

## La peptidylglycine $\alpha$ -amidating monooxygénase (PAM), une enzyme bifonctionnelle catalysant l' $\alpha$ -amidation de peptides

Au cours de leur biosynthèse, les peptides biologiquement actifs (neuropeptides et hormones) subissent plusieurs modifications post-traductionnelles. Un grand nombre de ces peptides sont amidés en position COOH-terminale et cette fonction amide est essentielle à leur activité biologique. La *peptidylglycine  $\alpha$ -amidating monooxygenase* (PAM ; EC 1.14.17.3) est l'enzyme catalysant la réaction d' $\alpha$ -amidation de ces peptides. Il s'agit d'une réaction à deux étapes dont chacune est catalysée par un domaine différent de l'enzyme bifonctionnelle. Un seul gène complexe code pour la PAM, mais des phénomènes d'épissage alternatif, soumis à une régulation au cours du développement et présentant une spécificité cellulaire, engendrent plusieurs formes d'ARNm codant pour les différentes formes protéiques de l'enzyme. La présence d'une grande quantité de PAM dans les oreillettes cardiaques qui ne produisent pas de peptides  $\alpha$ -amidés connus suggère, soit que cette enzyme intervient dans d'autres réactions que l' $\alpha$ -amidation de peptides sécrétés, soit que ces peptides produits par le cœur sont restés pour l'instant indétectables.

L'Houcine Ouafik  
Pierre Giraud  
Paul Salers  
Charles Oliver

### ADRESSE

L. Ouafik : chargé de Recherche à l'Inserm.  
P. Giraud : chargé de Recherche à l'Inserm.  
P. Salers : Ingénieur Inserm. Ch. Oliver : professeur, directeur de l'Inserm.  
Laboratoire de neuroendocrinologie expérimentale, faculté de médecine nord, Inserm U. 297, boulevard P.-Dramard, 13326 Marseille, France.

m/s n° 9, vol. 7, novembre 91

**P**lus de la moitié des peptides biologiquement actifs synthétisés dans les tissus nerveux et endocrines comportent une fonction amide NH<sub>2</sub> en position COOH-terminale (Tableau I, p. 927). La présence de cette fonction amide est indispensable à l'activité biologique de la plupart de ces peptides. Le plus souvent, l'acide aminé amidé est neutre ; cependant, tous les acides aminés à l'exception de l'acide aspartique peuvent être amidés et ainsi présents en position COOH-

terminale d'une séquence peptidique [1].

Ces peptides sont synthétisés à partir de précurseurs de poids moléculaire élevé qui subissent une maturation au cours de leur transfert à travers le système membranaire de la cellule, depuis le réticulum endoplasmique jusqu'aux granules de sécrétion. La maturation des précurseurs comporte l'action d'endoprotéases clivant entre deux acides aminés basiques, puis d'exoprotéases (aminopeptidases et/ou carboxypeptidases) et enfin l'action d'autres activités enzy-

## RÉFÉRENCES

- Eipper BA, Mains RE. Peptide  $\alpha$ -amidation. *Ann Rev Physiol* 1988 ; 50 : 333-44.
- Tatemoto K, Mutt V. Chemical determination of polypeptide hormone. *Proc Natl Acad Sci USA* 1978 ; 75 : 4115-9.
- Bradbury AF, Finnie MDA, Smyth DG. Mechanism of C-terminal amide formation by pituitary enzymes. *Nature* 1982 ; 298 : 686-8.
- Mains RE, Dickerson IM, May V, *et al.* Cellular and molecular aspects of peptide hormone biosynthesis. *Frontiers in Neuroendocrinology* 1990 ; 11 : 52-89.
- Stewart LC, Klinman JP. Dopamine beta-hydroxylase of adrenal chromaffin granules : structure and function. *Ann Rev Biochem* 1988 ; 57 : 551-92.
- Braas KM, Stoffers DA, Eipper BA, May V. Tissue specific expression of rat peptidylglycine  $\alpha$ -amidating monooxygenase activity and mRNA. *Mol Endocrinol* 1989 ; 3 : 1387-98.
- Sakata J, Mizuna K, Matsuo H. Tissue distribution and characterization of peptide C-terminal  $\alpha$ -amidating activity in rat. *Biochem Biophys Res Commun* 1986 ; 140 : 230-6.
- Noguchi M, Takahashi K, Okamoto H. Rat peptidylglycine  $\alpha$ -amidating enzyme : the relation between activities at neutral and alkaline pH values. *Arch Biochem Biophys* 1989 ; 275 : 505-13.
- Takahashi K, Okamoto H, Scino H, Noguchi M. Peptidylglycine  $\alpha$ -amidating reaction : evidence for a two-step mechanism involving a stable intermediate at neutral pH. *Biochem Biophys Res Commun* 1990 ; 169 : 524-30.
- Tajima M, Lida T, Yoshida S, *et al.* The reaction product of peptidylglycine  $\alpha$ -amidating enzyme is a hydroxyl derivative at  $\alpha$ -carbon of the carboxyl-terminal glycine. *J Biol Chem* 1990 ; 265 : 9602-5.
- Young SD, Tamburini PP. Enzymatic peptidyl  $\alpha$ -amidating proceeds through formation of an  $\alpha$ -hydroxyglycine intermediate. *J Am Chem Soc* 1989 ; 111 : 1933-4.

\* Pancréastatine : peptide pancréatique (49 a.a.) inhibant la sécrétion d'insuline - PHI : peptide digestif (27 a.a.) structurellement et physiologiquement apparenté au vasoactive intestinal peptide (VIP) - PYY : peptide intestinal (36 a.a.) apparenté au polypeptide pancréatique (PP) et inhibant la sécrétion de sécrétine et de cholecystokinine - NPY : peptide cérébral et digestif (36 a.a.) appartenant à la famille du PP ayant des actions vasoconstrictives et de nombreuses actions cérébrales - galanine : peptide répandu dans les systèmes nerveux central et périphérique ainsi que le tractus digestif (29 a.a.) - neuropeptide K : précurseur de la substance K, possédant une activité pharmacologique de type tachykinine.

matiques non protéolytiques (pyroglutamate synthétase, acétyl transférase, sulfo-transférase, phosphorylase, enzyme d'amidation...). La réaction d'amidation intervient donc après les processus de maturation du précurseur par des endoprotéases et des exoprotéases. Les précurseurs immédiats des peptides amidés se terminant par la séquence X-NH<sub>2</sub> possèdent la séquence X-Gly. La présence du résidu Gly en position COOH-terminale par rapport à l'acide aminé (X) à amidier est indispensable. Le schéma de la maturation de la thyrotropin-releasing hormone (TRH), tripeptide amidé, est présenté dans la figure 1. La mise au point d'une méthode de dosage chimique des peptides se terminant par un résidu

amidé [2] a permis la découverte de plusieurs de ces peptides dont nombre possèdent d'importantes activités biologiques, essentiellement au niveau des tissus nerveux et endocrines. Ainsi, la pancréastatine, le peptide histidine isoleucine (PHI), le peptide tyrosine tyrosine (PYY), le neuropeptide Y (NPY), la galanine et le neuropeptide K ont été découverts de cette façon\*.

### Caractérisation et mécanismes d'action du système enzymatique d'amidation

L'activité enzymatique d'amidation a été initialement décrite par Bradbury *et al.* en 1982 sur des préparations de

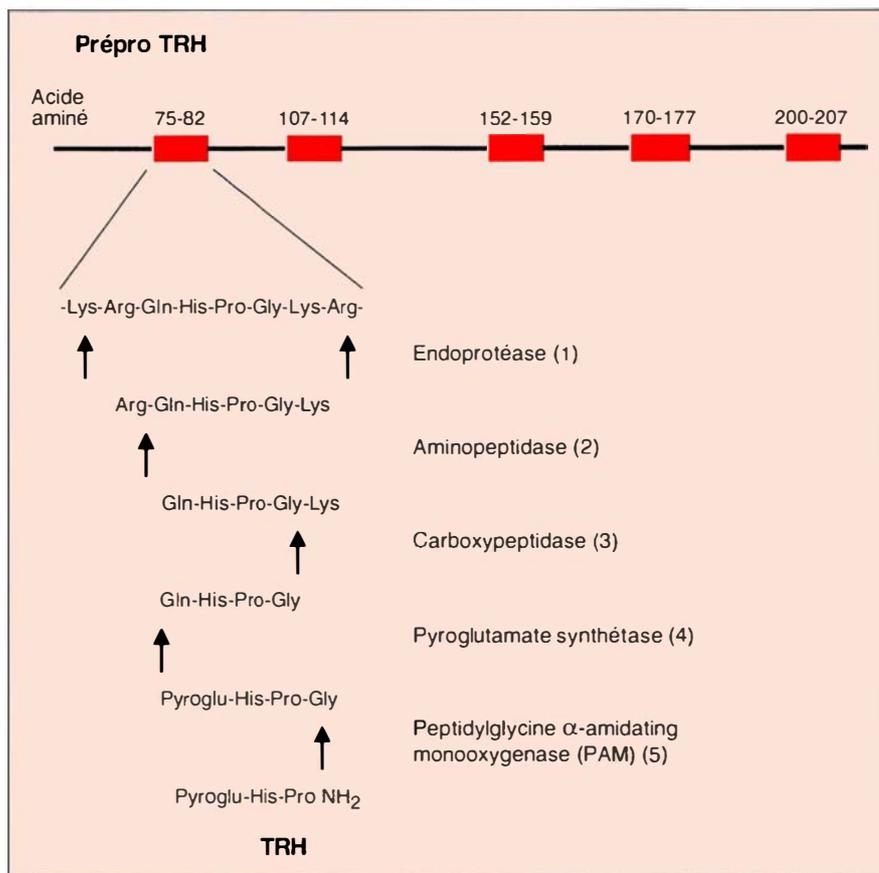


Figure 1. Exemple de la biosynthèse d'un peptide amidé ; la TRH, à partir d'un précurseur de poids moléculaire élevé. La maturation du précurseur comprend 5 étapes enzymatiques et l'action successive d'endoprotéase ou trypsin-like peptidase en 1, d'aminopeptidase en 2, de carboxypeptidase B en 3, de pyroglutamate synthétase en 4 et de PAM en 5, aboutissant à la formation du peptide amidé. Chaque rectangle représente un motif « pro TRH ».

Tableau I

LISTE (NON EXHAUSTIVE) DE PEPTIDES AMIDÉS EN POSITION COOH-TERMINALE ET NON AMIDÉS MIS EN ÉVIDENCE DANS LES TISSUS ENDOCRINES ET LE SYSTÈME NERVEUX

Peptides amidés	Peptides non amidés
Bombésine	Parathormone (PTH)
Calcitonine	Motiline
<i>Calcitonin-gene related peptide</i> (CGRP)	<i>Gastric inhibitory peptide</i>
Cholécystokinine (CCK)	Insuline
Gastrine	Glucagon
<i>Gastrin-releasing peptide</i>	Somatostatine
Sécrétine	Angiotensine
Pancréastatine	Bradykinine
<i>Pancreatic-polypeptide</i>	Neurotensine
Neuropeptide Y (NPY)	Met-enképhaline
Peptide tyrosine tyrosine (PYY)	Leu-enképhaline
<i>Vasoactive intestinal peptide</i> (VIP)	Dynorphine
Peptide histidine isoleucine (PHI)	β-Endorphine
Peptide histidine méthionine (PHM)	ACTH
Substance P	<i>Head activator neuropeptide</i>
Neurokinine A	<i>Atrial natriuretic factor</i>
Neurokinine B	<i>Brain natriuretic peptide</i>
Physalaemine	Endothéline
Galanine	
Métorphamide	
<i>α-melanocyte-stimulating hormone</i> (α-MSH)	
Arginine vasopressine (AVP)	
Ocytocine	
<i>Corticotropin-releasing hormone</i> (CRH)	
<i>Growth hormone-releasing hormone</i> (GH-RH)	
<i>Gonadotropin-releasing hormone</i> (Gn-RH)	
<i>Thyrotropin-releasing hormone</i> (TRH)	
Sauvagine	
FMRF-amide	
<i>Joining peptide</i>	
<i>Adipokinetic hormone</i>	
Amyline (rat)	

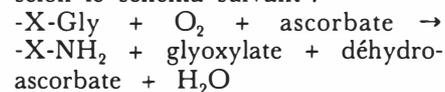
granules de sécrétion d'hypophyse porcine [3]. Cette description a été possible grâce à la mise au point d'une méthode simple de dosage de l'activité d'amidation, fondée sur la transformation d'un substrat synthétique, le  $^{125}\text{I-D-Tyr-Val-Gly}$  en son produit amidé correspondant, le  $^{125}\text{I-D-Tyr-Val-NH}_2$ .

De nombreux tissus sont très riches en activité enzymatique d'amidation. La purification de l'enzyme a été essentiellement réalisée à partir de fractions cellulaires solubles et elle a permis d'isoler plusieurs formes d'activité d'amidation différant par leur charge ou leur poids moléculaire [4]. Ainsi, l'analyse des préparations d'enzyme d'amidation de lobe neuro-intermédiaire d'hypophyse bovine, de peau de grenouille et de

cerveau de rat a permis de purifier une protéine dont le poids moléculaire apparent est de 40 000. En revanche, l'analyse des préparations purifiées à partir d'hypophyse porcine et de cancer médullaire de thyroïde de rat montre des protéines dont les poids moléculaires apparents sont respectivement de 60 000 et 75 000 [4].

Les expériences avec des substrats contenant  $^{15}\text{N}$ Gly ou  $^{14}\text{C}$ Gly ont permis de montrer que la fonction amide du peptide provient de la glycine et d'identifier le glyoxylate comme un coproduit de la réaction [3]. L'activité enzymatique d'amidation dans les différents tissus exprime la même dépendance vis-à-vis de l'ascorbate, du cuivre et de l'oxygène. La quantité d'ascorbate

consommée pendant la réaction est presque équimolaire à la quantité de peptide amidé produite. Comme dans le cas des autres réactions catalysées par l'ascorbate, la catalase doit être présente dans le milieu de réaction pour prévenir l'inactivation de l'enzyme. En fonction de ces propriétés, il a été proposé que la réaction d'oxydation était catalysée par une monooxygénase et cela a amené à désigner l'enzyme sous la dénomination de *peptidylglycine α-amidating monooxygénase* ou PAM (EC 1.14.17.3). Il a été initialement suggéré que l'action de la PAM s'effectuait selon le schéma suivant :



Sur la base de ce schéma, les pro-

## RÉFÉRENCES

12. Katapodis AG, Ping D, May SW. A novel enzyme from bovine neurointermediate pituitary catalyzes dealkylation of  $\alpha$ -hydroxyglycine derivatives, thereby functioning sequentially with peptidylglycine  $\alpha$ -amidating in peptide amidation. *Biochemistry* 1990 ; 29 : 6115-20.
13. Suzuki K, Shimoi H, Iwasaki Y, Kawahara T, Matsumura Y, Mishikawa Y. Elucidation of amidating reaction mechanism by frog amidating enzyme, peptidylglycine  $\alpha$ -hydroxylating monooxygenase, expressed in insect cell culture. *EMBO J* 1990 ; 9 : 4259-65.
14. Eipper BA, Perkins SM, Husten EJ, Johnson RC, Keutmann HT, Mains RE. Peptidyl- $\alpha$ -hydroxyglycine  $\alpha$ -amidating lyase : purification, characterization and expression. *J Biol Chem* 1991 ; 266 : 7827-33.
15. Eipper BA, Park LP, Dickerson IM, et al. Structure of the precursor to an enzyme mediating COOH-terminal amidation in peptide biosynthesis. *Mol Endocrinol* 1987 ; 1 : 777-90.
16. Mizuno K, Ohsuye K, Wada Y, Fuchimura K, Tanaka S, Matsuo H. Cloning and sequence of cDNA encoding a peptide C-terminal  $\alpha$ -amidating enzyme from *Xenopus laevis*. *Biochem. Biophys Res Commun* 1987 ; 148 : 546-52.
17. Stoffers DA, Green CBR, Eipper BA. Alternative mRNA splicing generates multiple forms of peptidylglycine  $\alpha$ -amidating monooxygenase in rat atrium. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989 ; 86 : 735-9.
18. Stoffers DA, Ouafik L'H, Eipper BA. Characterization of novel mRNAs encoding enzymes involved in peptide  $\alpha$ -amidation. *J Biol Chem* 1991 ; 266 : 1701-7.
19. Kato I, Yonkara H, Yamamoto H, Okamoto H. Isolation and functional expression of pituitary peptidylglycine  $\alpha$ -amidating enzyme mRNA. *FEBS Lett* 1990 ; 269 : 319-23.

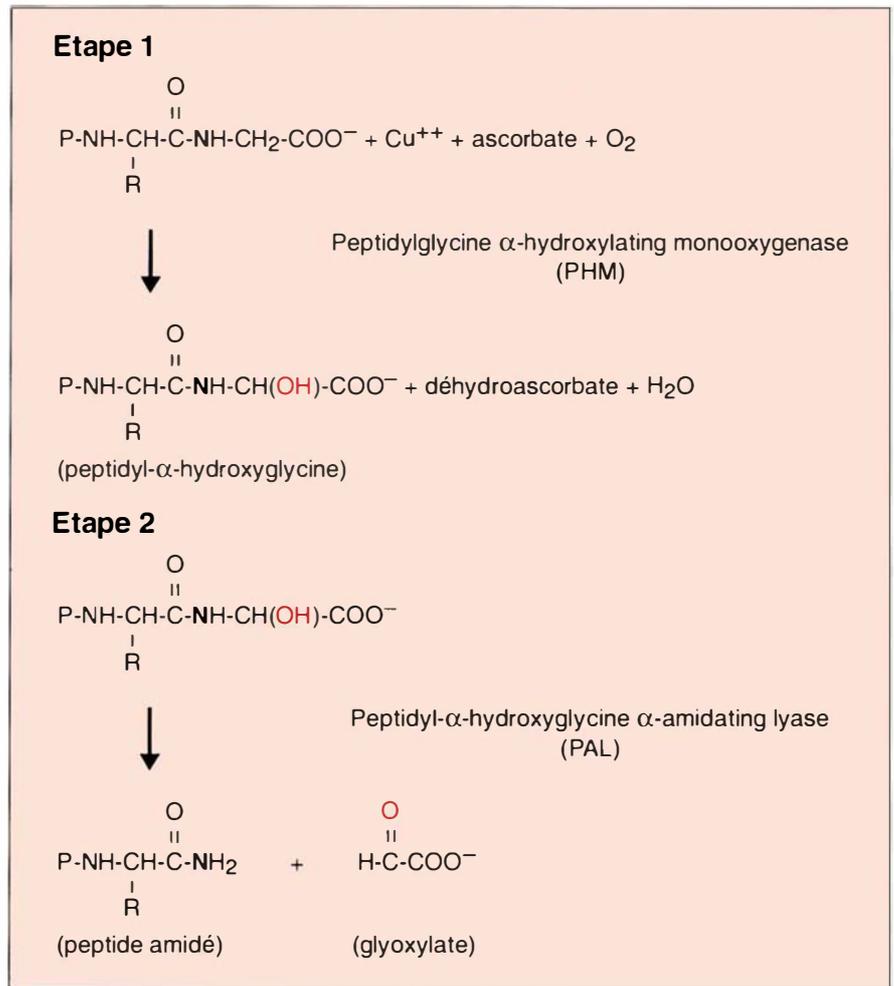


Figure 2. **Schéma actuel de la réaction d'amidation** avec les deux étapes enzymatiques successives qui donnent naissance à la peptidyl- $\alpha$ -hydroxyglycine (étape 1), puis au peptide amidé et au glyoxylate (étape 2). R : chaîne latérale de l'acide aminé qui sera amidé.

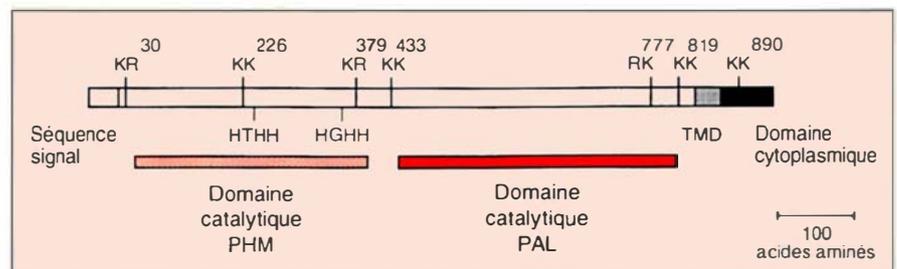


Figure 3. **Structure du précurseur de la PAM** isolée dans le lobe neuro-intermédiaire de bœuf et codée par bPAM-1 [17]. La localisation du peptide signal, du domaine transmembranaire (TMD) et du domaine cytoplasmique est indiquée. Les sites de clivage potentiel des paires d'acides aminés basiques sont indiqués (K : lysine, et R : arginine). Les séquences des deux régions riches en histidine potentiellement impliquées dans l'interaction avec le cuivre sont indiquées.

prétés de la PAM ont été décrites à l'aide de préparations enzymatiques plus ou moins purifiées.

— Le pH optimal des différentes préparations enzymatiques varie entre 4,5 et 9 en fonction de la nature de l'acide aminé qui précède le résidu Gly. Si le résidu est acide, le pH optimal est bas alors que, dans le cas d'un résidu basique, le pH optimal est élevé.

— Les valeurs de la constante de Michaelis ( $K_m$ ) et de la vitesse maximale ( $V_{max}$ ) varient en fonction du pH et de la concentration en ascorbate. Elles varient aussi en fonction de la nature du substrat.

La réaction chimique d'amidation a beaucoup de points communs avec la conversion de la dopamine en norépinéphrine par la dopamine  $\beta$ -hydroxylase (EC 1.14.17.1) [1, 5]. En

effet, les deux activités sont associées aux granules de sécrétion et nécessitent les mêmes cofacteurs : cuivre, ascorbate et oxygène moléculaire. Cependant, la distribution tissulaire des deux enzymes est différente [5-7]. De plus, la PAM soluble se présente sous forme monomérique alors que la dopamine  $\beta$ -hydroxylase est tétramérique avec deux sous-unités solubles et deux sous-unités membranaires. Des études plus récentes ont permis de démontrer que la réaction d'amidation comprend en réalité deux étapes enzymatiques successives :

— étape 1 : production de peptidyl- $\alpha$ -hydroxyglycine, qui dépend de la présence de cuivre ni d'ascorbate ;  
— étape 2 : formation du peptide amidé et de glyoxylate. Cette deuxième étape peut se réaliser spontanément à pH très alcalin, mais, dans des conditions physiologiques (à pH neutre ou acide), elle nécessite la mise en jeu d'une autre activité enzymatique qui ne requiert pas la présence de cuivre ni d'ascorbate.

L'enzyme catalysant la première réaction est appelée *peptidylglycine  $\alpha$ -hydroxylating monooxygenase* (PHM) alors que la deuxième étape est catalysée par la *peptidyl- $\alpha$ -hydroxyglycine  $\alpha$ -amidating lyase* (PAL) [8-14] (figure 2). Ces deux activités enzymatiques sont associées au sein de la même protéine, la PAM.

### Clonage des ADNc et du gène de la PAM

Les ADNc de la PAM ont été isolés à partir de banques d'ADNc de lobe intermédiaire d'hypophyse de bœuf (bPAM-1 et bPAM-2) [15], de peau de grenouille (AE-I et AE-II) [16] et d'oreillette de rat (rPAM-1 et rPAM-2) [17]. L'ADNc rPAM-1 code pour une séquence protéique, précurseur de la PAM, de 108 kDa. Le précurseur de la PAM contient, dans sa portion  $NH_2$ -terminale, une séquence signal, suivie d'un propeptide, du domaine catalytique intragranulaire (celui de la monooxygénase étant suivi par celui de la lyase), d'un domaine transmembranaire et de la partie cytoplasmique  $COOH$ -terminale (figure 3). Ce précurseur comprend, dans les différentes espèces, un grand nombre de paires d'acides aminés basiques qui peuvent

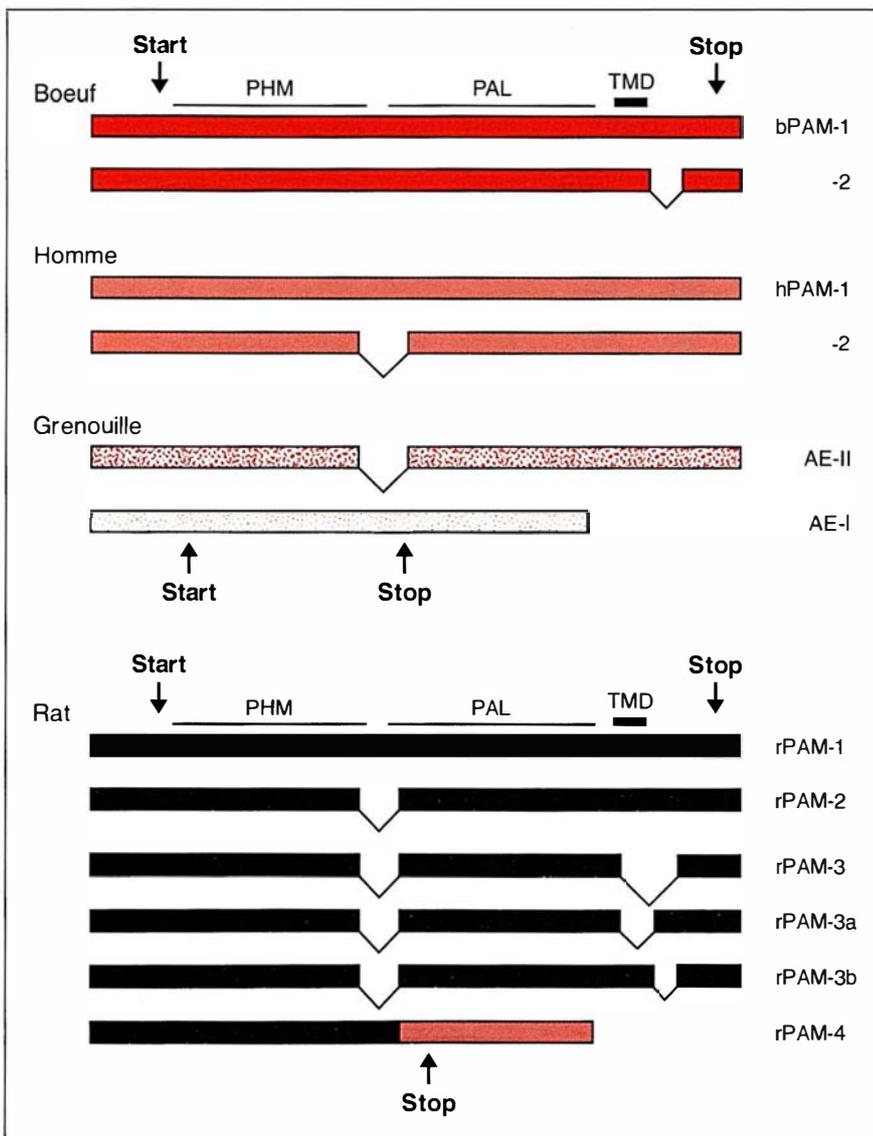


Figure 4. **Les différentes formes d'ADNc de la PAM caractérisées dans plusieurs espèces.** La figure montre les relations de structure entre les ADNc de la PAM isolés à partir du lobe neuro-intermédiaire de bœuf [15], du cancer médullaire de thyroïde humaine [21], de la peau de grenouille [16], d'oreillette [17, 18] et de lobe antérieur de l'hypophyse de rat (Eipper et al., en préparation). Les sites de départ (start) et d'arrêt (stop) de la traduction des protéines sont indiqués. Les deux domaines catalytiques (PHM et PAL) ainsi que le domaine transmembranaire (TMD) sont indiqués.

## RÉFÉRENCES

20. Bertelsen AH, Beaudry GA, Gellela EA, Jones BN, Ray ML, Mehta N. Cloning and characterization of two alternatively spliced rat  $\alpha$ -amidating enzyme cDNAs from rat medullary thyroid carcinoma. *Arch Biochem Biophys* 1990 ; 279 : 87-96.
21. Glauder J, Ragg H, Ranch J. Human peptidylglycine  $\alpha$ -amidating monooxygenase : cDNA, cloning and functional expression of a truncated form in cos cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1990 ; 169 : 551-8.
22. Ohsuye K, Kitano K, Wada Y, et al. Cloning of cDNA encoding a new peptide C-terminal  $\alpha$ -amidating enzyme having a putative membrane spanning domain from *Xenopus laevis* skin. *Biochem Biophys Res Commun* 1988 ; 150 : 1275-81.
23. Grino M, Guillaume V, Boudouresque F, Conte-Devolx B, Maltese JY, Oliver C. Glucocorticoids regulate peptidylglycine  $\alpha$ -amidating monooxygenase gene expression in the rat hypothalamic paraventricular nucleus. *Mol Endocrinol* 1990 ; 4 : 1613-9.
24. Ouafik L'H, May V, Saffen DW, Eipper BA. Thyroid hormone regulation of peptidylglycine  $\alpha$ -amidating monooxygenase expression in anterior pituitary gland. *Mol Endocrinol* 1990 ; 4 : 1497-505.
25. Ouafik L'H, Giraud P, Salers P, et al. Evidence for high peptide  $\alpha$ -amidating activity in the pancreas from neonatal rats. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987 ; 84 : 261-4.
26. Scharfmann R, Leduque P, Aratan-Spire S, Dubois P, Basmaciogullari A, Czernichow P. Persistence of peptidyl  $\alpha$ -amidating monooxygenase activity and elevated thyrotropin releasing hormone concentrations in fetal rat islets in culture. *Endocrinology* 1988 ; 123 : 1329-34.
27. Eipper BA, May V, Braas KM. Membrane-associated peptidylglycine  $\alpha$ -amidating monooxygenase in the heart. *J Biol Chem* 1988 ; 263 : 8371-9.
28. Ouafik L'H, May V, Keutmann HT, Eipper BA. Developmental regulation of peptidylglycine  $\alpha$ -amidating monooxygenase (PAM) in rat heart atrium and ventricle. *J Biol Chem* 1989 ; 264 : 5839-45.

être des sites de clivage endoprotéolytique. En effet, la séquence de l'activité PAL purifiée à partir de lobe neuro-intermédiaire d'hypophyse bovine comprend, en position NH<sub>2</sub>-terminale, un résidu acide aspartique. Ce résidu est situé en position 434 dans la molécule du précurseur de la PAM bovine, immédiatement après une paire de résidus lysine (-Lys<sup>432</sup>-Lys<sup>433</sup>). Ces données structurales indiquent que la PAL peut être produite à partir du précurseur de la PAM par un clivage endoprotéolytique au niveau des deux acides aminés basiques [14, 15]. La comparaison des séquences de PAM de bœuf, de rat et de grenouille montre une bonne conservation inter-espèces d'un certain nombre d'acides aminés (ainsi les 14 résidus cystéine dans la région catalytique intragranulaire, les résidus histidine pour l'interaction avec le cuivre (figure 3), les résidus méthionine et plusieurs sites potentiels de phosphorylation et de glycosylation).

L'existence de plusieurs formes d'ADNc de la PAM de bœuf et de rat est la conséquence de l'épissage alternatif d'un transcrit primaire. L'étude préliminaire des clones génomiques est en accord avec la présence d'un seul gène codant pour la PAM chez le rat. Le gène de la PAM de rat possède plus de 28 exons et sa taille semble être de l'ordre de

150 kilobases (kb) (Ouafik et al., manuscrit en préparation).

La figure 4, p. 932 rassemble les différentes formes d'ADNc identifiées dans plusieurs espèces. Les deux ADNc isolés d'hypophyses bovines diffèrent seulement par la présence (dans bPAM-1) ou l'absence (dans bPAM-2) d'un segment de 54 paires de bases (pb) codant pour une séquence de 18 acides aminés dans la portion cytoplasmique. Quatre ADNc ont été isolés à partir d'oreillettes de rat. Les deux formes majeures d'ADNc de la PAM d'oreillettes cardiaques de rat, rPAM-1 et rPAM-2, ne diffèrent que par la délétion dans rPAM-2 d'un segment de 315 pb (exon A optionnel) codant pour une séquence de 105 acides aminés située entre les domaines de la PHM et de la PAL. rPAM-3 et rPAM-4 ont été isolés plus récemment [18]. rPAM-3 est caractérisée par la délétion du segment de 315 pb (exon A optionnel) et aussi par celle d'un segment de 258 pb (exon B optionnel) codant pour le domaine transmembranaire. rPAM-3 code pour une protéine soluble contenant les activités PHM et PAL. rPAM-4 est identique à la rPAM-1 jusqu'à l'extrémité 3' de l'exon A optionnel ; celle-ci est suivie d'une séquence de 1,2 kb, spécifique de rPAM-4. En conséquence, rPAM-4 code pour une protéine

Tableau II

### DISTRIBUTION DE L'ACTIVITÉ BIOLOGIQUE PAM DANS LES DIFFÉRENTS TISSUS DE RATS MÂLES ADULTES INTACTS

Oreillette cardiaque	100,0
Lobe antérieure de l'hypophyse	39,0
Glande sous-maxillaire	26,6
Glande sublinguale	17,5
Lobe neuro-intermédiaire de l'hypophyse	13,0
Hypothalamus	12,5
Hippocampe, striatum, tronc cérébral, thalamus, bulbe olfactif, cortex cérébral	2,5-5,9
Rétine, poumon, thyroïde, surrénales, ventricule cardiaque, pylore	1,0-2,0
Rein, thymus, rate, langue, pancréas, foie, tractus intestinal, œsophage, cardia, muscles, organes génitaux internes mâles et femelles	0,2-0,7

Les résultats sont exprimés en pourcentage par rapport à l'activité maximale qui est retrouvée dans les oreillettes cardiaques (d'après [6]).

contenant l'activité PHM, mais non pas l'activité PAL.

D'autres formes d'ARNm de la PAM ont été mises en évidence dans l'hypophyse de rat et identifiées comme rPAM-3a et 3b (Eipper *et al.*, en préparation). La délétion dans rPAM-3a intéresse le domaine transmembranaire alors que la région absente dans rPAM-3b correspond à la délétion reconnue dans bPAM-2. Des résultats semblables ont été retrouvés par Kato *et al.* dans l'hypophyse de rat [19]. Chez le rat, deux formes d'ADNc (appelées rPAM-A et rPAM-B) ont été isolées à partir d'un cancer médullaire de la thyroïde [20]. La rPAM-B est identique à la rPAM-3 de l'oreillette ; tandis que la rPAM-A est très pro-

che de la rPAM-1, avec toutefois des différences au niveau de l'exon B optionnel.

Chez l'homme, deux formes d'ADNc ont aussi été isolées à partir d'un cancer médullaire de la thyroïde [21]. Ces deux formes présentent de très fortes homologies avec rPAM-1 et rPAM-2 de l'oreillette de rat. Les deux formes d'ADNc retrouvées chez l'homme diffèrent entre elles par la présence ou l'absence d'une séquence de 321 pb située entre les domaines catalytiques PHM et PAL.

Les formes d'ADNc de la peau de grenouille (AE-I et AE-II) diffèrent sensiblement entre elles. AE-I code pour une protéine soluble de 39 kDa qui contient le domaine de la PHM, mais non pas la séquence codée par

l'exon optionnel A, ni celle de la PAL. A l'inverse, AE-II code pour une protéine qui comprend tous les sites actifs de la protéine codée par rPAM-1. Les différences entre AE-I et AE-II ont amené à soulever l'hypothèse de l'existence de plusieurs gènes chez la grenouille, à l'inverse du rat [16, 22].

### Distribution tissulaire de la PAM

La PAM est exprimée dans la majorité des tissus. Ainsi, chez le rat, l'ARNm de la PAM et son activité biologique ont été retrouvés dans presque tous les tissus examinés, à l'exception du cervelet (*Tableau II*) [6, 7]. L'activité PAM la plus élevée est retrouvée dans les oreillettes cardiaques, suivies par le lobe antérieur de l'hypophyse, les glandes salivaires, le lobe neuro-intermédiaire de l'hypophyse et le système nerveux central. La *figure 5* montre une expression PAM très riche au niveau des oreillettes cardiaques du rat adulte et, au contraire, une expression réduite au niveau des ventricules. Les pourcentages respectifs des fractions soluble et membranaire de l'activité PAM varient selon les différents tissus.

### Régulation de l'activité PAM et de la synthèse des peptides amidés

La régulation de l'activité PAM varie en fonction de facteurs hormonaux et des stades de développement de l'animal. Cette régulation est à l'origine de variations dans la synthèse tissulaire des peptides amidés.

#### Influence des hormones et des neurotransmetteurs

Les glucocorticoïdes modifient l'activité PAM dans plusieurs tissus. Au niveau de l'antéhypophyse, ils entraînent une diminution de l'activité PAM parallèle à celle de la proopiomélanocorticotropine (POMC) et de l'ACTH. La PAM est impliquée dans l'amidation du *joining peptide*, synthétisé dans le lobe antérieur à partir de la POMC [4]. De même, les glucocorticoïdes diminuent de façon parallèle l'expression de la PAM et d'un peptide amidé, le

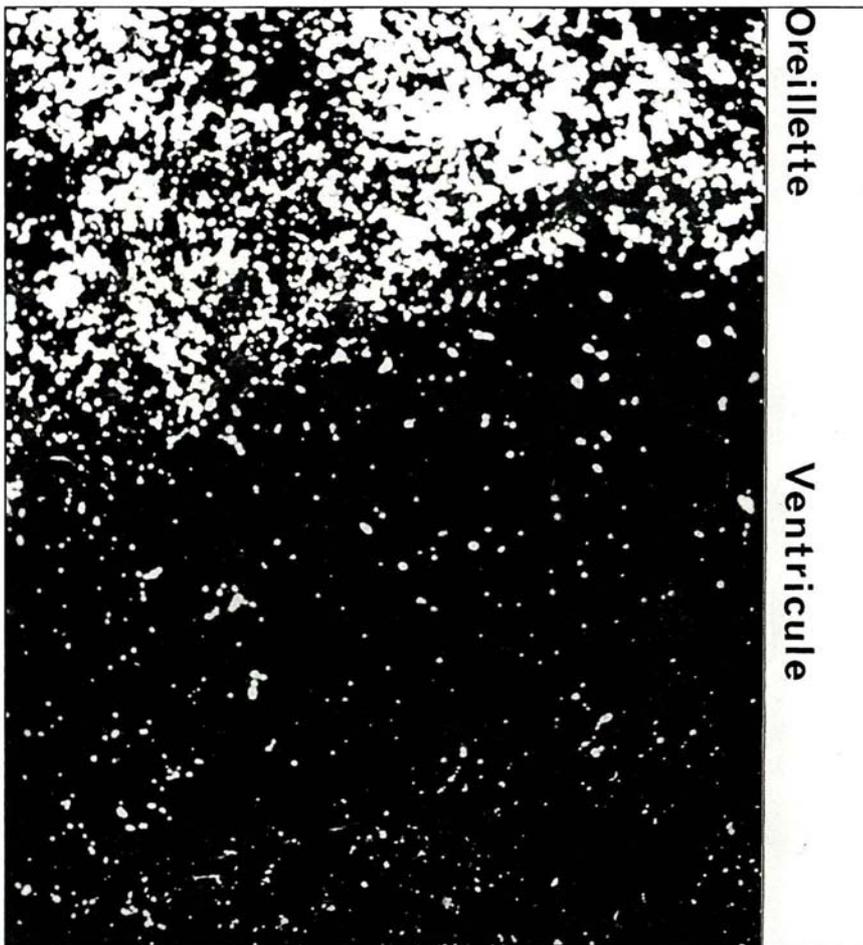


Figure 5. **Localisation de l'ARNm de la PAM par hybridation in situ dans le tissu cardiaque de rat adulte.** Des coupes de tissu cardiaque (comprenant le ventricule et l'oreillette) ont été hybridées avec un ARN anti-sens (ribo-probe) de la PAM marquée avec  $^{35}\text{S}$ -UTP. Cette sonde détecte toutes les formes connues d'ARNm de la PAM chez le rat. Le marquage est très intense au niveau de l'oreillette alors qu'au niveau du ventricule, seules quelques cellules sont marquées.

corticotropin-releasing factor (CRF) dans le noyau paraventriculaire hypothalamique [23]. Le traitement par les glucocorticoïdes de cellules de cancer médullaire de rat (CA-77) réduit la sécrétion de PAM dans le milieu, alors qu'il est sans effet sur son contenu cellulaire [4]. Toutefois, la régulation de l'expression de la PAM par les glucocorticoïdes peut être différente selon les tissus, comme le montrent les effets opposés obtenus sur les oreillettes cardiaques. En effet, *in vitro*, les glucocorticoïdes provoquent dans ce tissu une augmentation des taux d'ARNm, de l'activité biologique de la PAM intracellulaire et de sa sécrétion [4].

Les hormones thyroïdiennes règlent l'activité PAM dans l'antéhypophyse [24]. Chez les rats hypothyroïdiens, une augmentation significative de l'expression de la PAM est observée ; parallèlement, les contenus hypophysaires de trois peptides amidés (le *vasoactive intestinal peptide*, la substance P et le NPY) augmentent de façon très importante (voir références dans [24]).

L'action des neuropeptides et des neurotransmetteurs sur l'activité PAM a aussi été démontrée. Ainsi, le CRF stimule l'activité PAM comme la synthèse de la POMC dans l'antéhypophyse [4]. Au niveau du lobe intermédiaire d'hypophyse de rat, l'activité PAM (et la synthèse de POMC) est stimulée *in vivo* par l'administration d'un antagoniste dopaminergique (halopéridol) et diminuée par celle d'un agoniste dopaminergique (bromocriptine). L'addition de réserpine à des cellules chromaffines bovines en culture stimule l'activité PAM et, parallèlement, la synthèse de deux peptides amidés issus de la proenképhaline A, l'amidorphine et la métorphamide [1, 4].

#### Variations en fonction des stades du développement

Les variations de l'expression de la PAM pendant le développement ont été mises en évidence dans deux études. Dans le pancréas de rat, l'activité PAM s'élève fortement pendant la première semaine de la vie [25]. Il en est de même de la TRH, un tripeptide amidé dont l'expression dans les cellules  $\beta$  du pancréas est transi-

toire. L'activité PAM et les taux de TRH dans le pancréas adulte sont très faibles. Le ou les mécanismes responsables de l'évolution spontanée de la PAM pancréatique sont inconnus. Toutefois, il est à noter que la chute de l'activité PAM n'est pas observée *in vitro* sur les îlots de pancréas endocrine prélevés à la naissance et mis en culture [26].

Au niveau du cœur, l'activité PAM est très élevée, mais la nature de son substrat n'est pas encore établie [27]. L'expression de la PAM varie différemment durant le développement au niveau atrial et ventriculaire. Au niveau atrial, l'activité PAM est détectable dès le 16<sup>e</sup> jour de gestation ; elle atteint un pic au 18<sup>e</sup> jour, diminue à la naissance et remonte pour atteindre un second pic durant la première semaine de vie. Elle décroît ensuite à partir du 14<sup>e</sup> jour pour atteindre les taux adultes, qui restent élevés si on les compare à ceux d'autres tissus (Tableau II). Au niveau ventriculaire, l'expression de l'activité PAM commence plus tôt qu'au niveau atrial (dès le 14<sup>e</sup> jour de la gestation) ; elle diminue ensuite régulièrement avec toutefois un pic transitoire peu après la naissance [28]. Les deux formes majeures d'ARNm de la PAM ( $4,2 \pm 0,1$  et  $3,8 \pm 0,1$  kb) sont présentes en proportions variables dans les oreillettes et les ventricules. La proportion de chacune des deux formes varie d'une manière très complexe pendant le développement fœtal et postnatal [28]. L'expression complexe et les variations de la PAM au niveau cardiaque pendant l'ontogenèse suggèrent que cette enzyme joue un rôle très important au niveau du cœur pendant le développement. Cependant, la signification physiologique de la PAM cardiaque reste à déterminer.

#### Activité PAM et synthèse de peptides amidés

La synthèse de peptides amidés par les tissus dépend de l'activité PAM, de ses cofacteurs, ainsi que du substrat.

Le caractère limitant de la PAM est fonction des tissus. Au niveau des deux lobes de l'hypophyse de rat, l'activité d'amidation n'est pas limitante et, par conséquent, le *joining*

*peptide* et l' $\alpha$ -MSH sont retrouvés en quasi-totalité sous forme amidée. Il en est différemment dans d'autres tissus. Ainsi, dans l'hypothalamus fœtal ou la prostate de rat, l' $\alpha$ -amidation du TRH-Gly est un facteur limitant, et les taux de TRH-Gly sont supérieurs à ceux de la TRH. Il en est probablement de même dans l'antre gastrique du rat nouveau-né où les taux de gastrine-Gly sont plus élevés que ceux de gastrine [4].

Le rôle de l'ascorbate et du cuivre sur la synthèse des peptides amidés est bien démontré. En effet, l'ajout d'acide ascorbique aux milieux de culture de cellules hypophysaires, hypothalamiques, gastro-intestinales ou pancréatiques stimule la production des peptides amidés. Le degré de dépendance vis-à-vis de l'ascorbate varie selon les tissus. Le rôle du cuivre est démontré *in vivo* par les effets du traitement de rats par des chélateurs du cuivre, le diéthylthiocarbamate ou le disulfiram. Ce traitement entraîne une réduction des taux de peptides amidés dans le lobe neuro-intermédiaire de l'hypophyse ( $\alpha$ -MSH) et le système nerveux central (substance P) [4].

Des tissus tels que l'hypophyse et l'hypothalamus synthétisent un grand nombre de peptides amidés et les concentrations de ces peptides varient souvent proportionnellement à l'activité PAM. En revanche, dans d'autres tissus, une activité PAM a été retrouvée alors qu'il n'a pas été démontré que ces tissus pouvaient synthétiser un peptide amidé. Il en est ainsi des oreillettes cardiaques où les taux de PAM sont très élevés (figure 5). Les oreillettes contiennent aussi du NPY : toutefois, les concentrations de ce peptide amidé y sont très faibles. Actuellement, nous ne savons pas si l'oreillette cardiaque produit un peptide amidé autre que le NPY ou alors si la PAM exerce dans ce tissu une autre fonction, encore inconnue.

#### Conclusion et perspectives

L'intérêt de l'étude de la PAM en endocrinologie et neurobiologie est évident en raison du grand nombre de peptides amidés en position COOH-terminale et de leur impor-

tance physiologique. L'amidation de ces peptides est en effet nécessaire à leur activité biologique. Bien que les études récentes aient permis de mieux connaître la structure des protéines catalysant l'amidation et ses cofacteurs, beaucoup de progrès restent à faire. La compréhension fine des mécanismes de la réaction devrait permettre le développement d'inhibiteurs spécifiques de l'enzyme d'amidation. Grâce à cette approche, il sera possible de déterminer si l'enzyme remplit d'autres fonctions que celles de l'amidation des peptides.

La connaissance de la structure primaire de la PAM a permis d'obtenir des anticorps de haute affinité pour différentes régions de la PAM. Grâce aux méthodes immunohistochimiques réalisées avec ces outils, le trajet de l'enzyme durant sa biosynthèse, depuis le réticulum endoplasmique granulaire où il est synthétisé, jusqu'aux granules de sécrétion où il est stocké, sera établi. De même, la colocalisation éventuelle de l'enzyme avec ses substrats sera recherchée.

Enfin, la complexité du gène de la PAM qui donne naissance à une famille de protéines bi-fonctionnelles nécessaires à l' $\alpha$ -amidation, soulève des questions très intéressantes sur les facteurs de régulation de son expression en fonction des différents tissus et des stades du développement. Une bonne connaissance du gène et des mécanismes d'action de la PAM devrait aboutir à l'obtention d'outils très performants pour mieux comprendre la physiopathologie des tissus nerveux et endocrines ■

#### Remerciements

Les auteurs remercient Mmes R. Quérat et A. Ouafik pour leur excellente aide dans la préparation de cet article. Une partie des travaux cités dans le texte a été réalisée grâce à l'aide financière de la faculté de médecine de Marseille et de la Fondation pour la recherche médicale. L'H. Ouafik a bénéficié d'une bourse de l'American Heart Association (AHA), dans le cadre d'un stage post-doctoral dans le département des neurosciences, Johns Hopkins University school of medicine à Baltimore, sous la direction de B. A. Eipper.

*m/s n° 9, vol. 7, novembre 91*

## Summary

**Peptidylglycine  $\alpha$ -amidating monooxygenase (PAM), a bifunctional enzyme that catalyzes peptide  $\alpha$ -amidation**

Small bioactive peptides are derived from larger precursor proteins following a series of post-translational cleavage and modification steps. For many of these peptides, full biological activity is dependant upon  $\alpha$ -amidation of the carboxyl-terminal amino acid by an enzyme, peptidylglycine  $\alpha$ -amidating monooxygenase (PAM ; EC 1.14.17.3). Peptide  $\alpha$ -amidation is a two-step enzymatic process. The enzyme catalyzing the first step is derived from the first NH<sub>2</sub>-terminal third of PAM precursor and is named peptidylglycine  $\alpha$ -hydroxylating monooxygenase (PHM) while the second step is catalyzed by a separate enzyme peptidyl- $\alpha$ -hydroxyglycine  $\alpha$ -amidating lyase (PAL) whose activity derives from the remaining intragranular region of the PAM precursor. The 108 kDa PAM precursor consists of an NH<sub>2</sub>-terminal signal peptide followed by the PHM and PAL catalytic intragranular domains. A single, but complex gene encodes PAM, and tissue specific and developmentally regulated alternative splicing generates mRNAs encoding many different PAM proteins. The tissue-specific expression of these different forms of PAM mRNA is expected to be of functional significance.

#### TIRÉS A PART

L. Ouafik.