

## De nouvelles fonctions pour l'AMP cyclique

L'AMP cyclique, second messenger de l'action, des hormones intracellulaire, contrôle aussi l'activité de certains gènes.

**Arnold Munnich**

*Chargé de Recherches à l'Inserm.*

**Sophie Vaulont**

*Boursière du ministère de la Recherche et de la Technologie.*

**Jöelle Marie**

*Chargée de Recherches à l'Inserm.*

**D**epuis les travaux pionniers de Sutherland (qui valurent à ce chercheur de recevoir le prix Nobel), on sait que l'adénosine 3'-5' monophosphate (AMPc) est le second messenger de l'action des hormones polypeptidiques chez les organismes supérieurs, mais aussi un effecteur essentiel du fonctionnement cellulaire chez tous les êtres vivants, de l'organisme unicellulaire le plus élémentaire, nucléé ou non (levure, protiste, bactérie) à l'eucaryote le plus complexe.

Chez ces derniers, l'AMPc agit par l'intermédiaire de protéines kinases AMPc dépendantes, dont il démasque l'activité phosphorylante. Les protéines kinases ainsi activées accroissent le niveau de phosphorylation des protéines et donc modulent — en plus ou en moins — l'activité de nombreuses enzymes impliquées dans le métabolisme cellulaire. De cette cascade d'événements résulte l'ouverture ou la fermeture de grandes voies métaboliques, telles celles du glycogène hépatique chez les mammifères, qui servit de modèle à Sutherland.

Jusqu'à une date récente, on ne connaissait à l'AMPc que ce mode d'action « post-traductionnel ». On sait maintenant que le champ d'action de l'AMPc est considérablement plus large. En plus de ses effets post-traductionnels, l'AMPc exerce un contrôle extrêmement puissant sur le pool des ARN messagers codant pour les protéines qu'il contrôle. Cette régulation pré-traductionnelle se situe à un niveau transcriptionnel : l'AMPc contrôle en effet le taux de transcription de nombreux gènes eucaryotes supérieurs. Il accroît le taux

de transcription de certains gènes, réduit le niveau de transcription d'autres gènes. L'AMPc est donc capable d'exercer un contrôle intégré, transcriptionnel et post-traductionnel, de l'expression des gènes. On ne lui connaît pas à ce jour d'effet post-traductionnel sur le devenir des transcrits (maturation et stabilité des ARN).

L'AMPc apparaît ainsi comme un régulateur majeur de l'expression des gènes, capable de contrôler à la fois leur transcription et l'activité des protéines pour lesquelles ils codent. Comme on le verra, un tel contrôle intégré permet l'activation ou le verrouillage de la synthèse des protéines impliquées dans de nombreuses voies métaboliques. Mais reprenons un peu la longue histoire de l'AMPc.

### AMP cyclique et activité enzymatique

Les travaux de Sutherland ont permis d'identifier l'AMPc comme le second messenger de l'action de nombreuses hormones (1). Le premier messenger est l'hormone elle-même. Les cellules « cibles » sont des cellules qui possèdent dans leur membrane plasmique des récepteurs pour cette hormone. La liaison de l'hormone avec son récepteur spécifique conduit à l'activation de l'adénylate cyclase qui est, elle aussi, liée à la membrane. Cette activation n'est pas directe, elle est transmise par une protéine régulatrice liant le GTP, la protéine G.

(1) Glucagon, adrénaline, calcitonine, HCG, ACTH, FSH, LH, MSH, TSH, parathormone, vasopressine, VIP.

#### RÉFÉRENCE.

1. Krebs EG, Beavo JA. Phosphorylation-dephosphorylation of enzymes. *Annu Rev Biochem* 1979;48: 923-59.

#### ADRESSE

A. Munnich, S. Vaulont, J. Marie : Unité de génétique et de pathologie moléculaires. Inserm (U 129). CHU Cochin-Port-Royal, 24, rue du Faubourg-Saint-Jacques, 75014 Paris.

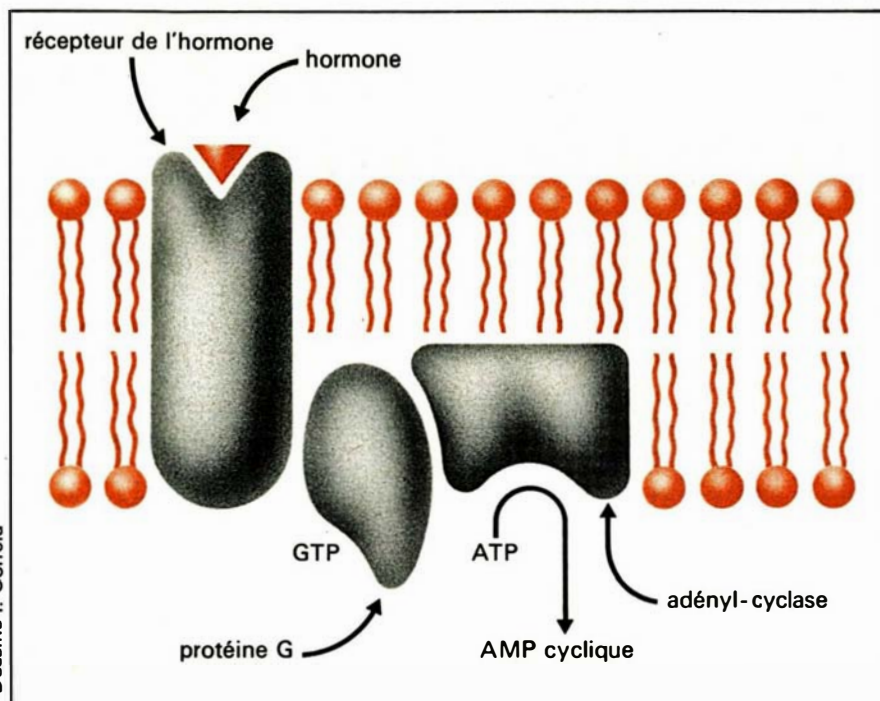


Figure 1. *Transmission du signal hormonal, activation de l'adényl-cyclase, et production de l'AMP cyclique.*

La protéine G est une protéine régulatrice liant le GTP. Elle joue un rôle essentiel tant dans l'activation que dans l'inactivation de l'adényl-cyclase.

L'AMPc est alors formé à partir de l'ATP (figure 1). Ainsi, l'hormone n'a pas à pénétrer dans la cellule pour jouer son rôle biologique.

Mais comment l'AMPc exerce-t-il ses effets? Il est frappant de constater que le mécanisme d'action de l'AMPc est commun à tous les organismes eucaryotes et apparaît fidèlement conservé lors de l'évolution. L'AMPc active une protéine kinase capable de phosphoryler des protéines. Dans le cas du métabolisme hépatique, la protéine kinase AMPc dépendante phosphoryle aussi bien les enzymes de la glycolyse et de la glycogénosynthèse (qu'elle inactive) que celles de la glycogénolyse et de la néoglucogenèse (qu'elle active). Il en résulte un effet biologique intégré en réponse au glucagon (via l'AMPc) lors du jeûne : mobilisation du glycogène hépatique et inhibition de sa synthèse, épargne et production de glucose par le foie pour les organes périphériques.

Le mécanisme d'activation de la protéine kinase par l'AMPc est maintenant bien connu. Cette enzyme est constituée de deux types

de sous-unités, des sous-unités régulatrices de 49 à 52 kdal qui peuvent se lier à l'AMPc, et des sous-unités catalytiques de 38 kdal. En l'absence d'AMPc, les sous-unités régulatrices et catalytiques, forment un complexe R2C2, dépourvu d'activité enzymatique. La liaison de l'AMPc aux sous-unités régulatrices conduit à la dissociation du complexe R2C2 en un dimère R2 lié à 4 molécules d'AMPc et en 2 sous-unités C. Ces sous-unités catalytiques libres sont alors douées d'activité enzymatique [1]. Ainsi, la liaison de l'AMPc aux sous-unités régulatrices lève l'inhibition que ces dernières exerçaient sur les sous-unités catalytiques (figure 2).

### AMP cyclique chez les bactéries

On vient de voir comment l'AMPc stimule ou inhibe l'activité des enzymes impliquées dans le métabolisme du glycogène par des modifications post-traductionnelles de ces enzymes. Si les chercheurs ont été mis sur la voie d'autres niveaux

de régulation par l'AMPc, le mérite en revient aux microbiologistes. Ceux-ci savent depuis quelques années déjà que l'AMPc, produit par les bactéries lorsqu'elles sont privées de glucose, est capable de stimuler la transcription de certains gènes qui concourent à l'exploitation d'autres sources d'énergie [2]. Dans ce cas, l'activation de la transcription du génome bactérien par l'AMPc n'est pas médiée par une protéine kinase AMPc dépendante : chez la bactérie en effet, l'AMPc synthétisé en l'absence de glucose se lie à la CAP (*Catabolite Gene Activating Protein*) ou CRP (*cAMP Receptor Protein*) qui est une protéine dimérique (sous-unité = 22 kdal). Le complexe CAP-AMPc (mais pas la CAP seule) stimule la transcription en se liant à une séquence (contenant notamment l'élément TGTGA) située en amont du promoteur qui contrôle l'expression de l'opéron catabolique. En outre, une mutation dans la séquence consensus TGTGA ou dans les gènes qui codent pour l'adénylate cyclase ou le CRP effondre la transcription du gène catabolique en l'absence de glucose [2].

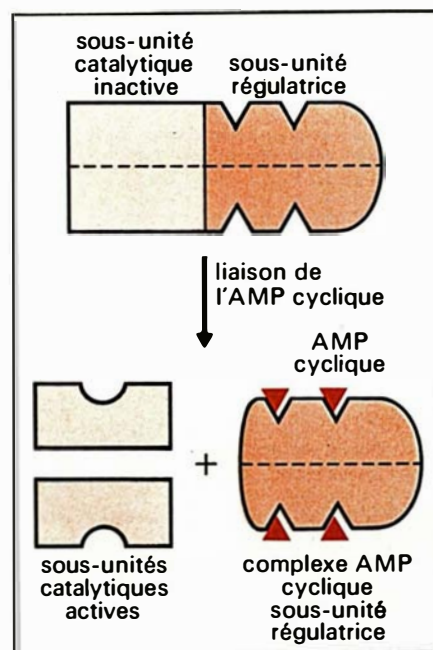


Figure 2. *Activation des protéines kinases AMPc dépendantes par l'AMP cyclique.*

L'AMP cyclique active les protéines kinases en dissociant le complexe des sous-unités régulatrices et catalytiques.



## RÉFÉRENCES

2. De Crombrughe B, Busby S, Buc H. Cyclic AMP receptor protein: role in transcription activation. *Science* 1984; 224: 831-8.
3. Robertson ADJ, Grutsch JF. Agregation in dictyostelium discoideum. *Cell* 1981; 24: 603-11.
4. Thorner J. An essential role for cyclic AMP in growth control: the case for yeast. *Cell* 1982; 30: 5-6.
5. Gottesman MM. Genetic approaches to cyclic AMP effects in cultured mammalian cells. *Cell* 1980; 22: 329-30.
6. Williams JG, Tsang AS, Mahbubani H. A change in the rate of transcription of an eukaryotic gene in response to cyclic AMP. *Proc Natl Acad Sci USA* 1980; 77: 7171-5.
7. Sasaki K, Cripe TP, Koch SR, et al. Multi-hormonal regulation of phosphoenolpyruvate carboxykinase gene transcription. *J Biol Chem* 1984; 259: 15242-51.
8. Munnich A, Marie J, Reach G, et al. In vivo hormonal control of L-type pyruvate kinase gene expression. *J Biol Chem* 1984; 259: 10228-31.
9. Vaulont S, Munnich A, Marie J, et al. Cyclic AMP as a transcriptional inhibitor of upper eukaryotic gene expression. *Biochem Biophys Res Commun* 1984; 125: 135-41.
10. Tuil D, Vaulont S, Levin MJ, et al. In vivo control of rat transferrin gene expression. *Biochem J* 1985; sous presse.
11. Goueli SA, Ahmed K. Nuclear matrix as acceptor for cAMP binding proteins. *Biochem Biophys Res Commun* 1982; 109: 1083-8.
12. Weber IT, Takio K, Tilani K, et al. The cAMP binding domains of the regulatory subunit of cAMP-dependent protein kinase and the catabolic gene activator protein are homologous. *Proc Natl Acad Sci USA* 1982; 79: 7679-83.
13. Murdoch GH, Rosenfeld MJ, Evans RM. Eukaryotic transcriptional regulation and chromatin associated protein phosphorylation by cyclic AMP. *Science* 1982; 218, 1315-7.

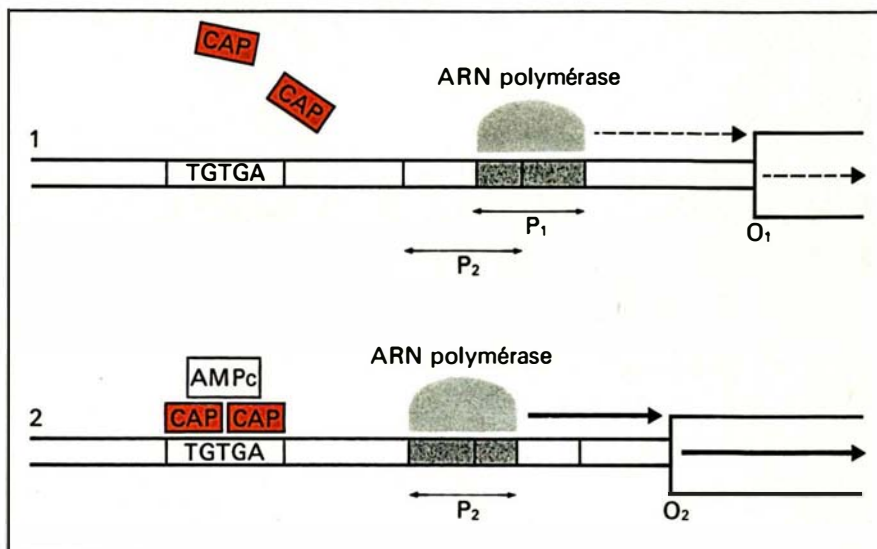


Figure 3. Induction de la transcription de l'opéron Lactose par l'AMP cyclique. L'opéron Lac possède deux promoteurs :

P<sub>1</sub> est un promoteur faible et de médiocre affinité pour l'ARN polymérase. Il initie faiblement la transcription en O<sub>1</sub>.

P<sub>2</sub> est un promoteur fort dont l'affinité pour l'ARN polymérase est accrue en présence du complexe CAP-AMPc. Il initie très fortement la transcription de l'opéron en O<sub>2</sub>, 22 bases en amont de O<sub>1</sub>.

P<sub>1</sub> et P<sub>2</sub> sont partiellement chevauchants, de sorte que la liaison de l'ARN polymérase en P<sub>2</sub> bloque l'accès de l'enzyme au promoteur faible P<sub>1</sub>.

En 1 : la bactérie dispose de glucose. Il n'y a pas d'AMPc donc pas de complexe CAP-AMPc. Il en résulte une médiocre affinité de l'ARN polymérase pour P<sub>2</sub>, une liaison de l'enzyme au promoteur faible et une faible transcription de l'opéron Lac.

En 2 : la bactérie a besoin de glucose. L'AMPc est produit, le complexe CAP-AMPc se forme : il favorise la liaison de l'ARN polymérase en P<sub>2</sub> et donc un niveau élevé de transcription de l'opéron Lac.

On pense maintenant que la séquence consensus TGTGA est le site de liaison d'une des sous-unités de la CAP à l'ADN, la seconde sous-unité reconnaissant une autre séquence située 6 bases plus loin, tantôt symétrique, tantôt très différente de la première. La distance qui sépare la séquence consensus TGTGA du site d'initiation de la transcription est très variable d'un opéron catabolique à l'autre. Dans le cas des opérons inductibles par l'AMPc, la séquence consensus est trouvée loin en amont du site d'initiation de la transcription (entre -100 et -60). La liaison de l'ARN polymérase au promoteur, très faible en l'absence d'AMPc, est considérablement accrue en présence du complexe CAP-AMPc. La transcription est alors initiée et le gène prend une configuration dite ouverte. La liaison du complexe CAP-AMPc à l'ADN ne conduit pas à un déroulement de l'ADN ni

à un démasquage des sites cryptiques mais permet la formation d'un complexe stable et hautement affine de l'ARN polymérase avec le promoteur bactérien le plus puissant. La figure 3 illustre le modèle retenu pour l'induction de l'opéron Lac par l'AMPc.

Cependant le modèle d'activation transcriptionnelle par l'AMPc doit prendre en compte le fait qu'on ne trouve pas dans les promoteurs des opérons inductibles par l'AMPc la *Pribnow Box*, homologue de la séquence consensus TATA des eucaryotes (voir médecine/sciences, 1985; 1: 48). Ces faits, joints à la découverte de remarquables interactions protéine-protéine entre le complexe CAP-AMPc et l'ARN polymérase, donnent à penser que ce complexe, une fois fixé sur le gène, fournit lui-même les sites nécessaires à l'interaction de l'ARN polymérase avec l'ADN donc à l'initiation de la transcription [2].

En plus de son rôle d'inducteur, le complexe CAP-AMPc permettrait ainsi la liaison de l'ARN polymérase au gène dont il induit la transcription. Il pallierait donc l'absence de *Pribnow Box* dans les opérons inductibles par l'AMPc.

Ainsi l'AMPc active la transcription des opérons inductibles en majorant la liaison du complexe CAP-AMPc au promoteur le plus puissant, en excluant les promoteurs compétitifs moins puissants et en favorisant l'interaction entre l'ARN polymérase et le gène à transcrire.

Bien que la fonction principale du complexe CAP-AMPc soit d'activer la transcription, il arrive qu'il réprime l'expression de certains gènes. Dans le cas de l'opéron Gal (qui comporte deux promoteurs P1 et P2), le complexe CAP-AMPc active le promoteur P1 mais inhibe le promoteur P2. Dans la mesure où la liaison du complexe CAP-AMPc s'effectue non pas en amont (comme pour l'opéron Lac) mais au sein même du promoteur P2 (-35), il est vraisemblable que le complexe inhibe la transcription en interdisant à la polymérase l'accès au site promoteur P2.

### **Dictyostelium discoideum**

L'AMPc joue un rôle crucial dans la différenciation d'un eucaryote inférieur, l'amibe *Dictyostelium discoideum* : le cycle de développement de cet organisme comporte une phase végétative unicellulaire et une phase pluricellulaire induite par la carence alimentaire. Les amibes carencées synthétisent et excrètent de l'AMPc qui constitue un agent attracteur et permet l'agrégation des cellules par un mécanisme complexe où réception du signal d'AMPc, relais de ce signal vers d'autres cellules et réponse chimiotactique sont étroitement couplés [3]. L'établissement de contacts entre cellules, au sein de l'agrégat, déclenche la phase de différenciation terminale pendant laquelle des cellules dites « préteiges » et « présportes » s'organisent pour former un sporophore constitué d'une tige supportant un sac de spores (*figure 4*). L'intérêt de cet organisme réside dans le fait qu'il s'agit d'un système simple, se

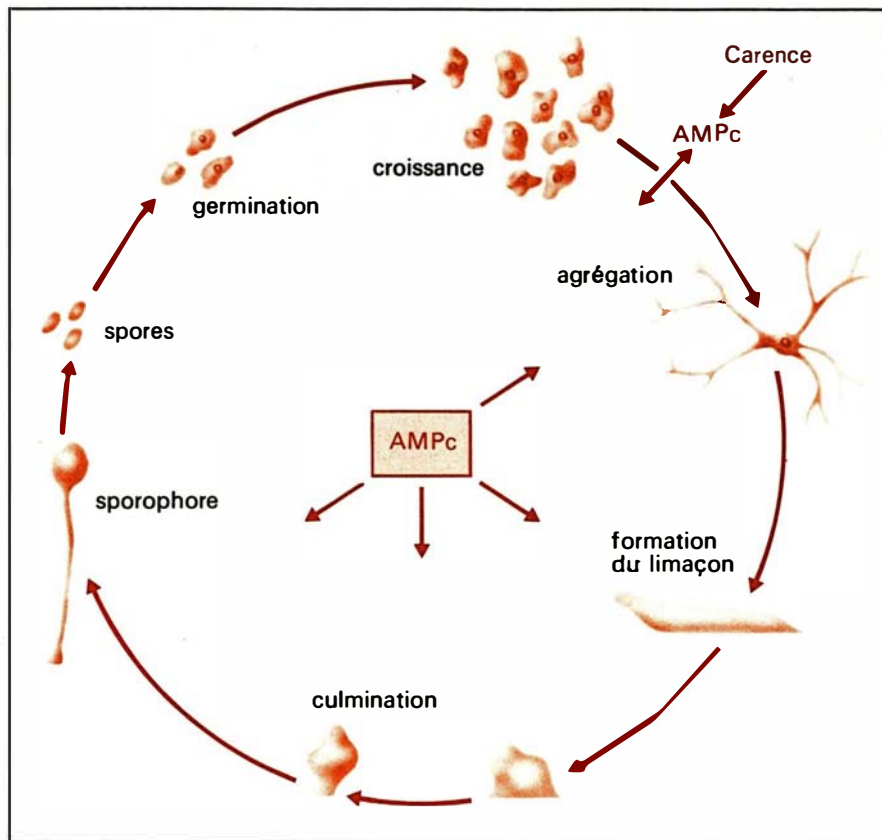


Figure 4. Le cycle de *Dictyostelium discoideum*.

La carence alimentaire induit la synthèse et l'excrétion d'AMPc par l'amibe. L'AMPc intervient à tous les stades de la phase pluricellulaire : agrégation, formation du limaçon, culmination, constitution du sporophore.

différenciant de façon synchrone en deux types cellulaires seulement en réponse à l'AMPc. Outre sa fonction d'agent chimiotactique extracellulaire, l'AMPc joue également un rôle d'effecteur de la différenciation chez *D. discoideum* comme chez d'autres eucaryotes supérieurs et inférieurs [4, 5]. L'action de l'AMPc sur la différenciation de l'amibe *D. discoideum* est associée à une modification de l'expression des gènes. En effet, l'AMPc est capable d'induire mais aussi de réprimer la transcription de plusieurs gènes comme celui de la discoidine I, qui est une lectine impliquée dans les interactions cellulaires de l'amibe [6]. Cette découverte, qui date de 1980, est d'importance : elle constitue la première démonstration d'une régulation transcriptionnelle par l'AMPc dans un organisme eucaryote. Très vite de nombreux autres gènes eucaryotes, supérieurs cette fois, allaient suivre.

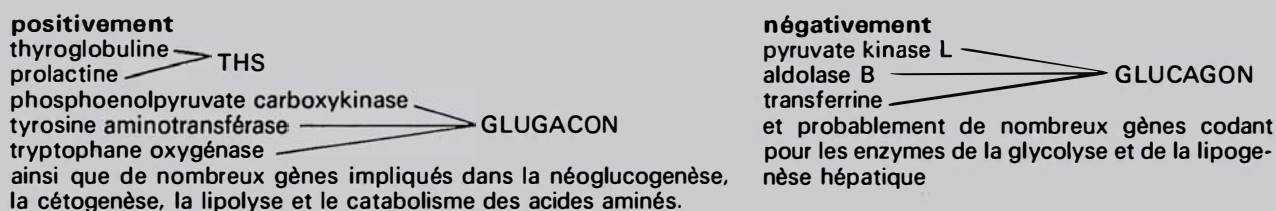
L'inhibition transcriptionnelle de l'expression du gène de discoidine marque un véritable tournant dans l'histoire de l'AMPc et fait rebondir l'intérêt que suscite le second messager depuis vingt ans déjà.

### **Régulateur transcriptionnel des mammifères**

Depuis quelques mois en effet, la liste des ARNm inductibles par l'AMPc chez les mammifères augmente régulièrement (*tableau I, p. suivante*). Dans un certain nombre de cas, on a pu démontrer, par des expériences de transcription in vitro sur noyaux isolés, que l'augmentation du pool d'ARNm résultait d'une augmentation du taux de transcription de leur gène : phosphoenolpyruvate carboxykinase [7], tyrosine aminotransférase, prolactine, thyroglobuline. A ce jour, aucune étude directe n'a permis de mettre en évidence un



Tableau I

L'AMP CYCLIQUE RÈGLE LA TRANSCRIPTION  
DE NOMBREUX GÈNES DES MAMMIFÈRES

éventuel effet post-transcriptionnel de l'AMPc sur la maturation des transcrits ou la stabilité des ARNm matures.

Tout récemment, nous avons pu montrer que l'AMPc n'est pas seulement un activateur mais aussi un inhibiteur de la transcription du génome eucaryote. L'AMPc est en effet capable de bloquer rapidement et énergiquement la transcription des gènes codant pour les enzymes de la glycolyse [8, 9] et de la transferrine [10]. Il s'agit là des premiers exemples d'inhibition transcriptionnelle du génome des eucaryotes par l'AMPc. Avec ces découvertes, il est clair que ce sont les mécanismes d'action des hormones polypeptidiques et les bases moléculaires du métabolisme intermédiaire qui sont approchés de près. Pour illustrer cette réalité, prenons l'exemple de la régulation à court terme du métabolisme des sucres chez l'animal et chez l'homme.

La régulation à court terme du métabolisme des sucres est sous le contrôle de deux hormones antagonistes : l'insuline et le glucagon. A jeun, la disponibilité constante du glucose pour le cerveau et les organes périphériques dépend à la fois de la baisse de l'insulino-sécrétion et de la production de glucose par le foie. Cette production de glucose est sous le contrôle du glucagon qui stimule la glycogénolyse et la néoglucogenèse. Ces actions cataboliques du glucagon sont modulées à chaque instant par l'action anticatabolique de l'insuline. Dans l'intervalle des repas, la production de glucagon doit surpasser celle d'insuline, qui s'annule de manière à faire face aux besoins périphériques de l'organisme en

glucose. Pendant les repas, la production de glucagon dépend de la quantité de sucre consommée. Plus elle est élevée, plus l'insulinosécrétion est forte et plus la sécrétion de glucagon est faible.

Pourquoi ce rappel physiologique? C'est qu'il existe à l'état de jeûne comme à l'état nourri par les sucres une corrélation inverse entre le taux de transcription des gènes qui codent pour les enzymes de la glycolyse et ceux qui codent pour les enzymes de la néoglucogenèse. Dans toutes les situations métaboliques qui augmentent la sécrétion de glucagon (jeûne, régime riche en protéines, diabète insulino-prive), on observe un effondrement des messagers codant pour les enzymes de la glycolyse et une montée en flèche des messagers qui codent pour les enzymes de la néoglucogenèse. A l'inverse, lorsque la glucagonosécrétion est tarie, on observe une montée en flèche des messagers codant pour les enzymes de la glycolyse et un effondrement de la transcription du gène de phosphoenol pyruvate carboxykinase [7, 9].

L'AMPc apparaît ainsi comme un régulateur majeur de l'expression génétique des eucaryotes supérieurs. Il exerce une action intégrée au double niveau transcriptionnel et post-traductionnel puisqu'il conduit à une modification, en plus ou en moins, du taux de transcription des gènes et à une phosphorylation des protéines matures. Il en résulte un accroissement de la néoglucogenèse et une inhibition de la glycolyse hépatique lors du jeûne.

Les mécanismes moléculaires intimes qui concourent à l'activation ou à l'inhibition de la transcription du génome des mammifères par l'AMPc en réponse aux hormones

polypeptidiques ne sont pas encore élucidés. Deux hypothèses principales ont été proposées pour expliquer l'action de l'AMPc sur le génome eucaryote. Un mécanisme voisin de celui décrit chez les procaryotes pourrait exister dans les cellules eucaryotes, à savoir la formation d'un complexe AMPc-protéine réceptrice spécifique qui agirait par interaction directe avec des zones régulatrices du génome. Il existe en effet des protéines nucléaires fixant spécifiquement l'AMPc [11]. De surcroît, la sous-unité régulatrice R2 des protéines kinases stimulées par l'AMPc possède une certaine analogie de structure avec la protéine CAP des procaryotes [12]. Ce modèle « CAP » rappelle le mode d'action génétique d'une autre classe d'hormones, les hormones glucocorticoïdes, qui se lient à un récepteur cytosolique spécifique pour former un complexe hormone-récepteur. Ce complexe est transloqué dans le noyau où il va activer ou réprimer la transcription du génome en se liant à une séquence consensus spécifique (figure 5).

En fait, les résultats les plus récents et les plus convaincants plaident plutôt en faveur d'un effet de l'AMPc via l'activation d'une protéine kinase nucléaire qui pourrait phosphoryler un facteur d'initiation de la transcription ou une protéine chromatinienne jouant un rôle dans l'accessibilité de l'ARN polymérase au promoteur (fig. 5) [13].

Les travaux en cours fourniront probablement des éléments de réponse à cette question, mais il y a gros à parier que l'AMP cyclique n'a pas encore livré tous ses secrets et que la saga du second messager n'a pas fini d'être écrite... ■

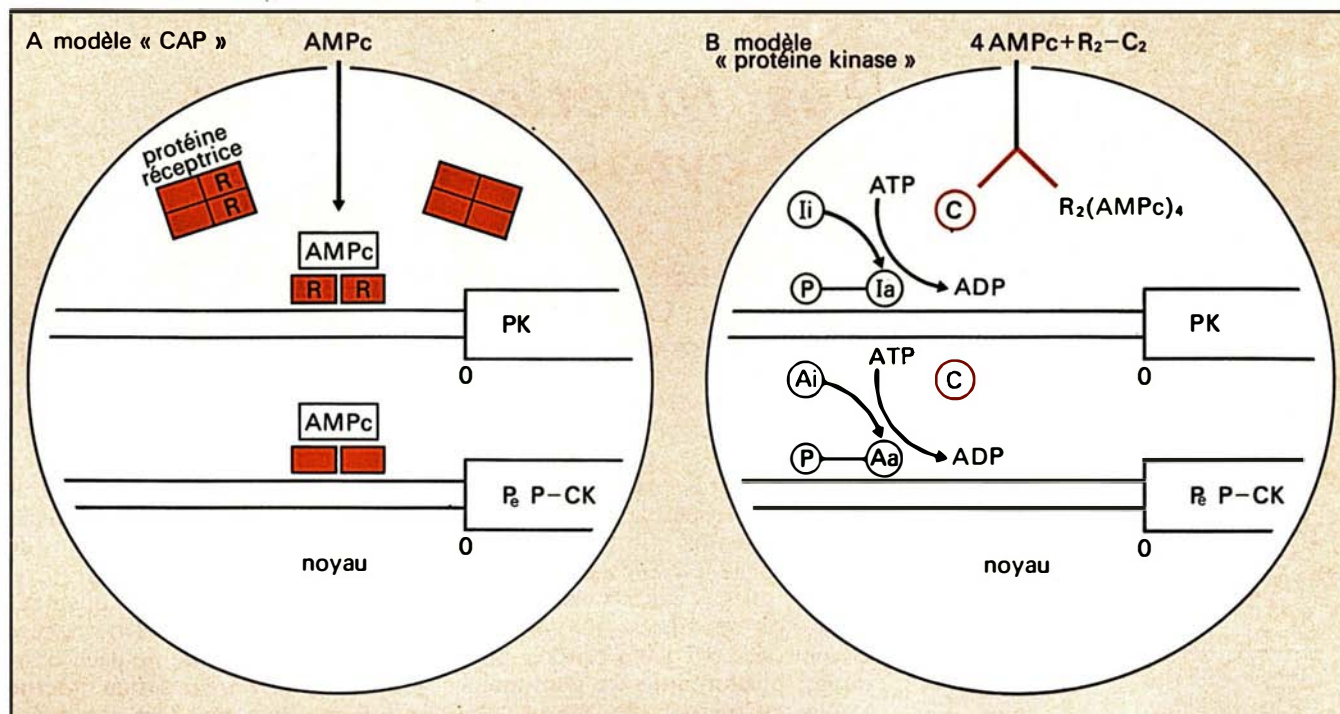


Figure 5. Modes d'actions possibles de l'AMP cyclique sur le génome des mammifères.

(A) Modèle CAP : une protéine réceptrice spécifique, comparable à la protéine CAP des procaryotes, lie l'AMPc, second messenger du glucagon. Le complexe AMPc-protéine réceptrice constitué dans le cytoplasme ou dans le noyau des hépatocytes à jeun, vient interagir avec des zones régulatrices du génome. Il en résulte une activation (phosphoenolpyruvate carboxykinase) ou une inhibition (pyruvate kinase) de la transcription de ces gènes.

(B) Modèle protéine kinase : la sous-unité catalytique d'une protéine kinase AMPc-dépendante vient phosphoryler un inhibiteur (I) et un activateur (A) transcriptionnels inactifs (i) qui se trouvent activés (a). L'inhibiteur (Ia) et l'activateur (Aa) ainsi phosphorylés sont capables d'augmenter (phosphoenolpyruvate carboxykinase) ou de réprimer (pyruvate kinase) la transcription de ces gènes.

La sous-unité catalytique peut provenir d'une protéine kinase nucléaire. Elle peut aussi provenir d'une protéine kinase AMPc dépendante cytoplasmique dont la sous-unité C a transloqué dans le noyau.

## Summary

Although cAMP has well-defined effects on gene transcription in procaryotic cells, until very recently, the effect of this intracellular mediator on eukaryotic proteins was thought to be exerted at the post-translational level. Cyclic AMP has now been shown to regulate the mRNAs that code for several eukaryotic proteins at the transcriptional level. Cyclic AMP proves to be not only an activator but also an inhibitor of gene transcription in eukaryotes. Its effects on carbohydrate-metabolizing enzymes can be regarded as an integrated regulation at both the transcriptional and the post-translational level, since it both promotes protein phosphorylation and modifies the synthesis of the enzymes, so as to enhance the neoglucogenic pathway and block the glycolytic pathway in the liver.

## TIRÉS A PART

A. Munnich : Unité de génétique et de pathologie moléculaires. Inserm (U 129). CHU Cochin-Port-Royal, 24, rue du Faubourg-Saint-Jacques, 75014 Paris.