

Les adénylyl cyclases des mammifères

L'un des paradigmes actuels de l'endocrinologie est qu'à chaque fonction de signalisation correspond non pas une protéine, mais une famille de protéines [1]. C'est le cas des récepteurs hormonaux, des protéines G, des protéine kinases, etc. Il aurait été étonnant que l'adénylyl cyclase, glycoprotéine membranaire et enzyme clé de la synthèse de l'AMPc, échappât à cette loi. On soupçonnait depuis longtemps l'existence de formes multiples de l'enzyme, différant par leur sensibilité au complexe calmoduline-calcium ou par la taille (de 120 à 150 kDa, différence sans doute liée au degré de glycosylation). On connaissait aussi depuis longtemps une « petite » forme (46 kDa) testiculaire insensible aux régulations classiques (GTP, forskoline, calmoduline) à l'exception de l'adénosine [2].

Grâce aux différents travaux de clonage réalisés depuis la première publication du groupe de Gilman en 1989, on dénombre actuellement huit formes d'adénylyl cyclase, sans compter la petite forme testiculaire dont l'ADNc n'a toujours pas été cloné. La première adénylyl cyclase de mammifère (type I) a été caractérisée à partir d'une librairie d'ADNc de cerveau de bœuf [3]. Depuis, les ADNc de sept nouveaux types d'adénylyl cyclase de mammifère ont été clonés [4, 5]. Les séquences codant pour les types II à VI ont été entièrement identifiées et séquencées, alors que les types VII et VIII n'ont été, à ce jour, que partiellement caractérisés, à partir de clones d'ADNc de différents tissus de rat, de chien, de souris et

d'homme, et de diverses lignées cellulaires (Tableau I). Ces ADNc codent pour des protéines comportant entre 1 090 et 1 184 acides aminés qui présentent une structure quasiment dupliquée (figure 1). Les deux larges domaines hydrophobes, M1 et M2, contiennent chacun six segments transmembranaires et trois régions cytosoliques (l'extrémité N-terminale et deux larges domaines cytoplasmiques C1 et C2). Les deux portions intracellulaires C1 et C2 sont fortement similaires entre elles. Certaines portions de séquences sont même identiques avec des régions des guanylyl cyclases. En revanche, la séquence des traversées membranaires est très différente d'une forme à l'autre. Cette topographie ressemble à celle des canaux calcium sensibles aux dihydropyridines, des canaux potassium, des transporteurs du glucose, et de la protéine P, le produit du gène *MDR* (multi-drug resistance), protéines qui jouent un rôle de transporteur et possèdent des sites spécifiques pour l'ATP. L'étude de la structure de la protéine a même amené Krupinski *et al.* [3] à proposer un rôle supplémentaire, hypothétique, de transporteur pour l'adénylyl cyclase.

Phylogénie et répartition

On retrouve une activité adénylyl cyclase dans pratiquement toutes les espèces. Comme l'a bien démontré Danchin [6], il existe en fait trois familles de protéines, sans caractères de similarité entre elles, qui possèdent cette activité (1) : les adénylyl cyclases dites « toxiques » ; sécrétées

par *Bordetella pertussis* et *Bacillus anthracis*, elles pénètrent dans leurs cellules hôtes où elles sont activées par la calmoduline qui y est présente. Elles ont une activité spécifique très élevée et contiennent une séquence GXXXXGKS/T*, spécifique de la liaison de l'ATP; (2) les adénylyl cyclases des entérobactéries : présentes dans *E. coli*, *S. typhimurium*, *E. chrysantemi* et aussi dans *P. multivida*, elles possèdent à leur extrémité C-terminale un domaine régulateur, site de l'action inhibitrice de la protéine CAP (catabolite activator protein); (3) ; la famille des adénylyl-guanylyl cyclases des eucaryotes inclut aussi l'adénylyl cyclase de *Rhizobium meli-*

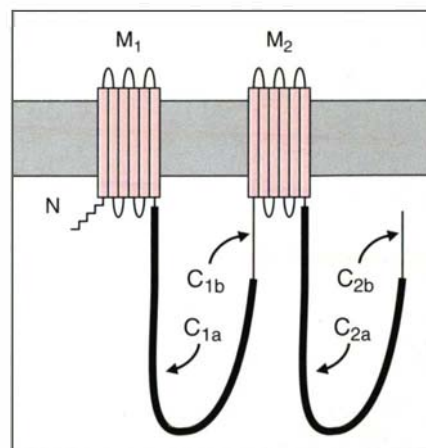


Figure 1. **Structure des adénylyl cyclases eucaryotes.** Les domaines hydrophobes M₁ et M₂ contiennent chacun six segments transmembranaires. Les domaines hydrophiles N, C_{1a}, C_{1b}, C_{2a} et C_{2b} sont des domaines cytoplasmiques.

Type	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII
Nombre d'acides aminés	1 134	1 090	1 144	1 064	1 184	1 164, 1 180	clonage de l'ADNc non achevé	clonage de l'ADNc non achevé
Poids moléculaire	124 000	123 000	129 000	119 000	130 800	130 000	—	—
ARN messenger (kb)	11,5	4,1-4,2	4,7	3,5	5-7	6,1-6,6 (2 variant en 5')	6,7	10,5
Tissu d'origine	cerveau (bœuf et homme)	cerveau (rat et homme)	tissu olfactif (rat)	testicule (rat)	cœur (chien), foie et rein (rat)	cellules S49 et NC20, cœur (chien, rat), foie et rein (rat)	cellules S49, HEL, HEK293	cerveau (homme, rat)
Expression (Northern)	cerveau	cerveau, poumon, cœur	épithélium olfactif, cerveau	cerveau, foie, cœur, rein, poumon	cerveau, foie, cœur, rein, poumon, testicule	cerveau, foie, cœur, rein, poumon, testicule	cerveau, cœur, foie	cerveau, testicule
Chromosome humain	7p12	5p15	2p23	(14)	3q21	12q13	—	8q24

loti (gram) et de *Brevilacterium lignifaciens* (gram⁺). Ces cyclases ne contiennent pas de séquence GXXXXGKS/T* . Entre dans cette famille la cyclase de levure qui n'est pas activée par une protéine G hétérotrimérique, mais par RAS, l'équivalent chez la levure des petites protéines G de type p21^{ras}.

Entre les adénylyl cyclases des mammifères connues à ce jour, il existe une similarité globale de 50 %. On peut distinguer en gros quatre sous-familles : le type I, dont le type VIII ne serait pas trop éloigné ; le type II auquel se rattachent les types IV et VII ; les types V et VI ; le type III. A l'heure actuelle, on ne sait pas encore si la « petite » forme testicu-

laire provient d'un gène codant pour une « grande » forme par épissage différentiel ou utilisation d'un promoteur spécifique dans la lignée spermatocytaire, ou bien si elle résulte de l'expression d'un gène spécifique.

En ce qui concerne la localisation tissulaire des formes connues, des travaux publiés à ce jour et qui ont surtout porté sur le rat, il apparaît que tous les types d'adénylyl cyclase et plus spécifiquement les types I, II, III et VIII sont exprimés dans le cerveau. Les types IV, V et VI sont distribués plus largement dans le cerveau, le foie, le cœur, le rein, le poumon et le testicule, et le type VII dans le cerveau et le cœur. A ce jour, ces distributions sont surtout connues par analyse des ARN en *Northern blot*. Peu d'études systématiques par hybridation *in situ* ont été pratiquées [7-9]. Des anticorps spécifiques ne sont pas encore disponibles.

Structure et activité

Diverses formes, tronquées ou intactes, des adénylyl cyclases, ont été exprimées dans quelques lignées cellulaires où l'activité endogène était faible. Des travaux réalisés avec le type I, il ressort que les deux boucles cytoplasmiques sont indispensables à l'activité catalytique, qu'elles soient exprimées indépendamment ou sous forme d'une molécule unique. Il n'est pas impossible que la mobilité relative des deux portions de la molécule native dans la membrane plasmique joue un rôle important dans l'activité de l'enzyme, et que la forskoline, activateur quasi universel mais mystérieux, agisse sur ces phénomènes de fluidité [5].

Les dosages des activités adénylyl cyclasiques sur des préparations membranaires isolées ont permis de décrire toute une série de régula-

* Code des acides aminés à une lettre: G: Gly; K: Lys; S: Ser; T: Thr; X: n'importe quel acide aminé.

tions, positives ou négatives. De nombreuses indications indirectes conduisent à postuler que chaque cellule comporte plus d'un type de cyclase. Les techniques actuelles de transfection, dans des systèmes cellulaires privilégiés, permettent d'affiner les descriptions anciennes et de répondre en particulier à la question: toutes les adénylyl cyclases sont-elles sensibles aux mêmes régulations? Ce travail d'analyse ne fait que débiter. Il éclairera sans aucun doute d'un jour nouveau les régulations fines de la synthèse de l'AMPc, spécifiques de tissus. On peut, d'ores et déjà, décrire quelques différences majeures entre les divers types enzymatiques connus [5, 6].

L'activation de l'adénylyl cyclase est classiquement due à la sous-unité α de la protéine Gs, sous sa forme liant le GTP. Le site d'interaction de Gs α avec les adénylyl cyclases n'a pas été identifié. En revanche, un site d'interaction du complexe calmoduline-calcium, qui active directement les cyclases de type I et III, indépendamment des protéines G, a été étudié sur le type I par mutagenèse dirigée [10]. Ce site implique, en particulier, la phénylalanine en position 503, car son remplacement par une arginine supprime entièrement la sensibilité de l'enzyme à la calmoduline *in vitro*, et à toute augmentation de calcium en système cellulaire.

Les mécanismes d'inhibition sont moins bien connus. Classiquement, on attribuait l'inhibition de l'activité à la libération des sous-unités $\beta\gamma$ à partir de Gi, sous-unités qui pouvaient alors lier, et donc inactiver, les sous-unités α s libres. Deux mécanismes complémentaires viennent corriger cette hypothèse: (1) la sous-unité α i peut inhiber directement l'adénylyl cyclase, comme cela a été montré dans un certain nombre de cas [11] et plus directement pour les types II, III et VI. Il est intéressant de noter que l'inhibition du type II est levée par la protéine kinase C; (2) les sous-unités $\beta\gamma$ elles-mêmes peuvent avoir un rôle direct. Elles

Tableau II	
RÉGULATIONS SPÉCIFIQUES DE QUELQUES TYPES D'ADÉNYLYL CYCLASES	
Type I.....	Activé par calmoduline et PKC, inhibé par G $\beta\gamma$ et adénosine
Type II..... (Types IV et VII?)	Activé par G $\beta\gamma$ et PKC (++), inhibé par G α i et adénosine
Type III.....	Activé par calmoduline et PKC, inhibé par α i et adénosine
Types V/VI.....	Inhibé par G α i, le calcium à faible concentration, PKA et l'adénosine

Tous les types sont activés par Gs α et forskoline, à l'exception du type testiculaire.

inhibent le type I, mais stimulent les types II et IV si ces derniers ont été préalablement activés par Gs α [12]. Elles n'ont aucun effet direct sur les types IV, V et VI. Le calcium, à une concentration micromolaire, peut aussi inhiber directement, mais partiellement, les cyclases de type V et VI. En revanche, l'adénosine, par l'intermédiaire d'un site dit P, inhibe probablement toutes les cyclases, bien que cet effet n'ait été démontré que pour les types I, V et VI [5].

Enfin, la protéine kinase C active fortement la cyclase de type II, modérément les types I et III, et pas du tout les types IV, V et VI [13-15]. La protéine kinase A inhibe sans doute certains types de cyclases, bien que cela n'ait pas été directement montré. Ce phénomène est vraisemblable, car toutes les cyclases, sauf le type IV, contiennent des sites de phosphorylation potentiels par la PKA. Il pourrait rendre compte de certains phénomènes de désensibilisation hétérologues [5]. Certaines de ces régulations sont résumées dans le *tableau II*.

Localisation chromosomique

La localisation chromosomique chez l'homme des cyclases de type II, III,

V, VI et VIII a été faite par notre laboratoire en collaboration avec le groupe de M.G. Mattéi (Inserm U. 242) [16, 17], et celles des types I et IV par des groupes américains. Le résultat majeur de ces études, indiqué dans le *tableau I*, est que le gène de chaque type d'adénylyl cyclase est localisé sur un chromosome différent. Cela indique bien sûr que l'évolution phylogénique des divers types à partir d'un ancêtre commun avec les guanylyl cyclases est ancienne. On peut aussi conclure que chaque cyclase voit sa synthèse propre réglée par un promoteur spécifique. Il est à noter que les gènes des guanylyl cyclases membranaires ou solubles ont été aussi localisés sur les chromosomes différents 1, 4, 5 et 9 [18]. A ce jour, aucune maladie génétique n'a été attribuée à une anomalie de l'adénylyl cyclase. Dans un article récent [19], Berry-Kravis et Huttenlocher ont décrit une diminution de la production d'AMPc dans des plaquettes provenant de sujets présentant un syndrome de l'X fragile; parmi les cyclases connues actuellement, l'absence de gène sur le chromosome X rend une implication directe de l'enzyme au cours du syndrome de l'X fragile peu vraisemblable. En revanche, il n'est pas

impossible qu'une mutation d'un seul des types d'adényl cyclase puisse entraîner un tableau clinique très spécifique. En particulier, à l'image des résultats rapportés pour des protéines G ou certains récepteurs hormonaux, on pourrait penser qu'une mutation découplant l'activité cyclasique de toute régulation pourrait transformer l'enzyme en oncogène.

Vers une physiopathologie spécifique

Depuis la découverte du système de l'AMPc par Sutherland, à la fin des années 1950, on n'a apprécié l'activité de synthèse du second messager que par le dosage global de l'AMPc intracellulaire, ou celui de l'activité cyclasique dans des préparations d'homogénats ou des membranes purifiées.

La connaissance dont l'on dispose à l'heure actuelle d'au moins neuf types de cyclases (et sans doute plus) conduit à poser une série de questions nouvelles : combien y a-t-il de cyclases différentes dans une même cellule ? Comment cela modifie-t-il la compréhension des régulations cellulaires ? Comment s'établit la spécificité tissulaire au cours du développement ? Comment les différents promoteurs sont-ils réglés ? Comme pour les questions analogues qui portent sur les récepteurs hormonaux et les protéines G, il s'agit là de problèmes fondamentaux en biologie du développement. En dehors de l'hybridation *in situ* (par exemple, voir [7-9]), on peut sans crainte de se tromper prédire que seule l'utilisation systématique d'outils moléculaires (dosages spécifiques des ARNm ou des protéines, utilisation de systèmes antisens, etc.) ou d'approches expérimentales nouvelles (mutagenèse, recombinaison homologue, transgénèse), permettra des progrès dans le domaine ■

TIRÉS A PART

J. Hanoune.

m/s n° 4 vol. 10, avril 94

RÉFÉRENCES

- Hanoune J. L'endocrinologie combinatoire. *médecine/sciences* 1993, 9 : 1331-3.
- Henry D, Ferino F, Tomova S, Ferry N, Stengel D, Hanoune J. Inhibition of the catalytic subunit of ram sperm adenylyl cyclase by adenosine. *Biochem Biophys Res Commun* 1986 ; 137 : 970-7.
- Krupinski J, Coussen F, Bakalyar HA, Tang WJ, Feinstein PG, Orth K, Slaughter C, Reed RR, Gilman AG. Adenylyl cyclase amino acid sequence : possible channel- or transporter-like structure. *Science* 1989 ; 244 : 1558-64.
- Krupinski J, Lehman TC, Frankenfield CD, Zwaagstra JC, Watson PA. Molecular diversity in the adenylyl cyclase family. *J Biol Chem* 1992 ; 267 : 24858-62.
- Iyengar R. Molecular and functional diversity of mammalian G_s-stimulated adenylyl cyclases. *FASEB J* 1993 ; 7 : 768-75.
- Danchin A. Phylogeny of adenylyl cyclases. In : Shenolikar S, Nairn AC, eds. *Advances in second messenger and phosphoprotein research*. New York : Raven Press, 1993 : 109-62.
- Xia Z, Refsdal CD, Merchant KM, Dorsa DM, Storm DR. Distribution of mRNA for the calmodulin-sensitive adenylyl cyclase in rat brain : expression in areas associated with learning and memory. *Neuron* 1991 ; 6 : 431-43.
- Matsuoka I, Giuili G, Poyard M, Stengel D, Parma S, Guellaën G, Hanoune J. Localization of adenylyl and guanylyl cyclase in rat brain by *in situ* hybridization : comparison with calmodulin mRNA distribution. *J Neuroscience* 1992 ; 12 : 3350-60.
- Furuyama T, Inagaki S, Takagi H. Distribution of type II adenylyl cyclase mRNA in the rat brain. *Mol Brain Res* 1993 ; 19 : 165-70.
- Wu Z, Wong ST, Storm DR. Modification of the calcium and calmodulin sensitivity of the type I adenylyl cyclase by mutagenesis of its calmodulin binding domain. *J Biol Chem* 1993 ; 268 : 23766-8.
- Taussig R, I' Niguez-Iluhi JA, Gilman AG. Inhibition of adenylyl cyclase by G_{iα}. *Science* 1993 ; 261 : 218-21.
- Tang WJ, Gilman AG. Type-specific regulation of adenylyl cyclase by G protein βγ subunits. *Science* 1991 ; 254 : 1500-3.
- Chen J, Iyengar R. Inhibition of cloned adenylyl cyclases by mutant-activated G_s-α and specific suppression of type II adenylyl cyclase inhibition by phorbol ester treatment. *J Biol Chem* 1993 ; 268 : 12253-6.
- Jacobowitz O, Chen J, Premont RT, Iyengar R. Stimulation of specific types of G_s-stimulated adenylyl cyclases by phorbol ester treatment. *J Biol Chem* 1993 ; 268 : 3829-32.
- Yoshimura M, Dermot Cooper MF. Type-specific stimulation of adenylyl cyclase by protein kinase C. *J Biol Chem* 1993 ; 268 : 4604-7.
- Stengel D, Parma J, Gannagé MH, Roedel N, Mattei MG, Hanoune J. Different chromosomal localization of two adenylyl cyclase genes expressed in human brain. *Hum Genet* 1992 ; 90 : 126-30.
- Haber N, Stengel D, Defer N, Roedel N, Mattei MG, Hanoune J. Chromosomal mapping of human adenylyl cyclase genes type III, type V and type VI. *Hum Genet* 1994 (sous presse).
- Giuili G, Roedel N, Scholl U, Mattei MG, Guellaën G. Colocalization of the genes coding for the α₃ and β₃ subunits of soluble guanylyl cyclase to human chromosome 4 at q31.3-q33. *Hum Genet* 1993 ; 91 : 257-60.
- Berry-Kravis E, Huttenlocher PR. Cyclic AMP metabolism in fragile X syndrome. *Ann Neurol* 1992 ; 31 : 22-6.

Remerciements

Certains des travaux personnels décrits ici ont bénéficié d'un soutien financier de l'Inserm, de l'université Paris-XII, de la Fondation de France, du MRT et de la Caisse Nationale d'Assurance Maladie.

Jacques Hanoune

Directeur de recherche à l'Inserm, Inserm U.99, hôpital Henri-Mondor, 94010 Créteil, France.