activer un autre récepteur qui lui serait spécifique, non reconnu par le 43RFa, pouvant ainsi conférer aux deux neuropeptides des fonctions physiologiques distinctes. Nul doute que les efforts conjugués des laboratoires académiques et des compagnies pharmaceutiques permettront de résoudre plusieurs de ces énigmes. ♦

The frog who wished to be as big as an ox: characterization in amphibians of a novel neuropeptide that stimulates appetite in mammals

RÉFÉRENCES

1. Price DA, Greenberg M. Structure of a molluscan cardioexcitatory neuropeptide. *Science* 1977; 197: 670-1.
2. Li C, Kyuhyung K, Nelson LS. FMRFamide related neuropeptide gene family in *Caenorhabditis elegans*. *Brain Res* 1999; 848: 26-34.
3. Yang HYT, Fratta W, Majane EA, et al. Isolation, sequencing, synthesis and pharmacological characterization of two brain neuropeptides that modulate the action of morphine. *Proc Natl Acad Sci USA* 1985; 82: 7757-61.
4. Chartrel N, Dujardin C, Anouar Y, et al. Identification of 26RFa, a hypothalamic neuropeptide of the RFamide peptide family with orexigenic activity. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; 100: 15247-52.
5. Fukusumi S, Yoshida H, Fujii R, et al. A new peptidic ligand and its receptor regulating adrenal function in rats. *J Biol Chem* 2003; 278: 46387-95.
6. Jiang Y, Luo L, Gustafson EL, et al. Identification and characterization of a novel RF-amide peptide ligand for orphan G-protein-coupled receptor SP9155. *J Biol Chem* 2003; 278: 27652-7.
7. Kirchmair R, Hogue-Angeletti R, Gutierrez J, et al. Secretoneurin: a neuropeptide generated in the brain, adrenal medulla and endocrine tissues by proteolytic processing of secretogranin II (chromogranin C). *Neuroscience* 1993; 53: 359-65.
8. de Lecea L, Criado JR, Prospero-Garcia O, et al. A cortical neuropeptide with neuronal depressant and sleep-modulating properties. *Nature* 1996; 381: 242-5.
9. Coulouarn Y, Lihmann I, Jégou S, et al. Cloning of the cDNA encoding the urotensin II precursor in frog and human reveals intense expression of the urotensin II gene in the motoneurons of the spinal cord. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95: 15803-8.
10. Vaudry H, Conlon JM. Identification of a peptide arising from the specific post-translation processing of secretogranin II. *FEBS Lett* 1991; 284: 31-3.
11. Vaudry H, Chartrel N, Conlon JM. Isolation of [Pro², Met¹³]somatostatin-14 and somatostatin-14 from the frog brain reveals the existence of a somatostatin gene family in a tetrapod. *Biochem Biophys Res Commun* 1992; 188: 477-82.
12. Conlon JM, O'Harte F, Smith DD, et al. Isolation and primary structure of urotensin II from the brain of a tetrapod, the frog *Rana ridibunda*. *Biochem Biophys Res Commun* 1992; 188: 578-83.
13. Chartrel N, Dujardin C, Leprince J, et al. Isolation, characterization and distribution of a novel neuropeptide, *Rana* RFamide (R-RFa), in the brain of the frog *Rana esculenta*. *J Comp Neurol* 2002; 448: 111-27.
14. Hinuma S, Shintani Y, Fukusumi S, et al. New neuropeptides containing carboxy-terminal RFamide and their receptor in mammals. *Nat Cell Biol* 2000; 2: 703-8.
15. Lazarus LH, Attila M. The toad, ugly and venomous, wears yet a precious jewel in his skin. *Prog Brain Res* 1993; 41: 473-507.
16. Vaudry H, Braun B, Chartrel N. La pharmacologie inverse marque des points: découverte d'un nouveau peptide stimulant la sécrétion de prolactine. *Med Sci (Paris)* 1998; 14: 1118-20.
17. Vaudry H, Anouar Y, Galas L, et al. La gréline, un nouveau neuropeptide stimulant la sécrétion de l'hormone de croissance. *Med Sci (Paris)* 2000; 16: 555-7.
18. Vaudry H, Coulouarn Y, Lihmann I, et al. Deux neuropeptides orphelins trouvent enfin leur récepteur. *Med Sci (Paris)* 2000; 16: 426-9.
19. Chartrel N, Vaudry H. La relaxine: une ancienne hormone trouve enfin ses récepteurs. *Med Sci (Paris)* 2002; 18: 670-2.