

Gènes de régulation de la voie de l'AMPc, résistance hormonale et dysplasie squelettique

Caroline Silve^{1,2}

¹ Service de Génétique et Biochimie Moléculaires, AP-HP Hôpital Cochin, Paris, France et Centre de référence des maladies rares du métabolisme phosphocalcique, Filière OSCAR

² UMR-S 1169 Inserm-UP Sud, Le Kremlin-Bicêtre, France

Auteur correspondant : Caroline Silve, caroline.silve@inserm.fr

Reçu le 20 Mai 2016

Résumé – Comme un très grand nombre de récepteurs couplés aux protéines G (RCPG), le PTH1R signale par l'AMPc dont le principal effecteur est la protéine kinase A (PKA). Le PTH1R a la particularité d'être activé de façon équipotente par deux ligands, l'hormone parathyroïdienne (PTH) et son peptide apparenté, le PTHrP. La PTH est une hormone clef du métabolisme phosphocalcique. Le PTHrP est une protéine du développement, qui joue un rôle essentiel paracrine en particulier dans la croissance osseuse endochondrale. Du fait de son double rôle endocrine et paracrine, les pathologies associées à un défaut d'activation du PTH1R et de sa voie de signalisation présentent deux versants des anomalies du métabolisme phosphocalcique, associées ou non à un phénotype squelettique. De plus, la voie de signalisation Gsa/GNAS-AMPc-PKA étant partagée par de nombreux agonistes, des traits phénotypiques pathologiques non spécifiques de l'activation du PTHR1 peuvent être observés chez ces patients. Nous discutons trois pathologies causées par des mutations de trois gènes codant pour trois acteurs clefs de la voie de signalisation de l'AMPc, le gène *GNAS* qui code pour la protéine Gsa, le gène *PRKAR1A* qui code pour la sous-unité régulatrice PRKAR1A de la PKA, et le gène *PDE4D*, qui code pour une des sous-familles de phosphodiéstérases. S'il existe un chevauchement phénotypique entre les patients porteurs de mutations dans ces gènes, les patients présentent aussi des caractéristiques spécifiques des mutations de ces gènes qui illustrent les contributions physiopathologiques uniques de Gs, PRKAR1A et PDE4D dans la signalisation AMPc-PKA. Ainsi, ces maladies monogéniques illustrent la spécificité de la voie de l'AMPc, enjeu majeur d'étude de cette voie de signalisation activée par de nombreux agonistes et exprimée dans de multiples tissus.

Mots clés : Résistance à la PTH / cAMP / dysplasies squelettiques / PKA / PDE4D

Abstract – Genes in the cAMP pathway causing skeletal dysplasia with or without hormonal resistance.

Acrodysostosis refers to a heterogeneous group of rare skeletal dysplasia that share characteristic features including severe brachydactyly, facial dysostosis and nasal hypoplasia. The literature describing acrodysostosis cases has been confusing because some reported patients may have had other phenotypically related diseases presenting Albright Hereditary Osteodystrophy (AHO) such as pseudohypoparathyroidism type 1a (PHP1a) or pseudopseudohypoparathyroidism (PPHP). A question has been whether patients display or not abnormal mineral metabolism associated with resistance to PTH and/or resistance to other hormones that bind G-protein coupled receptors (GPCR) linked to Gsa, as observed in PHP1a. Defects in two genes, *PRKAR1A* and *PDE4D*, both important players in the GPCR-Gsa-cAMP-PKA signaling, were recently identified in patients affected with acrodysostosis. This has helped clarify some issues regarding the heterogeneity of acrodysostosis, in particular the presence of hormonal resistance. Two different genetic and phenotypic syndromes are now identified, both with a similar bone dysplasia: acrodysostosis type 1 due to *PRKAR1A*

defects, and acrodysostosis type 2, due to PDE4D defects. The existence of hormone resistance is typical of the acrodysostosis type 1 syndrome. We discuss here the *PRKAR1A* and *PDE4D* gene defects and phenotypes identified in acrodysostosis syndromes, in particular in regard to phenotypically related diseases caused by Gsa gene defects in the same signaling pathway.

Key words: GPCR / PTH resistance / skeletal dysplasia / PRKAR1A / PDE4D

Abréviations

AHO	ostéodystrophie d'Albright
<i>GNAS</i>	gène codant pour la protéine Gsa
Gsa	sous-unité alpha ubiquitaire des protéines G hétérotrimériques
PDE	phosphodiesterases
PHP	pseudohypoparathyroïdie
PHP1a	forme principale de PHP
PKA	protéine kinase A
PRKAR1A	principale sous-unité régulatrice de la PKA
PTH	hormone parathyroïdienne
PTH1R	récepteur de la PTH
PTHrP	<i>parathyroid related peptide</i>
RCPG	récepteurs couplés aux protéines G

Le métabolisme du calcium et du phosphate, deux ions clés dans le métabolisme osseux, est étroitement régulé par l'hormone parathyroïdienne (PTH) de concert avec le 1,25(OH)₂D (calcitriol, métabolite actif de la vitamine D). La PTH régule la réabsorption tubulaire rénale du calcium et du phosphate, la synthèse du métabolite actif de la vitamine D, le 1,25(OH)₂D, et le remodelage osseux. La PTH agit sur un récepteur à 7 domaines transmembranaires de classe II couplé aux protéines G (RCPG), le PTH1R (Jüppner, 2012).

Comme un très grand nombre de RCPG, dont les récepteurs de nombreuses hormones peptidiques (Parnot *et al.*, 2002), le PTH1R signale par la voie de l'AMPc. Le récepteur activé par la liaison du ligand est couplé par la sous-unité alpha (Gsa) ubiquitaire des protéines G hétérotrimériques à l'adénylcyclase, avec augmentation de la production d'AMPc. Le principal effecteur de ce second messager est la protéine kinase A (PKA). L'AMPc active la PKA en se liant aux sous-unités régulatrices de la PKA et libérant les sous-unités catalytiques (Taylor *et al.*, 1990, 2012). La principale sous-unité régulatrice de la PKA est la PRKAR1A. L'AMPc est dégradé par les superfamilles des phosphodiesterases (PDE), dont la PDE4D (Houslay & Adams, 2003).

Le PTH1R a la particularité d'être activé de façon équipotente par deux ligands, la PTH, et le PTHrP (*parathyroid related peptide*), protéine du développement, qui joue un rôle essentiel paracrine en particulier au cours de la croissance osseuse en-

dochondrale (Jüppner, 2012). Le PTH1R assure donc deux rôles, endocrine et paracrine. Du fait de ce double rôle, les pathologies associées à un défaut d'activation du PTH1R et de sa voie de signalisation présentent deux versants, des anomalies du métabolisme phosphocalcique, associées ou non à un phénotype osseux et des anomalies du développement osseux endochondral. De plus, la voie de signalisation Gsa/GNAS-AMPc-PKA étant partagée par de nombreux agonistes, des traits phénotypiques pathologiques non spécifiques de l'activation du PTH1R peuvent être observés chez ces patients. Chez l'Homme, les anomalies « pertes de fonction » de GNAS sont responsables des pseudohypoparathyroïdies (PHP) (Bastepe & Jüppner, 2005; Linglart *et al.*, 2013). Selon la classification clinico-biologique classique, la forme principale de PHP, la PHP1a, est définie par l'association d'une ostéodystrophie d'Albright (AHO) (présentant en particulier une obésité, une brachymétoparapie, une petite taille et des ossifications ectopiques) avec une résistance à la PTH et à certaines autres hormones agissant par l'activation de l'adényl cyclase (TSH, gonadotropine, ACTH). La grande majorité des patients avec PHP1a ont une mutation perte de fonction de Gsa sur l'allèle maternel. La pseudopseudohypoparathyroïdie (PPHP) est causée par les mêmes mutations de Gsa, mais portées par l'allèle paternel. Les patients présentent seulement une AHO (sans résistance hormonale), liée à l'haploinsuffisance de Gsa. Ceci est dû au fait que le locus *GNAS* qui code pour Gsa, est soumis à l'empreinte génomique parentale (Bastepe & Jüppner, 2005; Linglart *et al.*, 2013). Gsa est produit à partir des deux allèles dans la plupart des tissus sauf le tubule proximal rénal (cible de la PTH), la thyroïde et l'hypophyse, où son expression est d'origine maternelle.

Les premières mutations perte de fonction de Gsa et l'empreinte parentale du locus *GNAS* ont été décrites en 1990. Plus récemment, des mutations de deux acteurs de la voie de l'AMPc localisés en aval de Gsa, la PRKAR1A et la PDE4D, ont été identifiées chez des patients atteints d'acrodysostose (Silve *et al.*, 2012). Le terme « acrodysostose » se réfère à un groupe hétérogène de dysplasies squelettiques rares qui partagent des signes phénotypiques entre eux et avec la PHP1a/PPHP. En particulier, ces patients

présentent un syndrome rappelant l'ostéodystrophie héréditaire d'Albright (AHO) mais plus sévère (Maroteaux & Malamut, 1968; Robinow *et al.*, 1971). Dans certaines descriptions cliniques, des patients présentaient aussi une résistance à la PTH, et dans quelques cas à d'autres hormones. Cependant, la description d'anomalies du métabolisme minéral avec résistance à la PTH et/ou à d'autres hormones qui se lient à des récepteurs couplés à la protéine G (G α) et à la voie de l'AMPc, comme observé dans la PHP1A, n'était pas toujours documentée. Il existait ainsi une certaine confusion entre les syndromes PHP1a/PPHP et l'acrodysostose avec et sans résistance hormonale. Le clonage de Gsa et l'identification des mutations de Gsa dans la PHP1a/PPHP ont permis de clairement délimiter les PHP1a/PPHP des acrodysostoses sur une base génétique. De même, l'identification des mutations des gènes *PRKAR1A* et *PDE4D* ont permis de clarifier la présence ou l'absence de résistance hormonale dans les acrodysostoses.

Notre équipe a identifié en 2011 chez trois patients non apparentés atteints d'acrodysostose une mutation hétérozygote *de novo* dans le gène codant pour la PRKAR1A, la sous-unité régulatrice de protéine kinase A dépendante de l'AMPc (PKA) (Linglart *et al.*, 2011). C'était une mutation non-sens localisée dans le dernier exon du gène PRKAR1A qui entraînait la synthèse d'une protéine tronquée des 13 derniers acides aminés du deuxième domaine de liaison à l'AMPc de la PRKAR1A. La PRKAR1A est la plus ubiquitaire des 4 sous-unités régulatrices de la PKA, elle-même un effecteur majeur de la voie de l'AMPc en aval de l'AMPc. Les patients porteurs de cette mutation présentaient aussi une résistance à plusieurs hormones, dont la PTH et la TSH, comme observé dans la PHP1A. Par contre, les patients porteurs d'une mutation de la PRKAR1A ont des valeurs basales d'AMPc urinaire élevées, alors que celles-ci sont basses chez les patients avec PHP1A et mutation de G α . La caractérisation fonctionnelle de la protéine PRKAR1A mutée indiquait un défaut de l'AMPc à se lier à la sous-unité régulatrice, avec comme conséquence un défaut de dissociation des sous-unités régulatrices des sous-unités catalytiques de la PKA en réponse à l'AMPc. Par la suite, d'autres mutations de la PRKAR1A ont été identifiées chez des patients présentant aussi une acrodysostose et une résistance hormonale (acrodysostose de type 1); toutes les mutations sont des mutations faux-sens ou non-sens, localisées dans l'un des deux domaines de liaison à l'AMPc de la protéine (Lee *et al.*, 2012; Linglart *et al.*, 2012; Michot *et al.*, 2012; Nagasaki *et al.*, 2012; Muhn *et al.*, 2013; Elli *et al.*, 2016). La caractérisation fonctionnelle de plusieurs de ces nouvelles mutations indiquait que toutes les mutations PRKAR1A observées dans l'acro-

dysostose altèrent la fonction de la PRKAR1A par un mécanisme similaire (Rhayem *et al.*, 2015). Ainsi, toutes les mutations identifiées dans le gène *PRKAR1A* causent un gain de fonction de cette sous-unité avec comme résultat une perte de fonction de la PKA. Ceci explique à la fois le phénotype squelettique et la résistance multi-hormonale observés chez ces patients.

Cette identification d'une forme d'acrodysostose sur une base génétique a conduit à proposer que des mutations d'autres gènes localisés dans la voie de signalisation de l'AMPc puissent être cause d'acrodysostose. De fait, des mutations affectant le gène *PDE4D* codant pour une phosphodiesterase spécifique de l'AMPc de classe IV ont été identifiées chez des patients atteints d'acrodysostose « typique », similaire à celle observée chez les patients PRKAR1A (Lee *et al.*, 2012; Linglart *et al.*, 2012; Michot *et al.*, 2012; Nagasaki *et al.*, 2012; Lynch *et al.*, 2013; Muhn *et al.*, 2013; Lindstrand *et al.*, 2014; Elli *et al.*, 2016). En revanche, alors que tous les patients porteurs d'une mutation de la PRKAR1A présentent une résistance hormonale, une telle résistance n'est que très rarement observée chez les patients porteurs d'une mutation de la PDE4D (acrodysostose type 2). Les patients porteurs de mutations de la PRKAR1A ou de la PDE4D présentent aussi d'autres caractéristiques phénotypiques, également fréquentes chez les patients atteints PHP1A, comme des anomalies cognitives allant de troubles du comportement à un retard mental. Ces anomalies paraissent plus sévères chez les patients porteurs de mutations PDE4D que PRKAR1A.

Le gène *PDE4D* génère par épissage alternatif plusieurs isoformes, constituées d'une région N-terminale, spécifique de chaque isoforme, de deux régions régulatrices (UCR1 et UCR2) et d'un domaine catalytique conservés. Les mutations de PDE4D détectées à ce jour sont réparties dans les trois domaines partagés entre différentes isoformes (UCR1, UCR2, et unité catalytique). Cette observation suggère que les mutations altèrent la fonction de la PDE4D mutée par un même mécanisme qui conduirait à une augmentation de l'activité phosphodiesterase des PDE4D – donc un gain de fonction causant une perte de la fonction constitutive de l'activité PKA, comme observé pour les mutants PRKAR1A.

En conclusion, il existe un chevauchement phénotypique entre les patients atteints de PHP1A, d'acrodysostose de type 1 et d'acrodysostose de type 2. Cependant les patients présentent aussi des caractéristiques spécifiques propres qui illustrent les contributions physiopathologiques uniques de G α , PRKAR1A et PDE4D dans la signalisation AMPc-PKA. Ainsi, ces maladies monogéniques illustrent la spécificité de la voie de l'AMPc, enjeu majeur d'étude de cette voie de signalisation activée

par de nombreux agonistes et exprimée dans de multiples tissus. L'analyse de ces maladies doit permettre de mieux comprendre les mécanismes physiopathologiques et les conséquences spécifiques des mutations des gènes de cette voie (*PRKAR1A*, *PDE4D* et *GNAS*) en termes de fonctions physiologiques et moléculaires de la voie de signalisation de l'AMPc.

Références

- Bastepe, M., and Juppner, H. (2005). *GNAS* locus and pseudohypoparathyroidism. *Hormone Res*, 63, 65-74.
- Elli, F.M., Bordogna, P., de Sanctis, L., Giachero, F., Verrua, E., Segni, M., Mazzanti, L., Boldrin, V., Toromanovic, A., Spada, A., and Mantovani, G. (2016). Screening of *PRKAR1A* and *PDE4D* in a Large Italian Series of Patients Clinically Diagnosed with Albright Hereditary Osteodystrophy and/or Pseudohypoparathyroidism. *J Bone Miner. Res*, 31, Doi :10.1002/jbmr.2785. [Epub ahead of print]
- Houslay, M.D., and Adams, D.R. (2003). *PDE4* cAMP phosphodiesterases : modular enzymes that orchestrate signalling cross-talk, desensitization and compartmentalization. *Biochem J*, 370, 1-18.
- Jüppner, H., and Silve, C. (2012). Genetic disorders affecting PTH/PTHrP receptor function. In : *Genetics of Bone Biology and Skeletal Disease*, Thakker R., Whyte, MP., Eisman, J., and Igarashi, T., eds., Academic Press, Elsevier, Oxford, UK.
- Lee, H., Graham, J.M., Jr., Rimoin, D.L., Lachman, R.S., Krejci, P., Tompson, S.W., Nelson, S.F., Krakow, D., and Cohn, D.H. (2012). Exome Sequencing Identifies *PDE4D* Mutations in Acrodysostosis. *Am J Hum Genet*, 90, 746-751.
- Lindstrand, A., Grigelioniene, G., Nilsson, D., Pettersson, M., Hofmeister, W., Anderlid, B.M., Kant, S.G., Ruivenkamp, C.A., Gustavsson, P., Valta, H., Geiberger, S., Topa, A., Lagerstedt-Robinson, K., Taylan, F., Wincent, J., Laurell, T., Pekkinen, M., Nordenskjöld, M., Mäkitie, O., and Nordgren, A. (2014). Different mutations in *PDE4D* associated with developmental disorders with mirror phenotypes. *J Med Genet*, 51, 45-54.
- Linglart, A., Menguy, C., Couvineau, A., Auzan, C., Gunes, Y., Cancel, M., Motte, E., Pinto, G., Chanson, P., Bougnères, P., Clauser, E., and Silve, C. (2011). Recurrent *PRKAR1A* mutation in acrodysostosis with hormone resistance. *N Engl J Med*, 364, 2218-2226.
- Linglart, A., Fryssira, H., Hiort, O., Holterhus, P.M., Perez de Nanclares, G., Argente, J., Heinrichs, C., Kuechler, A., Mantovani, G., Leheup, B., Wicart, P., Chassot, V., Schmidt, D., Rubio-Cabezas, Ó., Richter-Unruh, A., Berrade, S., Pereda, A., Boros, E., Muñoz-Calvo, M.T., Castori, M., Gunes, Y., Bertrand, G., Bougnères, P., Clauser, E., and Silve, C. (2012). *PRKAR1A* and *PDE4D* mutations cause acrodysostosis but two distinct syndromes with or without GPCR-signaling hormone resistance. *J Clin Endocrinol Metab*, 97, E2328-2338.
- Linglart, A., Maupetit-Mehouas, S., and Silve, C. (2013). *GNAS* -Related Loss-of-Function Disorders and the Role of Imprinting. *Horm Res Paediatr*, 79, 119-129.
- Lynch, D.C., Dyment, D.A., Huang, L., Nikkel, S.M., Lacombe, D., Campeau, P.M., Lee, B., Bacino, C.A., Michaud, J.L., Bernier, F.P., FORGE Canada Consortium., Parboosingh, J.S., Innes, A.M. (2013). Identification of novel mutations confirms *pde4d* as a major gene causing acrodysostosis. *Hum Mutat*, 34, 97-102.
- Maroteaux, P., and Malamut, G. (1968). [Acrodysostosis]. *La Presse medicale*, 76, 2189-2192.
- Michot, C., Le Goff, C., Goldenberg, A., Abhyankar, A., Klein, C., Kinning, E., Guerrot, A.M., Flahaut, P., Duncombe, A., Baujat, G., Lyonnet, S., Thalassinos, C., Nitschke, P., Casanova, J.L., Le Merrer, M., Munnich, A., and Cormier-Daire, V. (2012). Exome Sequencing Identifies *PDE4D* Mutations as Another Cause of Acrodysostosis. *Am J Hum Genet*, 90, 740-745.
- Muhn, F., Klopocki, E., Graul-Neumann, L., Uhrig, S., Colley, A., Castori, M., Lankes, E., Henn, W., Gruber-Sedlmayr, U., Seifert, W., and Horn, D. (2013). Novel mutations of the *PRKAR1A* gene in patients with acrodysostosis. *Clin Genet*, 84, 531-538.
- Nagasaki, K., Iida, T., Sato, H., Ogawa, Y., Kikuchi, T., Saitoh, A., Ogata, T., and Fukami, M. (2012). *PRKAR1A* mutation affecting cAMP-mediated G protein-coupled receptor signaling in a patient with acrodysostosis and hormone resistance. *J Clin Endocrinol Metab*, 97, E1808-1813.
- Parnot, C., Miserey-Lenkei, S., Bardin, S., Corvol, P., and Clauser, E. (2002). Lessons from constitutively active mutants of G protein-coupled receptors. *Trends Endocrinol Metab*, 13, 336-343.
- Rhayem, Y., Le Stunff, C., Abdel Khalek, W., Auzan, C., Bertherat, J., Linglart, A., Couvineau, A., Silve, C., and Clauser, E. (2015). Functional Characterization of *PRKAR1A* Mutations Reveals a Unique Molecular Mechanism Causing Acrodysostosis but Multiple Mechanisms Causing Carney Complex. *J Biol Chem*, 290, 27816-27828.
- Robinow, M., Pfeiffer, R.A., Gorlin, R.J., McKusick, V.A., Renuart, A.W., Johnson, G.F., and Summitt, R.L. (1971). Acrodysostosis. A syndrome of peripheral dysostosis, nasal hypoplasia, and mental retardation. *Am J Dis Child*, 121, 195-203.
- Silve, C., Le-Stunff, C., Motte, E., Gunes, Y., Linglart, A., and Clauser, E. (2012). Acrodysostosis syndromes. *Bone Key Reports*, 1, 225.
- Taylor, S.S., Buechler, J.A., and Yonemoto, W. (1990). cAMP-dependent protein kinase : framework for a diverse family of regulatory enzymes. *Annu Rev Biochem*, 59, 971-1005.
- Taylor, S.S., Keshwani, M.M., Steichen, J.M., and Kornev, A.P. (2012). Evolution of the eukaryotic protein kinases as dynamic molecular switches. *Philos Transac Royal Soc London Series B, Biol Sci*, 367, 2517-2528.