

Les récepteurs couplés aux protéines G sous les feux de la rampe

Abla Benleulmi-Chaachoua^{1,2,3}, Stefanie Wojciech^{1,2,3} et Ralf Jockers^{1,2,3}

¹ Inserm, U1016, Institut Cochin, 22 rue Méchain, 75014 Paris, France

² CNRS UMR 8104, Institut Cochin, 22 rue Méchain, 75014 Paris, France

³ Université Paris Descartes, 12 rue de l'École de Médecine, 75006 Paris, France

Auteur correspondant : Ralf Jockers, ralf.jockers@inserm.fr

Reçu le 14 juin 2013

Résumé – Les récepteurs couplés aux protéines G (RCPG), aussi appelés protéines à sept domaines transmembranaires (7TM), jouent un rôle important dans le maintien de l'homéostasie tissulaire et dans la communication intercellulaire et hormonale. De ce fait, l'activité des RCPG est régulée par divers ligands tels que photons, ions, métabolites, lipides ou protéines ainsi que par un nombre important de médicaments actuellement présents sur le marché. Les travaux de recherche réalisés sur ces récepteurs ont été récompensés par le prix Nobel de Chimie en 2012. Cet article résume brièvement les connaissances actuelles sur ces protéines et discute des défis futurs tant sur le plan fondamental que thérapeutique.

Mots clés : Récepteurs couplés aux protéines G / prix Nobel / médicaments / ligands biaisés / oligomérisation

Abstract – G protein-coupled receptors in the spot light.

G protein-coupled receptors (GPCRs), also known as seven transmembrane domain-spanning proteins (7TM), play an important role in tissue homeostasis and cellular and hormonal communication. GPCRs are targeted by a large panel of natural ligands such as photons, ions, metabolites, lipids and proteins but also by numerous drugs. Research efforts in the GPCR field have been rewarded in 2012 by the Nobel Prize in Chemistry. The present article briefly summarizes our current knowledge on GPCRs and discusses future challenges in terms of fundamental aspects and therapeutic applications.

Key words: G protein-coupled receptors / Nobel price / drugs / biased ligands / oligomerisation

Introduction

Les récepteurs couplés aux protéines G (RCPG) forment l'une des plus grandes familles de récepteurs membranaires. Chez l'Homme, 3 % du génome encode près de 800 membres. Cette diversité s'explique par la grande variété de stimuli auxquels répondent ces récepteurs, qui va des photons, ions, nucléotides et molécules odorantes jusqu'aux peptides et protéines. Ainsi, la réponse à ces divers signaux permet de réguler de nombreuses fonctions biologiques telles que la neurotransmission, l'immunité, la vue, l'olfaction, le goût, et des fonctions artérielles, métaboliques et

osmotiques. Considérant leurs rôles importants dans l'organisme, les RCPG représentent des cibles privilégiées de traitement, et sont visés par 30 à 40 % des médicaments actuellement sur le marché.

La quête des RCPG a commencé dans les années 1970 avec des études de purification et de marquage par photoaffinité des récepteurs β -adrénergiques (pour un bref historique, voir Lefkowitz, 2004). Ces travaux ont permis d'identifier quelques acides aminés de ces récepteurs, ce qui est une étape indispensable pour synthétiser les amorces d'ADN pour le gène correspondant. Ainsi, le premier gène de RCPG cloné est celui du récepteur β 2-adrénergique (R β 2A)

du hamster publié en 1986 (Dixon *et al.*, 1986). Ce travail a permis de découvrir que ce récepteur présentait une homologie de séquence avec la rhodopsine, une protéine exprimée dans la rétine et composée de sept domaines transmembranaires (7TM). Cette observation fondamentale constitue la première occurrence, mais non la dernière, où la rhodopsine a servi de modèle d'inspiration pour l'étude des RCPG. Le clonage de gènes d'autres RCPG a rapidement suivi, comme le gène du R β 2A humain en 1987 et le gène du R β 3A humain en 1989 par un laboratoire français dirigé par Donny Strosberg. Aujourd'hui, cette famille compte plus de 800 gènes identifiés chez l'Homme, tous codant pour des protéines à sept domaines transmembranaires (7TM). Très tôt, une seconde caractéristique commune de ces récepteurs avait été pressentie : leur couplage aux protéines G hétérotrimériques. En effet, Martin Rodbell avait postulé, bien avant le clonage des RCPG, que la transmission des stimuli hormonaux faisait intervenir des transducteurs de signaux liant le GTP et permettant de réguler l'adénylate cyclase qui produit l'AMP cyclique (figure 1A). Ce concept a été ensuite validé par Alfred Gilman qui a purifié et caractérisé les protéines G. Ce travail a été couronné par le prix Nobel de Médecine et de Physiologie décerné à ces deux chercheurs américains en 1994 (<http://www.nobelprize.org/nobel-prizes/medicine/laureates/1994/>).

La fin des années 80 et le début des années 90 ont été marqués par une autre découverte importante : les RCPG peuvent avoir une activité constitutive spontanée en l'absence de tout ligand (Costa & Herz, 1989; Allen *et al.*, 1991). Les effets délétères d'une activation continue de RCPG ont permis de définir, quelques années plus tard, une nouvelle classe de ligands capables d'annuler cette activité spontanée. Ils ont été nommés agonistes inverses, par opposition aux agonistes qui activent le récepteur. On sait aujourd'hui que les RCPG fluctuent spontanément entre différents états conformationnels, cet équilibre pouvant être différent selon le récepteur, et que la liaison d'un agoniste ou d'un agoniste inverse déplace cet équilibre vers des états plutôt actifs ou plutôt inactifs du récepteur.

Durant la même période, et parallèlement aux efforts de clonage des RCPG, deux familles de protéines jouant des rôles clés dans la régulation de l'activité de ces récepteurs ont été identifiées : les GRK (RCPG kinases) et les β -arrestines. Par analogie avec le modèle de la rhodopsine, un rôle a pu être attribué à ces protéines dans l'inactivation du signal engendré par les protéines G, effet appelé désensibilisation (Reiter *et al.*, 2012). Brièvement, une fois activé, le RCPG est rapidement phosphorylé par les GRK, ce qui permet le recrutement des β -arrestines. Ce dernier induit plusieurs effets : l'arrêt de la signalisation de la protéine G

par suite de l'encombrement stérique, l'internalisation des récepteurs, et le déclenchement d'une deuxième vague de signalisation dépendante des β -arrestines. Cette complexité de signaux a conduit, plus tard, au concept de signalisation biaisée qui est basée sur le fait que certains ligands sont capables d'activer des voies de signalisation préférentiellement à d'autres.

L'avancée suivante dans le domaine des RCPG a consisté en la résolution de leur structure. Après avoir surmonté plusieurs obstacles techniques, l'équipe de Brian Kobilka a réussi à cristalliser et identifier la structure du récepteur R β 2A en 2007 (Rasmussen *et al.*, 2007). Cinq ans plus tard, près de 40 structures d'une vingtaine de RCPG sous différentes formes (liées à des agonistes inverses, à des antagonistes ou à des agonistes) ont été comprises (Audet & Bouvier, 2012). Les résultats de ces travaux confirment une architecture en 7TM largement conservée par les récepteurs, mais montrent une grande diversité quant à la position et la taille de la poche de liaison du ligand. En 2011, un succès remarquable a été la résolution de la structure du R β 2A en présence d'un agoniste et de la protéine Gs composée de ses trois sous-unités α , β et γ (Rasmussen *et al.*, 2011). Ce coup de maître a permis de visualiser la surface d'interaction entre le R β 2A et la protéine Gs et de proposer un mécanisme d'activation de la protéine G qui repose sur un basculement d'une hélice alpha au sein de la sous-unité G α . En comparant les structures du R β 2A lié à un agoniste inverse, à un agoniste et à un agoniste en présence de la protéine G, on constate que l'agoniste seul ne suffit pas à stabiliser l'état actif du récepteur, mais que la présence de l'agoniste et de la protéine G est indispensable. Ceci démontre de façon claire l'action allostérique de la protéine G sur le récepteur et valide le concept de complexe ternaire ligand-récepteur-protéine G requis pour la liaison de l'agoniste à haute affinité.

Les défis futurs dans le domaine des RCPG

L'attribution du Prix Nobel de Chimie en 2012 à Robert Lefkowitz et Brian Kobilka, deux chercheurs américains à l'origine de nombre des découvertes détaillées plus haut, a clairement marqué une étape importante dans le domaine des RCPG (<http://www.nobelprize.org/nobel-prizes/chemistry/laureates/2012/>). C'est à se demander si tout ce que nous devons savoir sur ces récepteurs a été déjà compris. Une analyse du passé laisse penser le contraire. Les chapitres suivants tentent de se projeter dans le futur et d'identifier les défis à venir à la fois sur le plan fondamental et thérapeutique.

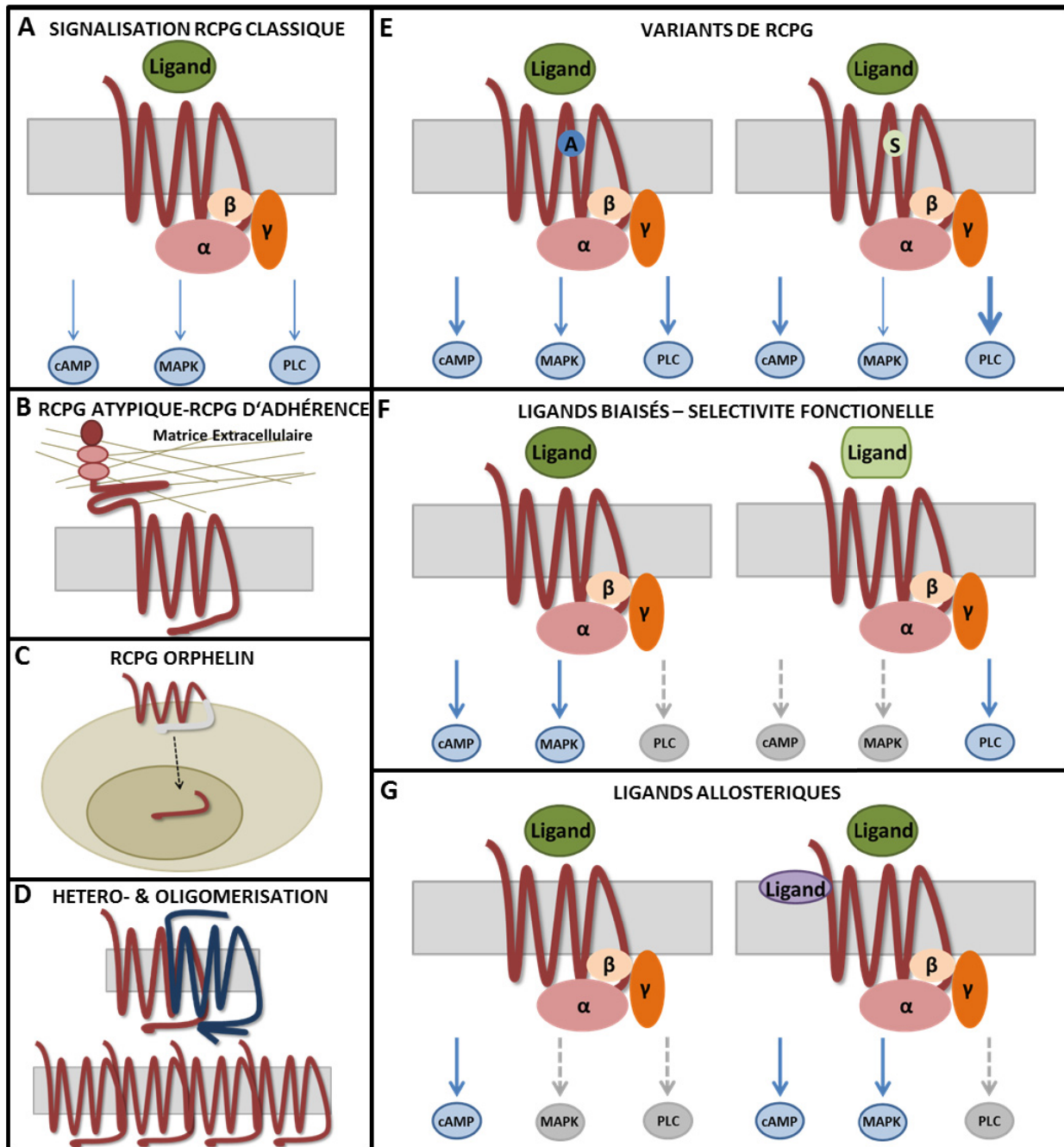


Fig. 1. Variation autour d'un motif – les facettes des RCPG. La stimulation des RCPG par leurs ligands peut conduire à l'activation des voies de signalisation classiques comme la formation de l'AMP cyclique par l'adénylate cyclase, l'activation des MAP Kinases ou de la phospholipase C (A). On peut aussi attribuer aux RCPG des fonctions indépendantes de la stimulation par le ligand illustrées par (1) les RCPG atypiques comme les RCPG d'adhérence jouant un rôle dans l'attachement de la cellule à la matrice extracellulaire (B); (2) les RCPG orphelins dont le ligand est inconnu, qui désormais peuvent avoir des fonctions inattendues liées par exemple à leur translocation nucléaire à la suite du clivage protéolytique de la partie C-terminale (C); (3) le phénomène d'oligomérisation des RCPG (homo- ou hétéro-oligomérisation) (D). De plus, il existe des variants de RCPG qui peuvent avoir des effets différentiels sur le profil de signalisation des récepteurs (E). La découverte des ligands biaisés est la base de la sélectivité fonctionnelle des RCPG. Ces ligands peuvent induire une signalisation différentielle (F). Les ligands allostériques (violet) se lient aux récepteurs en dehors du site orthostérique et peuvent moduler l'état actif du récepteur induit par le ligand naturel (vert) (G).

La co-cristallisation de complexes de RCPG

Les RCPG sont répartis en cinq familles sur la base d'études phylogénétiques. Les récepteurs semblables à la rhodopsine dits *rhodopsin-like* constituent le plus grand groupe avec environ 700 membres chez l'Homme. Les récepteurs de la sécrétine, les récepteurs d'adhérence, les récepteurs du glutamate et les récepteurs *frizzled/taste2* constituent les autres familles (Lagerstrom & Schiöth, 2008). Les récepteurs *rhodopsin-like* ont été les premiers cristallisés, et la structure d'une douzaine d'entre eux est à ce jour résolue. Parmi les autres familles, le domaine transmembranaire du récepteur *Smoothened* (famille *frizzled*) (Wang *et al.*, 2013), quelques domaines extracellulaires de récepteurs de type glutamate (Muto *et al.*, 2007) et des récepteurs de la famille des sécrétines (Archbold *et al.*, 2011) ont été cristallisés. Ces succès, bien que remarquables, ne concernent cependant qu'une petite partie des 800 RCPG humains. Dans la perspective de conception de nouveaux médicaments par « *drug design* », le besoin de données structurales des récepteurs ciblés devrait amplifier les efforts dans ce domaine.

Cependant, la cristallisation du récepteur, seul ou avec son ligand, devrait céder la place à la co-cristallisation du RCPG avec ses partenaires d'interaction tels que les protéines G, les β -arrestines ou d'autres protéines régulatrices, ce qui relève de la prouesse technique ; déjà, quelques co-cristaux ont pu être obtenus : ces travaux ont notamment débuté par la cristallisation de la rhodopsine avec un peptide C-terminal de la sous-unité $G\alpha$ (Standfuss *et al.*, 2011), la cristallisation du $R\beta 2A$ avec la protéine Gs hétérotrimérique entière (Rasmussen *et al.*, 2011) et la cristallisation de la β -arrestine-1 en présence d'un peptide phosphorylé correspondant aux 29 acides aminés carboxy-terminaux du récepteur de la vasopressine V2 (Shukla *et al.*, 2013) et d'un variant tronqué de la β -arrestine-1 mimant l'état actif (Kim *et al.*, 2013). Ces données, conjointement à l'étude de l'oligomérisation des RCPG, permettront de mieux appréhender les interfaces d'interaction et la sélectivité d'un RCPG pour une isoforme donnée de la protéine associée, de comprendre la régulation de la signalisation de ces récepteurs, et de lever le voile sur des notions encore mal illustrées comme l'asymétrie de l'interaction des partenaires au sein d'un dimère (oligomère) de RCPG (voir plus bas).

Les bases structurelles de la signalisation biaisée des RCPG

La difficulté à purifier les RCPG rend compte d'une notion structurelle importante qui est leur instabilité conformationnelle. Ces fluctuations sont limitées

en présence de ligands qui stabilisent le récepteur dans un état conformationnel spécifique (Rosenbaum *et al.*, 2009). Contrairement aux ligands naturels qui activent typiquement plusieurs voies de signalisation, certains ligands synthétiques sont des ligands biaisés (figure 1F) qui n'activent qu'une partie des voies de signalisation et peuvent même se comporter comme des antagonistes pour les autres voies. Selon le modèle actuel, ces ligands stabiliseraient des conformations du récepteur favorisant l'interaction avec certains partenaires et pas avec d'autres, induisant ainsi une signalisation biaisée. Des travaux très récents semblent étayer ce modèle. Rahmeh *et al.* (2012) montrent, par exemple, que le récepteur de la vasopressine V2R lié au composé MCF14, qui active la protéine Gs mais ne recrute pas la β -arrestine, stabilise une conformation impliquant le mouvement du TM6 et de la boucle intracellulaire i3. En revanche, le composé SR121463, qui se comporte comme un agoniste inverse pour Gs et un agoniste partiel pour la β -arrestine, provoque un changement de conformation partielle du TM7 et de l'hélice alpha intracytoplasmique H8. L'agoniste naturel, la vasopressine, active les deux voies par une combinaison de ces mouvements (Rahmeh *et al.*, 2012). De la même manière, une étude par RMN a montré que l'activation de la protéine Gs par $R\beta 2A$ implique un mouvement de TM5/6, tandis que l'engagement de la β -arrestine s'accompagne d'un mouvement de TM3/7 (Liu *et al.*, 2012). Ces études confortent l'idée selon laquelle l'activation d'une voie de signalisation dépend d'un réarrangement conformationnel spécifique des domaines du récepteur. C'est ce qu'a confirmé une étude comparative de structures cristallographiques des récepteurs 5-HT_{1B} et 5-HT_{2B} liés à l'ergotamine, ligand biaisé pour la β -arrestine pour le récepteur 5-HT_{2B} mais non biaisé pour le 5-HT_{1B} (Wacker *et al.*, 2013).

La disponibilité de structures des RCPG dans différents états d'activation permet d'envisager maintenant des « campagnes » de criblage virtuel pour identifier de nouveaux ligands. Une première étude par criblage virtuel prospectif basée sur la structure cristallographique du $R\beta 2A$ à l'état actif a permis l'identification de nouveaux ligands agonistes dont deux composés biaisés pour le recrutement de la β -arrestine (Weiss *et al.*, 2013). Ce type d'étude devrait s'amplifier dans le futur et permettre le développement de ligands biaisés.

Vers l'application clinique des ligands biaisés

Pourquoi vouloir développer des ligands biaisés ? Cette volonté repose sur une idée simple : l'activation sélective de voies de signalisation d'un récepteur

doit permettre de favoriser les voies de signalisation « bénéfiques » au détriment des voies de signalisation « non souhaitées » responsables des effets secondaires. La mise en œuvre de cette stratégie est basée sur deux pré-requis : l'identification de ligands biaisés et un lien clair entre l'activation d'une voie de signalisation et un effet thérapeutique souhaité ou un effet secondaire. Par exemple, l'activation de GPR109A par l'acide nicotinique induit la diminution des taux de triglycérides et l'augmentation de l'HDL en activant les protéines Gi. À côté de ces effets bénéfiques, on observe une rougeur cutanée (« *flushing* ») indésirable qui implique l'activation de ERK1/2 par la β -arrestine-1 (Walters *et al.*, 2009). Des ligands biaisés comme l'agoniste partiel MK-0354 sont tout à fait intéressants parce qu'ils provoquent uniquement l'effet anti-lipolytique désirable, mais pas la rougeur cutanée (Semple *et al.*, 2008).

Les ligands allostériques

La quasi-totalité des médicaments mis sur le marché pour les RCPG a pour cible le site orthostérique (occupé par le ligand naturel). La découverte de nouveaux ligands allostériques, qui se lient à un site autre que celui du ligand naturel, offre des perspectives de traitements pharmacologiques plus spécifiques (figure 1G). Ces sites sont moins conservés que les sites orthostériques entre les différents sous-types du même récepteur. De ce fait, le ligand allostérique peut cibler une isoforme particulière, ce qui est souvent plus difficile pour les ligands orthostériques (Gloriam *et al.*, 2011). Un autre avantage des ligands allostériques est le fait qu'ils sont généralement individuellement inactifs : la présence du ligand orthostérique est nécessaire pour que ceux-ci exercent leur effet modulateur négatif ou positif (Koth *et al.*, 2012; Sheffler *et al.*, 2011). Beaucoup de ligands allostériques sont en cours de développement clinique et devraient être mis sur le marché dans un avenir très proche.

Oligomérisation des RCPG

Il est de plus en plus admis que les RCPG ont la capacité de former des dimères, voire des oligomères (figure 1D). L'existence de ces dimères a été démontrée par une batterie d'approches : co-immunoprécipitation, complémentation intermoléculaire et techniques basées sur un transfert d'énergie comme le BRET ou le FRET. Les données de cristallographie corroborent cette vision, et certaines structures montrent des complexes de RCPG comme celle du R β 1R (Warne *et al.*, 2008; Huang *et al.*, 2013), du CXCR4 (Wu *et al.*, 2010),

des récepteurs opioïdes μ -OR (Manglik *et al.*, 2012) et κ -OR (Wu *et al.*, 2012) ainsi que de la rhodopsine (Palczewski *et al.*, 2000). À ces évidences s'ajoutent d'autres données récentes, montrant que les protéines G et la β -arrestine se lient de façon asymétrique aux dimères de RCPG, ce qui apporte des arguments supplémentaires en faveur de l'existence de structures di(oligo)mériques (Maurice *et al.*, 2010, 2011; Sommer *et al.*, 2011; Jastrzebska *et al.*, 2013).

Le degré d'oligomérisation n'a été déterminé avec précision que dans un nombre limité de cas. Il a été clairement montré que mGluR2 existe sous forme de dimères (El Moustaine *et al.*, 2012) et le récepteur GABA_B sous forme de tétramère composé de deux homodimères des sous-types B1 et B2 (Kniazeff & Pin, 2012). Pour les autres RCPG, les évidences quant au degré d'oligomérisation sont beaucoup moins claires et parfois contradictoires (Milligan, 2013). Peut-être les avancées technologiques récentes de mesure en temps réel sur des cellules vivantes à l'échelle moléculaire permettront de résoudre ces questions. Les premiers résultats sur le récepteur du *N*-formyl peptide (FPR) et les R β 1A et R β 2R suggèrent l'existence d'un équilibre dynamique entre des formes monomérique, dimérique et oligomérique à des densités de récepteur très faibles (Kasai *et al.*, 2011; Calebiro *et al.*, 2013). En plus de cette dimension dynamique, les résultats suggèrent que le degré d'oligomérisation augmente en fonction de la densité des récepteurs. Dans tous les cas, l'état de stimulation des récepteurs ne semble pas intervenir dans cet équilibre (figure 1D).

L'état d'oligomérisation des RCPG prend toute son importance dans plusieurs contextes : premièrement, l'oligomère offre la possibilité du recrutement simultané de plusieurs protéines régulatrices et effectrices au sein d'un même complexe comme cela a été montré pour le récepteur de la mélatonine MT1 : celui-ci forme un complexe avec un effecteur, la protéine Gi, et un modulateur, la protéine RGS20 qui régule la vitesse d'activation et de désactivation des protéines G (Maurice *et al.*, 2010). Deuxièmement, des oligomères n'ont pas uniquement été observés pour un même RCPG (homomères), mais également entre des RCPG différents (hétéromères). Ceci revêt une importance particulière car ces hétéromères ont souvent des propriétés pharmacologiques et de signalisation bien distinctes de celles des monomères qui les constituent. Cela augmente le nombre de cibles pharmacologiques de façon considérable avec l'espoir de trouver des ligands spécifiques de ces hétéromères pour éviter, comme avec les ligands biaisés, les effets secondaires des futurs médicaments. Des tests de criblage pour identifier les ligands spécifiques d'hétéromères commencent à être mis en œuvre (van Rijn *et al.*, 2013). Finalement, l'existence d'un équilibre entre les formes mono- et dimériques des

RCPG ouvre la possibilité d'intervention pharmacologique pour empêcher la formation de ces complexes par le développement d'une nouvelle génération d'antagonistes.

Les variants de RCPG

Des mutations au niveau du gène peuvent se traduire au niveau de la protéine. L'existence de variants dans les gènes codant pour les RCPG a été reconnue très tôt, dès le clonage des premiers gènes (figure 1E). L'identification de ces variants, qui peuvent être localisés dans les différentes régions du gène, aussi bien codantes que non codantes, a été largement favorisée par les progrès technologiques récents dans le domaine du séquençage de l'ADN. Cela a permis de comparer les exomes (l'ensemble des exons d'un individu) de plusieurs milliers de personnes simultanément. Ces travaux, qui sont toujours en cours, ont confirmé la grande variabilité inter-individuelle des gènes codant pour les RCPG. Par exemple, une étude a permis de repérer 172 variants, dont 46 non synonymes, dans un échantillon de 51 RCPG analysés chez 14 000 personnes (Nelson *et al.*, 2012). La prochaine étape consistera en la caractérisation fonctionnelle de ces variants pour repérer ceux qui seraient délétères. En parallèle, des associations génétiques seront nécessaires pour établir un lien fonctionnel entre ces variants délétères et des maladies. Un tel travail a déjà été initié pour le récepteur MT₂ de la mélatonine dans le contexte du diabète de type 2 (Bonfond *et al.*, 2012; Karamitri *et al.*, 2013). Selon cette étude, l'expression des variants rares à perte de fonction du récepteur MT₂ augmente le risque de développer un diabète de type 2 d'un facteur 6. Cette association entre les variants rares et les maladies communes pourrait expliquer une part importante de l'impact génétique sur diverses pathologies.

Les récepteurs orphelins

Les RCPG orphelins sont des récepteurs dont le ligand endogène n'a pas encore été identifié. Il s'agit d'une centaine environ de récepteurs répartis dans les cinq familles de RCPG pouvant présenter une forte homologie de séquence avec d'autres récepteurs non orphelins. La recherche s'intéresse à deux aspects de ces récepteurs : d'une part leur « déorphelinisation » permettant de leur attribuer des ligands naturels ou synthétiques, et d'autre part l'identification de fonctions indépendantes du ligand.

L'identification de ligands reste un enjeu majeur car l'attribution de fonction aux RCPG passe essentiellement par l'étude de leurs propriétés pharmacologiques en appliquant différents ligands.

Plusieurs tentatives de « déorphelinisation » à haut débit ont été appliquées soit en utilisant des chimiothèques de composés synthétiques ou naturels, soit à partir d'extraits biologiques. Plusieurs méthodes de détection ont été développées comme par exemple la mesure du recrutement de différents partenaires régulateurs, tels que les protéines G, par un test de re-largage du TGF α (Inoue *et al.*, 2012), le recrutement de la β -arrestine (Oakley *et al.*, 2006; Southern *et al.*, 2013) ou l'activation de seconds messagers comme le calcium (Beets *et al.*, 2011). Grâce à ces méthodes, de nombreux neuropeptides exprimés dans le système nerveux central ont pu être identifiés comme ligands naturels de certains RCPG orphelins (Civelli, 2012, 2013).

Le deuxième axe s'intéresse à la recherche de fonctions indépendantes d'un ligand. Un premier cas de figure est basé sur la formation d'un hétéromère entre le récepteur orphelin et un récepteur non orphelin dont les fonctions sont connues. Dans ces complexes hétérodimériques, le récepteur orphelin exerce un effet régulateur sur l'activité de l'autre récepteur, comme cela a été montré pour GPR50 qui inhibe spécifiquement les fonctions du récepteur MT₁ de la mélatonine au sein de l'hétéromère (Levoye *et al.*, 2006; Levoye & Jockers, 2007). Ce même concept a été récemment étendu aux hétéromères de RCPG non orphelins : c'est le cas de l'hétéromère des récepteurs de la dopamine D2 et de la ghréline GHSR1a exprimés conjointement dans une région de l'hypothalamus où la ghréline ne peut accéder. L'étude a montré que l'association de ces récepteurs au niveau hypothalamique est indispensable pour que la dopamine exerce un effet anorexigène chez la souris (Kern *et al.*, 2012). On peut également citer l'exemple d'hétéromères entre des RCPG orphelins viraux et les récepteurs de chimiokines de la cellule hôte. La formation de ces hétéromères peut être un moyen pour le virus de détourner les fonctions de la cellule hôte à son profit, notamment la migration cellulaire dépendante des récepteurs aux chimiokines (Tadagaki *et al.*, 2012). D'autres études suggèrent que les RCPG orphelins pourraient aussi former des complexes fonctionnels avec des transporteurs, des canaux ioniques ou d'autres familles de récepteurs, ce qui élargirait considérablement le champ d'action de ces récepteurs orphelins.

De nouvelles fonctions indépendantes du ligand ont également été mises en évidence comme c'est le cas des fonctions nucléaires de la partie intracellulaire du récepteur GPR50 qui se détacherait de la partie transmembranaire à la suite d'un clivage protéolytique pour servir de co-facteur transcriptionnel dans le noyau (Li *et al.*, 2011) (figure 1C). La recherche sur les récepteurs orphelins s'emploie donc à l'identification de ligands endogènes ou de fonctions originales, soit

par association hétéromérique, soit en raison de propriétés intrinsèques du récepteur.

Les RCPG atypiques : les récepteurs d'adhérence

Les récepteurs d'adhérence constituent une des cinq familles principales de RCPG (Fredriksson *et al.*, 2003). La vingtaine de membres de cette famille comportent une imposante partie N-terminale allant de 200 à 2800 acides aminés, organisée en plusieurs domaines semblables à ceux que l'on trouve dans les protéines d'adhérence, comme le domaine de liaison à l'EGF, les domaines immunoglobulines et cadhérines (figure 1B).

La plupart de ces récepteurs sont encore orphelins, et l'identification de leurs ligands ainsi que de leurs signalisations sera un pas en avant dans la compréhension de leurs fonctions physiologiques. Plusieurs d'entre eux possèdent une activité constitutive, ce qui oriente les cribles moléculaires vers la recherche d'agonistes inverses (Gupte *et al.*, 2012).

D'autre part, comme cela a été montré pour les autres groupes de RCPG, quelques récepteurs d'adhérence sont capables de s'homodimériser et de s'hétérodimériser (Davies *et al.*, 2007). Cependant leur mode de signalisation reste largement méconnu. Quelques équipes de recherche travaillant sur ces récepteurs ont montré que GPR56, le récepteur de la latrophiline, GPR133 et GPR97 sont couplés aux protéines $G_{12/13}$, G_q , G_s , et G_o , respectivement (Gupte *et al.*, 2012). Quelques récepteurs jouent un rôle direct dans l'adhérence cellulaire comme BAI1 qui est impliqué dans des interactions cellule-cellule (Park *et al.*, 2007) et EMR2 dans des interactions cellule-matrice extracellulaire (Stacey *et al.*, 2003).

On sait par ailleurs que ces récepteurs sont spécifiquement exprimés dans certains tissus, et semblent avoir un rôle physiologique très important, notamment dans le cancer (Lin, 2012), l'immunité (Yona *et al.*, 2008) et le développement (Tissir *et al.*, 2005; Waller-Evans *et al.*, 2010). Pour ne citer qu'un exemple, la délétion du récepteur GPR56 chez l'Homme est responsable de malformations héréditaires du cortex cérébral connues sous le nom de polymicrogyrie. Cette malformation due à un trouble de la migration de progéniteurs neuroaux (Piao *et al.*, 2004) a été reproduite dans un modèle de délétion du GPR56 chez la souris (Koirala *et al.*, 2009).

Conclusion

Si le nombre important de RCPG est à la source d'une grande diversité de la réponse cellulaire aux stimuli

extérieurs, il existe cependant une grande conservation structurale et mécanistique entre les différents membres de cette famille de protéines. Les avancées majeures en termes de résolution structurale devraient nous permettre de mieux appréhender le mécanisme d'action des RCPG et d'intervenir sur ce mécanisme à des fins thérapeutiques.

Le développement de nouvelles classes de ligands comme les ligands allostériques ou les ligands spécifiques des hétérodimères ouvre des perspectives cliniques intéressantes. L'identification de composés ciblant l'interface d'oligomérisation des récepteurs ou leur association avec les protéines effectrices offre un autre champ de recherche prometteur pour le traitement de pathologies liées aux RCPG.

Remerciements. Nous remercions chaleureusement Jean-Luc Guillaume (Institut Cochin, France) pour ses commentaires sur le manuscrit. Nous tenons à remercier l'Agence Nationale de la Recherche (ANR-2011-BSV1-012-01 « MLT2D », ANR-2011-META « MELA-BETES » et ANR-12-RPIB-0016), la Fondation pour la Recherche Médicale (Equipe FRM DEQ20130326503), ARC No. SFI20121205906, les Laboratoires Servier, l'Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM) et le Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS) pour leurs soutiens financiers.

Références

- Allen L.F., Lefkowitz R.J., Caron M.G., Cotecchia S., G-protein-coupled receptor genes as protooncogenes: constitutively activating mutation of the alpha 1B-adrenergic receptor enhances mitogenesis and tumorigenicity. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1991, 88, 11354–11358.
- Archbold J.K., Flanagan J.U., Watkins H.A., Gingell J.J., Hay D.L., Structural insights into RAMP modification of secretin family G protein-coupled receptors: implications for drug development. *Trends Pharmacol Sci*, 2011, 32, 591–600.
- Audet M., Bouvier M., Restructuring G-protein-coupled receptor activation. *Cell*, 2012, 151, 14–23.
- Beets I., Lindemans M., Janssen T., Verleyen P., Deorphanizing G protein-coupled receptors by a calcium mobilization assay. *Methods Mol Biol*, 2011, 789, 377–391.
- Bonnefond A., Clément N., Fawcett K., Yengo L., Vaillant E., Guillaume J. L., Dechaume A., Payne F., Roussel R., Czernichow S., Hercberg S., Hadjadj S., Balkau B., Marre M., Lantieri O., Langenberg C., Bouatia-Naji N., Charpentier G., Vaxillaire M., Rocheleau G., Wareham N.J., Sladek R., McCarthy M.I., Dina C., Barroso I., Jockers R., Froguel P., Rare MTNR1B variants impairing melatonin receptor 1B function contribute to type 2 diabetes. *Nat Genet*, 2012, 44, 297–301.

- Calebiro D., Rieken F., Wagner J., Sungkaworn T., Zabel U., Borzi A., Cocucci E., Zurn A., Lohse M.J., Single-molecule analysis of fluorescently labeled G-protein-coupled receptors reveals complexes with distinct dynamics and organization. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2013, 110, 743–748.
- Civelli O., Orphan GPCRs and neuromodulation. *Neuron*, 2012, 76, 12–21.
- Civelli O., Reinscheid R.K., Zhang Y., Wang Z., Fredriksson R., Schiöth H.B., G protein-coupled receptor deorphanizations. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 2013, 53, 127–146.
- Costa T., Herz A., Antagonists with negative intrinsic activity at delta opioid receptors coupled to GTP-binding proteins. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1989, 86, 7321–7325.
- Davies J.Q., Chang G.W., Yona S., Gordon S., Stacey M., Lin H.H., The role of receptor oligomerization in modulating the expression and function of leukocyte adhesion-G protein-coupled receptors. *J Biol Chem*, 2007, 282, 27343–27353.
- Dixon R.A.F., Kobilka B.K., Strader D.J., Benovic J.L., Dohlman H.G., Frielle T., Bolanowski M.A., Bennett C.D., Rands E., Diehl R.E., Mumford R.A., Slater E.E., Sigal I.S., Caron M.G., Lefkowitz R.J., Strader C.D., Cloning of the gene and cDNA for mammalian β -adrenergic receptor and homology with rhodopsin. *Nature*, 1986, 321, 75–79.
- El Moustaine D., Granier S., Doumazane E., Scholler P., Rahmeh R., Bron P., Mouillac B., Banères J.L., Rondard P., Pin J.P., Distinct roles of metabotropic glutamate receptor dimerization in agonist activation and G-protein coupling. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2012, 109, 16342–16347.
- Fredriksson R., Lagerstrom M.C., Lundin L.G., Schiöth H.B., The G-protein-coupled receptors in the human genome form five main families. Phylogenetic analysis, paralogon groups, and fingerprints. *Mol Pharmacol*, 2003, 63, 1256–1272.
- Gloriam D.E., Wellendorph P., Johansen L.D., Thomsen A.R., Phonekeo K., Pedersen D.S., Brauner-Osborne H., Chemogenomic discovery of allosteric antagonists at the GPRC6A receptor. *Chem Biol*, 2011, 18, 1489–1498.
- Gupte J., Swaminath G., Danao J., Tian H., Li Y., Wu X., Signaling property study of adhesion G-protein-coupled receptors. *FEBS Lett*, 2012, 586, 1214–1219.
- Huang J., Chen S., Zhang J.J., Huang X.Y., Crystal structure of oligomeric β 1-adrenergic G protein-coupled receptors in ligand-free basal state. *Nat Struct Mol Biol*, 2013, 20, 419–425.
- Inoue A., Ishiguro J., Kitamura H., Arima N., Okutani M., Shuto A., Higashiyama S., Ohwada T., Arai H., Makide K., Aoki J., TGF α shedding assay: an accurate and versatile method for detecting GPCR activation. *Nat Methods*, 2012, 9, 1021–1029.
- Jastrzebska B., Orban T., Golczak M., Engel A., Palczewski K., Asymmetry of the rhodopsin dimer in complex with transducin. *FASEB J*, 2013, 27, 1572–1584.
- Karamitri A., Renault N., Clément N., Guillaume J.L., Jockers R., Towards the establishment of a link between melatonin and glucose homeostasis: association of melatonin MT2 receptor variants with type 2 diabetes. *Mol Endocrinol*, 2013, in press.
- Kasai R.S., Suzuki K.G., Prossnitz E.R., Koyama-Honda I., Nakada C., Fujiwara T.K., Kusumi A., Full characterization of GPCR monomer-dimer dynamic equilibrium by single molecule imaging. *J Cell Biol*, 2011, 192, 463–480.
- Kern A., Albarran-Zeckler R., Walsh H.E., Smith R.G., Apo-ghrelin receptor forms heteromers with DRD2 in hypothalamic neurons and is essential for anorexigenic effects of DRD2 agonism. *Neuron*, 2012, 73, 317–332.
- Kim Y.J., Hofmann K.P., Ernst O.P., Scheerer P., Choe H.W., Sommer M. E., Crystal structure of pre-activated arrestin p44. *Nature*, 2013, 497, 142–146.
- Kniazef J., Pin J.P., G-protein-coupled receptors dimers and oligomers: for which purpose? The GABA(B) receptor under investigation. *Med Sci (Paris)*, 2012, 28, 858–863.
- Koirala S., Jin Z., Piao X., Corfas G., GPR56-regulated granule cell adhesion is essential for rostral cerebellar development. *J Neurosci*, 2009, 29, 7439–7449.
- Koth C.M., Murray J.M., Mukund S., Madjidi A., Minn A., Clarke H.J., Wong T., Chiang V., Luis E., Estevez A., Rondon J., Zhang Y., Hotzel I., Allan B.B., Molecular basis for negative regulation of the glucagon receptor. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2012, 109, 14393–14398.
- Lagerstrom M.C., Schiöth H.B., Structural diversity of G protein-coupled receptors and significance for drug discovery. *Nat Rev Drug Discov*, 2008, 7, 339–357.
- Lefkowitz R.J., Historical review: a brief history and personal retrospective of seven-transmembrane receptors. *Trends Pharmacol Sci*, 2004, 25, 413–422.
- Levoye A., Dam J., Ayoub M.A., Guillaume J.L., Couturier C., Delagrangé P., Jockers R., The orphan GPR50 receptor specifically inhibits MT(1) melatonin receptor function through heterodimerization. *EMBO J*, 2006, 25, 3012–3023.
- Levoye A., Jockers R., GPCRs heterodimerization: a new way towards the discovery of function for the orphan receptors? *Med Sci (Paris)*, 2007, 23, 746–750.
- Li J., Hand L.E., Meng Q.J., Loudon A.S., Bechtold D.A., GPR50 interacts with TIP60 to modulate glucocorticoid receptor signalling. *PLoS One*, 2011, 6, e23725.
- Lin H.H., Adhesion family of G protein-coupled receptors and cancer. *Chang Gung Med J*, 2012, 35, 15–27.
- Liu J.J., Horst R., Katritch V., Stevens R.C., Wuthrich K., Biased signaling pathways in β 2-adrenergic receptor

- characterized by 19F-NMR. *Science*, 2012, 335, 1106–1110.
- Manglik A., Kruse A.C., Kobilka T.S., Thian F.S., Mathiesen J.M., Sunahara R.K., Pardo L., Weis W.I., Kobilka B.K., Granier S., Crystal structure of the micro-opioid receptor bound to a morphinan antagonist. *Nature*, 2012, 485, 321–326.
- Maurice P., Daulat A.M., Turecek R., Ivankova-Susankova K., Zamponi F., Kamal M., Clément N., Guillaume J.L., Bettler B., Galès C., Delagrangé P., Jockers R., Molecular organization and dynamics of the melatonin MT receptor/RGS20/G(i) protein complex reveal asymmetry of receptor dimers for RGS and G(i) coupling. *EMBO J*, 2010, 29, 3646–3659.
- Maurice P., Kamal M., Jockers R., Asymmetry of GPCR oligomers supports their functional relevance. *Trends Pharmacol Sci*, 2011, 32, 514–520.
- Milligan G., The Prevalence, Maintenance and Relevance of GPCR Oligomerization. *Mol Pharmacol*, 2013, 84, 158–169.
- Muto T., Tsuchiya D., Morikawa K., Jingami H., Structures of the extracellular regions of the group II/III metabotropic glutamate receptors. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2007, 104, 3759–3764.
- Nelson M.R., Wegmann D., Ehm M.G., Kessner D., St Jean P., Verzilli C., Shen J., Tang Z., Bacanu S.A., Fraser D., Warren L., Aponte J., Zawistowski M., Liu X., Zhang H., Zhang Y., Li J., Li Y., Li L., Woollard P., Topp S., Hall M.D., Nangle K., Wang J., Abecasis G., Cardon L.R., Zollner S., Whittaker J.C., Chissole S.L., Novembre J., Mooser V., An abundance of rare functional variants in 202 drug target genes sequenced in 14,002 people. *Science*, 2012, 337, 100–104.
- Oakley R.H., Hudson C.C., Sjaastad M.D., Loomis C.R., The ligand-independent translocation assay: an enabling technology for screening orphan G protein-coupled receptors by arrestin recruitment. *Methods Enzymol*, 2006, 414, 50–63.
- Palczewski K., Kumasaka T., Hori T., Behnke C.A., Motoshima H., Fox B.A., Le Trong I., Teller D.C., Okada T., Stenkamp R.E., Yamamoto M., Miyano M., Crystal structure of rhodopsin: A G protein-coupled receptor. *Science*, 2000, 289, 739–745.
- Park D., Tosello-Trampont A.C., Elliott M.R., Lu M., Haney L.B., Ma Z., Klibanov A.L., Mandell J.W., Ravichandran K.S., BAI1 is an engulfment receptor for apoptotic cells upstream of the ELMO/Dock180/Rac module. *Nature*, 2007, 450, 430–434.
- Piao X., Hill R.S., Bodell A., Chang B.S., Basel-Vanagaite L., Straussberg R., Dobyns W.B., Qasrawi B., Winter R.M., Innes A.M., Voit T., Ross M. E., Michaud J.L., Descarie J.C., Barkovich A.J., Walsh C.A., G protein-coupled receptor-dependent development of human frontal cortex. *Science*, 2004, 303, 2033–2036.
- Rahmeh R., Damian M., Cottet M., Orcel H., Mendre C., Durroux T., Sharma K. S., Durand G., Pucci B., Trinquet E., Zwier J.M., Deupi X., Bron P., Banères J.L., Mouillac B., Granier S., Structural insights into biased G protein-coupled receptor signaling revealed by fluorescence spectroscopy. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2012, 109, 6733–6738.
- Rasmussen S.G., Choi H.J., Rosenbaum D.M., Kobilka T.S., Thian F.S., Edwards P.C., Burghammer M., Ratnala V.R., Sanishvili R., Fischetti R.F., Schertler G.F., Weis W.I., Kobilka B.K., Crystal structure of the human beta2 adrenergic G-protein-coupled receptor. *Nature*, 2007, 450, 383–387.
- Rasmussen S.G., DeVree B.T., Zou Y., Kruse A.C., Chung K.Y., Kobilka T.S., Thian F.S., Chae P.S., Pardon E., Calinski D., Mathiesen J.M., Shah S.T., Lyons J.A., Caffrey M., Gellman S.H., Steyaert J., Skiniotis G., Weis W.I., Sunahara R.K., Kobilka B.K., Crystal structure of the beta2 adrenergic receptor-Gs protein complex. *Nature*, 2011, 477, 549–555.
- Reiter E., Ahn S., Shukla A.K., Lefkowitz R.J., Molecular mechanism of beta-arrestin-biased agonism at seven-transmembrane receptors. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 2012, 52, 179–197.
- Rosenbaum D.M., Rasmussen S.G., Kobilka B.K., The structure and function of G-protein-coupled receptors. *Nature*, 2009, 459, 356–363.
- Semple G., Skinner P.J., Gharbaoui T., Shin Y.J., Jung J.K., Cherrier M.C., Webb P.J., Tamura S.Y., Boatman P.D., Sage C.R., Schrader T.O., Chen R., Colletti S.L., Tata J.R., Waters M.G., Cheng K., Taggart A.K., Cai T.Q., Carballo-Jane E., Behan D.P., Connolly D.T., Richman J.G., 3-(1H-tetrazol-5-yl)-1,4,5,6-tetrahydro-cyclopentapyrazole (MK-0354): a partial agonist of the nicotinic acid receptor, G-protein coupled receptor 109a, with antilipolytic but no vasodilatory activity in mice. *J Med Chem*, 2008, 51, 5101–5108.
- Sheffler D.J., Gregory K.J., Rook J.M., Conn P.J., Allosteric modulation of metabotropic glutamate receptors. *Adv Pharmacol*, 2011, 62, 37–77.
- Shukla A.K., Manglik A., Kruse A.C., Xiao K., Reis R.I., Tseng W.C., Staus D.P., Hilger D., Uysal S., Huang L.Y., Paduch M., Tripathi-Shukla P., Koide A., Koide S., Weis W.I., Kossiakoff A.A., Kobilka B.K., Lefkowitz R.J., Structure of active beta-arrestin-1 bound to a G-protein-coupled receptor phosphopeptide. *Nature*, 2013, 497, 137–141.
- Sommer M.E., Hofmann K.P., Heck M., Arrestin-rhodopsin binding stoichiometry in isolated rod outer segment membranes depends on the percentage of activated receptors. *J Biol Chem*, 2011, 286, 7359–7369.
- Southern C., Cook J.M., Neetoo-Isseljee Z., Taylor D.L., Kettleborough C. A., Merritt A., Bassoni D.L., Raab W.J., Quinn E., Wehrman T.S., Davenport A.P., Brown A.J., Green A., Wigglesworth M.J., Rees S., Screening beta-Arrestin Recruitment for the Identification of Natural Ligands for Orphan

- G-Protein-Coupled Receptors. *J Biomol Screen*, 2013, 18, 599–609.
- Stacey M., Chang G.W., Davies J.Q., Kwakkenbos M.J., Sanderson R.D., Hamann J., Gordon S., Lin H.H., The epidermal growth factor-like domains of the human EMR2 receptor mediate cell attachment through chondroitin sulfate glycosaminoglycans. *Blood*, 2003, 102, 2916–2924.
- Standfuss J., Edwards P.C., D'Antona A., Fransen M., Xie G., Oprian D.D., Schertler G.F., The structural basis of agonist-induced activation in constitutively active rhodopsin. *Nature*, 2011, 471, 656–660.
- Tadagaki K., Tudor D., Gbahou F., Tschische P., Waldhoer M., Bomsel M., Jockers R., Kamal M., Human cytomegalovirus-encoded UL33 and UL78 heteromerize with host CCR5 and CXCR4 impairing their HIV coreceptor activity. *Blood*, 2012,
- Tissir F., Bar I., Jossin Y., De Backer O., Goffinet A.M., Protocadherin Celsr3 is crucial in axonal tract development. *Nat Neurosci*, 2005, 8, 451–457.
- van Rijn R.M., Harvey J.H., Brissett D.I., DeFriel J.N., Whistler J.L., Novel screening assay for the selective detection of G-protein-coupled receptor heteromer signaling. *J Pharmacol Exp Ther*, 2013, 344, 179–188.
- Wacker D., Wang C., Katritch V., Han G.W., Huang X.P., Vardy E., McCorvy J.D., Jiang Y., Chu M., Siu F.Y., Liu W., Xu H.E., Cherezov V., Roth B.L., Stevens R.C., Structural features for functional selectivity at serotonin receptors. *Science*, 2013, 340, 615–619.
- Waller-Evans H., Promel S., Langenhan T., Dixon J., Zahn D., Colledge W.H., Doran J., Carlton M.B., Davies B., Aparicio S.A., Grosse J., Russ A.P., The orphan adhesion-GPCR GPR126 is required for embryonic development in the mouse. *PLoS One*, 2010, 5, e14047.
- Walters R.W., Shukla A.K., Kovacs J.J., Violin J.D., DeWire S.M., Lam C.M., Chen J.R., Muehlbauer M.J., Whalen E.J., Lefkowitz R.J., beta-Arrestin1 mediates nicotinic acid-induced flushing, but not its antilipolytic effect, in mice. *J Clin Invest*, 2009, 119, 1312–1321.
- Wang C., Wu H., Katritch V., Han G.W., Huang X.P., Liu W., Siu F.Y., Roth B.L., Cherezov V., Stevens R.C., Structure of the human smoothened receptor bound to an antitumour agent. *Nature*, 2013, 497, 338–343.
- Warne T., Serrano-Vega M.J., Baker J.G., Moukhametzianov R., Edwards P.C., Henderson R., Leslie A.G., Tate C.G., Schertler G.F., Structure of a beta1-adrenergic G-protein-coupled receptor. *Nature*, 2008, 454, 486–491.
- Weiss D.R., Ahn S., Sassano M.F., Kleist A., Zhu X., Strachan R., Roth B.L., Lefkowitz R.J., Shoichet B.K., Conformation Guides Molecular Efficacy in Docking Screens of Activated beta-2 Adrenergic G Protein Coupled Receptor. *ACS Chem Biol*, 2013, 8, 1018–1026.
- Wu B., Chien E.Y., Mol C.D., Fenalti G., Liu W., Katritch V., Abagyan R., Brooun A., Wells P., Bi F.C., Hamel D.J., Kuhn P., Handel T.M., Cherezov V., Stevens R.C., Structures of the CXCR4 chemokine GPCR with small-molecule and cyclic peptide antagonists. *Science*, 2010, 330, 1066–1071.
- Wu H., Wacker D., Mileni M., Katritch V., Han G.W., Vardy E., Liu W., Thompson A.A., Huang X.P., Carroll F.I., Mascarella S.W., Westkaemper R.B., Mosier P.D., Roth B.L., Cherezov V., Stevens R.C., Structure of the human kappa-opioid receptor in complex with JD(Tic). *Nature*, 2012, 485, 327–332.
- Yona S., Lin H.H., Siu W.O., Gordon S., Stacey M., Adhesion-GPCRs: emerging roles for novel receptors. *Trends Biochem Sci*, 2008, 33, 491–500.