

## **L**e PACAP : du facteur hypophysiotrope au neuropeptide antiapoptotique

*Le PACAP a été initialement découvert en tant que neurohormone hypophysiotrope, mais le neuropeptide PACAP et ses récepteurs sont aussi largement distribués dans le système nerveux central. En particulier, au cours du développement, le PACAP est présent dans les cellules de Purkinje et les récepteurs de type PAC1 sont exprimés en abondance par les cellules en grain, ce qui suggère que le PACAP pourrait être impliqué dans l'histogenèse du cortex cérébelleux. A l'appui de cette*

*hypothèse, des travaux récents montrent que le PACAP exerce in vitro un puissant effet antiapoptotique sur les cellules granulaires, qui se traduit in vivo par une augmentation de volume du cervelet. Les applications thérapeutiques potentielles des agonistes sélectifs des récepteurs du PACAP dans les maladies neurodégénératives et les accidents vasculaires cérébraux sont actuellement en cours d'évaluation.*

**L**es neuropeptides exercent des effets extrêmement variés dans le système nerveux central et dans les organes périphériques. De nombreux peptides tels que l' $\alpha$ -MSH, l'angiotensine II, le facteur natriurétique auriculaire, les endothélines et la somatostatine assurent à la fois des fonctions d'hormones, de neurohormones et de neuromodulateurs voire de neurotransmetteurs. Des études récentes montrent que certains neuropeptides possèdent également des propriétés neurotrophiques. Tel semble être le cas du *pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide* (PACAP) qui favorise la survie et induit la différenciation des neurones cérébraux et cérébelleux au cours du développement.

### **Le PACAP : neurohormone, neuromédiateur et facteur neurotrophique**

Le PACAP est un polypeptide de 38 acides aminés qui a été initialement isolé à partir de l'hypothalamus de mouton par Arimura sur la base de son aptitude à stimuler l'adénylyl cyclase hypophysaire [1]. Il possède au sein de sa séquence un doublet

d'acides aminés basiques, site de clivage potentiel par les endoprotéases, qui libère un peptide de 27 acides aminés, lequel présente les mêmes propriétés biologiques que le PACAP38. La séquence du PACAP27 possède 68 % d'identité avec le *vasoactive intestinal polypeptide* (VIP), ce qui apparente le PACAP à la superfamille sécrétine/glucagon/VIP/somatolibérine. Il est maintenant bien établi que le PACAP38, comme le PACAP27, stimule la libération de GH, ACTH, LH et FSH (*growth hormone, adrenocorticotrophic hormone, luteinizing hormone, follicle stimulating hormone*) en agissant directement sur les cellules antéhypophysaires. En outre, le PACAP module la libération des neurohormones hypophysiotropes au niveau des terminaisons de l'éminence médiane. Enfin, au niveau hypothalamique, le PACAP semble pouvoir contrôler l'activité des neurones à gonadolibérine (GnRH), somatostatine et corticolibérine (CRF) [2].

A ce jour, deux types de sites de liaison du PACAP ont été identifiés [2] : il existe un récepteur spécifique du PACAP nommé PAC1\* et deux autres récepteurs communs au

PACAP et au VIP appelés VPAC1 et VPAC2. L'activation de ces récepteurs à 7 domaines transmembranaires entraîne une augmentation de la concentration d'AMPc, active les MAP-kinases ERK, accélère l'hydrolyse des polyphosphoinositides et provoque une mobilisation du calcium intracellulaire [2]. Chez le rat, la spécificité de couplage du récepteur PAC1 aux différents seconds messagers peut être modulée par la présence de 8 variants d'épissage. Dans le système nerveux central, le PACAP et ses récepteurs sont largement distribués dans l'hypothalamus et dans les aires extrahypothalamiques, ce qui suggère que le PACAP agit à la fois comme une neurohormone et un neuromédiateur [2]. Par ailleurs, le PACAP et ses récepteurs sont exprimés dans le système nerveux central au cours du développement [3]. En particulier, pendant la période post-natale, le PACAP est présent dans les cellules de Purkinje [4]

\* Attention, il existe deux autres molécules ayant la même dénomination : un anticorps reconnaissant un antigène d'activation de l'intégrine IIb IIIa, et une phosphatase spécifique de la kinase ERK.

et les récepteurs PAC1 sont très abondants au niveau de la couche granulaire externe [3], un épithélium germinatif qui donne naissance aux interneurons cérébelleux. De même, au niveau du cerveau, le PACAP et ses récepteurs sont exprimés dès le 14<sup>e</sup> jour de vie embryonnaire par les précurseurs corticaux [5]. Ces observations suggèrent que le PACAP pourrait être impliqué dans l'histogenèse du système nerveux central.

### Effet du PACAP sur le développement du cerveau

Les premières études relatives à l'effet neurotrophique du PACAP ont été réalisées *in vitro*. L'incubation de neuroblastes corticaux en présence de concentrations nanomolaires de PACAP oriente ces cellules vers la différenciation neuronale [5]. Dans le cervelet, le PACAP favorise la survie des cellules en grain immatures et augmente fortement le nombre et la longueur des prolongements neuritiques (*m/s 1997, n° 13, p. 1331*) [6]. Le PACAP exerce des effets similaires sur les cellules chromaffines médullosurréaliennes [7]. Utilisé aux mêmes concentrations, le VIP n'a aucun effet sur ces différents modèles, ce qui indique que l'action du PACAP met en jeu des récepteurs de type PAC1. Les effets neurotro-

phiques du PACAP sur les neuroblastes corticaux et cérébelleux sont spécifiques puisque bloqués par un antagoniste de ces récepteurs, le PACAP(6-38).

L'injection de PACAP à des rats âgés d'une semaine, dans l'espace subarachnoïdien, à la surface du cervelet, provoque un accroissement du volume du cortex cérébelleux sans modifier celui de la médulla (*figure 1*) [8]. L'effet du PACAP sur le volume du cortex cérébelleux résulte d'une augmentation du nombre de neurones au niveau de la couche granulaire interne. En revanche, aucune modification du nombre de cellules de Purkinje n'a été observée. Ceci suggère que, dans le cortex cérébelleux immature, le PACAP agit sélectivement sur les cellules en grain en cours de différenciation. Enfin, l'effet du PACAP sur l'épaisseur de la couche granulaire interne est bloqué par l'injection concomitante de l'antagoniste PACAP(6-38). En l'absence de PACAP exogène, l'administration du peptide PACAP(6-38) provoque à elle seule une diminution modeste du nombre de neurones dans la couche granulaire interne ce qui suggère que le peptide endogène, probablement libéré par les cellules de Purkinje, serait effectivement impliqué dans le développement du cortex cérébelleux.

### Mécanismes d'action mis en jeu dans les effets neurotrophiques du PACAP

La caspase-3, une protéase à cystéines de la famille de l'*interleukine-1 $\beta$ -converting enzyme*, est une enzyme-clé de la cascade apoptotique dans de nombreux types cellulaires [9]. Les souris dont le gène de la caspase-3 a été invalidé présentent diverses anomalies au niveau du système nerveux central [10]. En particulier, dans le cervelet des animaux déficients en caspase-3, on note la persistance de cellules en grain en cours de division dans la couche granulaire externe jusqu'au 16<sup>e</sup> jour postnatal (alors que cette assise germinative disparaît chez les animaux sauvages), une augmentation du nombre de cellules en migration dans la couche moléculaire (située entre les couches granulaires externe et interne) et un épaississement considérable de la couche granulaire interne [10]. L'invalidation du gène de la caspase-3 provoque donc, au niveau du cortex cérébelleux, des effets semblables à ceux induits par l'administration de PACAP, suggérant que l'action neurotrophique de ce dernier pourrait passer par l'inhibition du processus apoptotique. De fait, une étude récente montre que le PACAP bloque l'activité de la caspase-3 dans les cellules en grain en culture (*figure 2*). Par ailleurs, un inhibiteur de la caspase-3, le Z-DEVD-FMK, tout comme le PACAP, favorise la survie des cellules granulaires *in vitro* [11]. Il est maintenant bien établi que le récepteur PAC1 présent au niveau des cellules en grain du cervelet est couplé à la fois à l'adénylyl cyclase et à la phospholipase C [12]. L'addition *in vitro* d'un analogue perméant de l'AMPc ou d'un ester de phorbol à des cellules en grain mime l'effet inhibiteur du PACAP sur la caspase-3. Réciproquement, l'incubation de cellules en grain en présence d'inhibiteurs de protéine kinase A (PKA) et de protéine kinase C (PKC) bloque complètement l'action du PACAP sur la caspase-3. À l'inverse, un inhibiteur de la kinase ERK ne modifie pas l'action du PACAP. Enfin, l'effet du PACAP sur l'activité de la caspase-3 ne nécessite pas de néosynthèse pro-

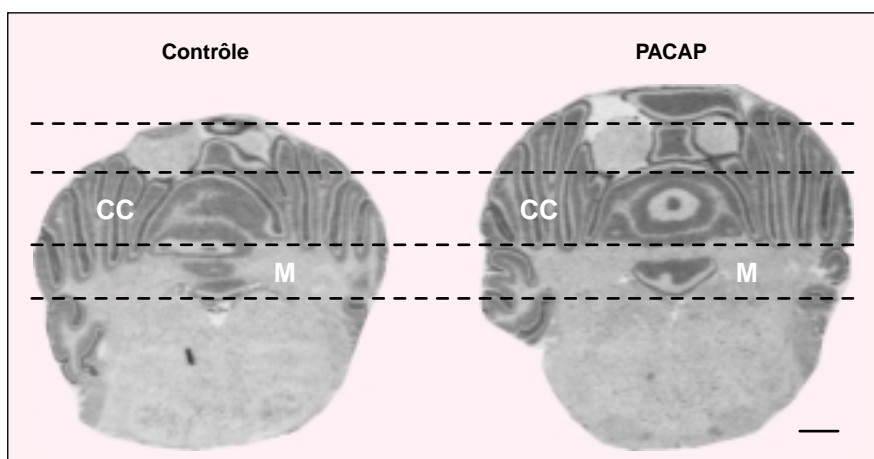


Figure 1. **Effet neurotrophique du PACAP sur le cervelet du rat pendant le développement.** Des rats âgés de 8 jours ont reçu 2 injections de solution saline ou de PACAP (1 µg) dans l'espace subarachnoïdien, à la surface du cervelet, à 48 h d'intervalle. On note que le PACAP provoque une augmentation de l'épaisseur du cortex cérébelleux (CC) sans modifier celle de la médulla (M). Barre d'échelle: 1 mm.

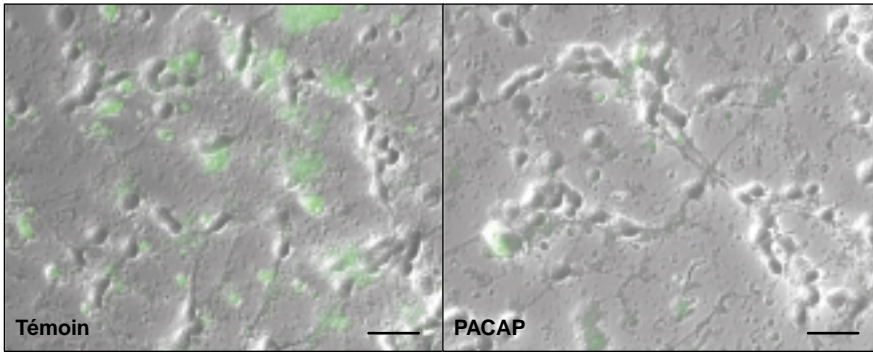


Figure 2. **Effet du PACAP sur l'activité de la caspase-3 dans les cellules en grain du cervelet.** Les neurones ont été cultivés pendant 24 h en l'absence ou en présence de PACAP ( $10^{-7}$  M). La forme active de la caspase-3 (ici en vert) est visualisée par microscopie confocale à l'aide de l'inhibiteur fluorescent FITC-VAD-FMK. Barre d'échelle: 20  $\mu$ m.

téique [11]. L'ensemble de ces données indique que le neuropeptide PACAP prévient la mort des cellules granulaires en inhibant la maturation de la caspase-3 *via* l'activation d'une PKA et d'une PKC mais sans l'intervention d'une MAP-kinase (figure 3).

### Quelles perspectives thérapeutiques peut-on envisager ?

Des études récentes ont montré que la caspase-3 est impliquée dans les processus de neurodégénérescence associés à la maladie de Parkinson [13] et à la maladie d'Alzheimer [14]. Une activation de la caspase-3 a également été observée au cours du processus ischémique [15]. L'effet inhibiteur du PACAP sur l'activité de la caspase-3 permet donc d'envisager l'utilisation éventuelle d'agonistes sélectifs dans le traitement de certaines maladies du système nerveux. A ce jour, les travaux les plus prometteurs portent sur la capacité du PACAP de réduire la zone infarctée créée par la survenue d'accidents vasculaires cérébraux. Il a ainsi été montré que l'injection intracérébroventriculaire ou intraveineuse de PACAP protège les neurones de la région CA1 de l'hippocampe des conséquences d'une ischémie expérimentale chez le rat [16]. Il s'avère que le PACAP, malgré sa masse moléculaire élevée et son caractère hydrophile, peut passer la barrière hémato-encéphalique en empruntant un système de transport actif appelé PTS-6 (*peptide transport system*) [17]. A titre de

comparaison, le taux de passage du PACAP au travers de la barrière hémato-encéphalique est 6 fois supérieur à celui de la morphine [18]. Il a aussi été montré que l'ischémie aug-

mente l'efficacité de ce transporteur et facilite ainsi l'apport de PACAP au cerveau [16, 17]. Il est intéressant de souligner que le PACAP peut réduire de 50% la taille de la zone infarctée même lorsqu'il est administré 4 heures après le début de l'ischémie (figure 4), ce qui ouvre des perspectives thérapeutiques intéressantes [19].

D'autres travaux indiquent que le PACAP protège également les neurones dopaminergiques de la mort induite par la 6-hydroxydopamine [20]. Cette observation suggère que le PACAP pourrait aussi avoir la capacité de réduire la dégénérescence neuronale observée au cours de certaines pathologies neurodégénératives comme la maladie de Parkinson ou la maladie d'Alzheimer. Parallèlement, les chimistes tentent actuellement de concevoir des analogues lipophiles du PACAP, dont la

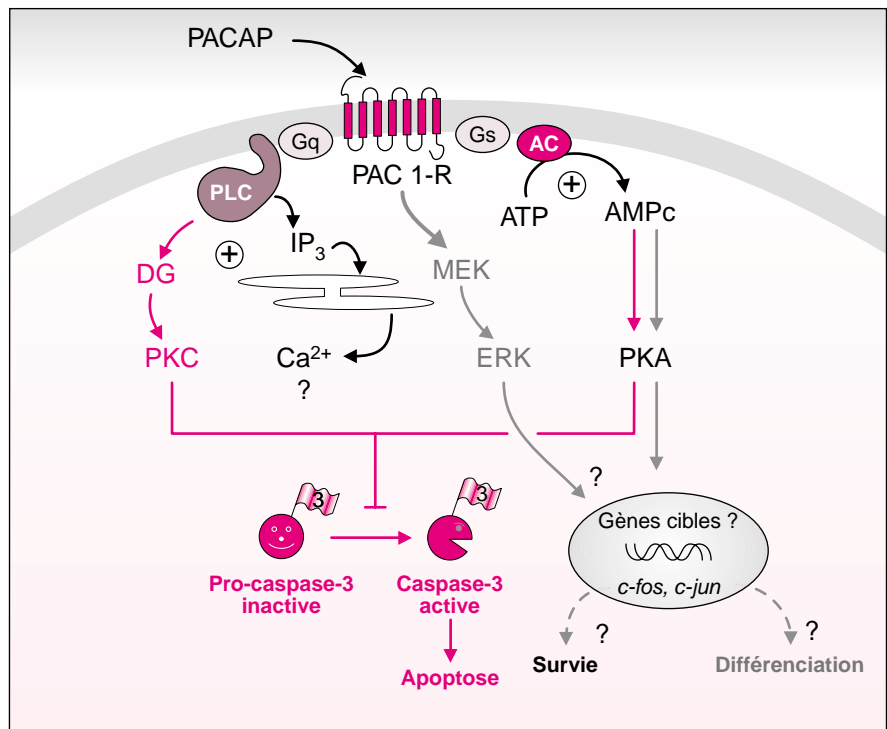


Figure 3. **Représentation schématique des systèmes de transduction associés au récepteur PAC1-R dans les cellules granulaires immatures du cervelet de rat.** En rouge sont représentées les voies de transduction conduisant à l'inhibition de l'apoptose. En gris les voies de transduction pouvant conduire à une régulation génique à plus long terme. AC: adénylyl cyclase; AMPc: adénosine monophosphate cyclique; DG: diacylglycérol; ERK: extracellular regulated kinase;  $IP_3$ : inositol trisphosphate; MEK: mitogen extracellular regulated kinase; PAC1-R: récepteurs spécifiques du PACAP; PKA: protéine kinase A; PKC: protéine kinase C; PLC: phospholipase C; Gq, Gs: petites protéines G.

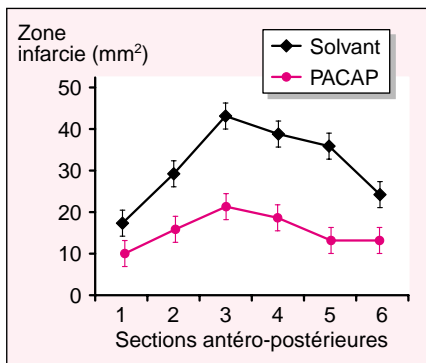


Figure 4. Effet d'un traitement par le PACAP sur l'ischémie cérébrale chez le rat. L'ischémie a été induite par occlusion de l'artère cérébrale centrale pendant 2 heures. Le PACAP a été administré par voie intraveineuse 4 heures après la période d'ischémie. Chaque section de cerveau a une épaisseur de 2 mm. On note qu'au centre de la zone infarctée, le traitement par le PACAP réduit de 50 % la zone infarctée (reproduit avec permission de [19]).

biodisponibilité et la demi-vie seraient supérieures à celles du peptide natif. Des résultats encourageants ont d'ores et déjà été obtenus avec un court fragment de 4 acides aminés sur lequel a été greffé un groupement stéaryl. Administré par voie intranasale, ce peptide exerce un puissant effet neuroprotecteur chez le rat déficient en acétylcholine et chez la souris dont le gène de l'Apolipoprotéine E a été invalidé [21]. Toutefois, les applications cliniques des effets neuroprotecteurs du PACAP nécessiteront très probablement le développement d'agonistes non peptidiques sélectifs correspondant aux différents variants du récepteur PAC1 afin de cibler de façon plus spécifique les populations de neurones atteints, tout en limitant les effets secondaires. Par ailleurs, les études sur le mode d'action anti-apoptotique du PACAP doivent être poursuivies afin d'élucider les mécanismes mis en jeu dans les effets neuroprotecteurs du peptide ou de ses agonistes ■

## RÉFÉRENCES

1. Miyata A, Arimura A, Dahl RR, *et al.* Isolation of a novel 38 residue-hypothalamic polypeptide which stimulates adenylate

cyclase in pituitary cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1989; 164: 567-74.

2. Vaudry D, Gonzalez BJ, Basille M, Yon L, Fournier A, Vaudry H. Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide and its receptors: from structure to functions. *Pharmacol Rev* 2000; 52: 269-324.

3. Basille M, Vaudry D, Coulouarn Y, *et al.* Comparative distribution of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) binding sites and PACAP receptor mRNAs in the rat brain during development. *J Comp Neurol* 2000; 425: 495-509.

4. Nielsen HS, Hannibal J, Fahrenkrug J. Expression of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) in the postnatal and adult rat cerebellar cortex. *NeuroReport* 1998; 9: 2639-42.

5. Lu N and DiCicco-Bloom E. Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide is an autocrine inhibitor of mitosis in cultured cortical precursor cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94: 3357-62.

6. Gonzalez BJ, Basille M, Vaudry D, Fournier A, Vaudry H. Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide promotes cell survival and neurite outgrowth in rat cerebellar neuroblasts. *Neuroscience* 1997; 78: 419-30.

7. Wolf N, Kriegstein K. Phenotypic development of neonatal rat chromaffin cells in response to adrenal growth factors and glucocorticoids: focus on pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide. *Neurosci Lett* 1995; 200: 207-10.

8. Vaudry D, Gonzalez BJ, Basille M, Fournier A, Vaudry H. Neurotrophic activity of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide on rat cerebellar cortex during development. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96: 9415-20.

9. Mignon A, Rouquet N, Joulin V. Les caspases, les protéines à cystéine de l'apoptose: un enjeu thérapeutique pour demain. *Med Sci* 1998; 14: 9-17.

10. Kuida K, Zheng TS, Na S, *et al.* Decreased apoptosis in the brain and premature lethality in CPP32-deficient mice. *Nature* 1996; 384: 368-72.

11. Vaudry D, Gonzalez BJ, Basille M, *et al.* Inhibition of caspase-3/ CPP32 mediates the antiapoptotic effect of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide on cerebellar granule cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97: 13390-5.

12. Basille M, Gonzalez BJ, Desrues L, Demas M, Fournier A, Vaudry H. Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) stimulates adenylyl cyclase and phospholipase C activity in rat cerebellar neuroblasts. *J Neurochem* 1995; 65: 1318-24.

13. Hartmann A, Hunot S, Michel PP, *et al.* Caspase-3: a vulnerability factor and final effector in apoptotic death of dopaminergic neurons in Parkinson's disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97: 2875-80.

14. Gervais FG, Xu D, Robertson GS, *et al.* Involvement of caspases in proteolytic cleavage of Alzheimer's amyloid-beta precursor protein and amyloidogenic A beta peptide formation. *Cell* 1999; 97: 395-406.

15. Chen J, Nagayama T, Jin K, *et al.* Induction of caspase-3-like protease may mediate delayed neuronal death in the hippocampus after transient cerebral ischemia. *J Neurosci* 1998; 18: 4917-28.

16. Uchida D, Arimura A, Somogyvari-Vigh A, Shioda S, Banks W. Prevention of ischemia-induced death of hippocampal neurons by pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide. *Brain Res* 1996; 736: 280-6.

17. Mizushima H, Banks WA, Dohi K, Shioda S, Matsumoto H, Matsumoto K. The effect of cardiac arrest on the permeability of the mouse blood-brain and blood-spinal cord barrier to pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP). *Peptides* 1999; 20: 1337-40.

18. Banks WA, Uchida D, Arimura A, Somogyvari-Vigh A, Shioda S. Transport of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide across the blood-brain barrier and the prevention of ischemia-induced death of hippocampal neurons. *Ann N Y Acad Sci USA* 1996; 805: 270-7.

19. Reglodi D, Somogyvari-Vigh A, Vigh S, Kozicz T, Arimura A. Delayed systemic administration of PACAP38 is neuroprotective in transient middle cerebral artery occlusion in the rat. *Stroke* 2000; 31: 1411-7.

20. Takei N, Sköglösa Y, Lindholm D. Neurotrophic and neuroprotective effects of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) on mesencephalic dopaminergic neurons. *J Neurosci Res* 1998; 54: 698-706.

21. Gozes I, Perl O, Giladi E, *et al.* Mapping the active site in vasoactive intestinal peptide to a core of four amino acids: neuroprotective drug design. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96: 4143-8.

**David Vaudry**

**Bruno J. Gonzalez**

**Magali Basille**

**Tommy Pamantung**

**Marc Fontaine**

**Hubert Vaudry**

*Institut fédératif de recherches multidisciplinaires sur les peptides (IFRMP 23), Laboratoire de neuroendocrinologie cellulaire et moléculaire, Université de Rouen, 76821 Mont-Saint-Aignan Cedex, France.*

TIRÉS À PART

H. Vaudry.