

## Les peroxysomes et la prolifération cellulaire ou la prise en considération d'un organe méconnu

Les peroxysomes sont des organites intracellulaires dénués de génome accomplissant des fonctions métaboliques essentielles :  $\beta$ -oxydation des acides gras à très longue chaîne, catabolisme des prostaglandines et des polyamines, premières réactions de la biogenèse des plasmalogènes (par exemple le PAF-acéther) et des sels biliaires, dégradation de l' $H_2O_2$ , etc. Une série d'affections (les maladies peroxysomiales) perturbe, soit la biogenèse des organites, soit l'activité de certaines de leurs enzymes. De nombreuses substances, dont les hypolipémiants de la famille des fibrates, induisent, chez certains animaux, une prolifération des peroxysomes, associée dans certains modèles à une hyperexpression, voire à des mutations activatrices d'oncogènes. Le signal des inducteurs de prolifération des peroxysomes semble être relayé par une (ou des) molécule(s) de la superfamille des récepteurs nucléaires.

---

Norbert Latruffe

---

**L**es peroxysomes ont pris, ces dernières années, une place importante en biologie cellulaire pour quatre raisons principales : leurs fonctions métaboliques, le phénomène de prolifération, la relation entre la prolifération des peroxysomes et la prolifération cellulaire normale et anarchique (cancer), et l'existence de maladies génétiques peroxysomiales.

### Que sont les peroxysomes ?

Les peroxysomes (encore appelés *microbodies*) sont des organites cellulaires ubiquitaires signalés en 1954 par Rhodin et purifiés pour la première fois en 1966 par l'équipe C. de Duve [1]. En général, ces organites, assez bien individualisés, représentent moins de 1 % du volume intracellulaire des cellules hépatiques chez le rat, proportion qui peut augmenter de sept à dix fois sous l'effet d'agents

proliférateurs [2]. La purification est réalisée par centrifugation sur gradient de densité : sur milieu de métrizamide<sup>TM</sup>, de nycodenz<sup>TM</sup>, de ficoll<sup>TM</sup> ou de saccharose [3]. Isolés, les peroxysomes apparaissent sous forme de vésicules closes de 0,5 à 1  $\mu$ m de diamètre. Ils sont entourés d'une simple membrane et renferment une matrice dont une partie, le corps cristalloïde, contenant l'urate oxydase chez le rat, est dense aux électrons (*figure 1*). A l'aide de coupes sériées en microscopie électronique, l'équipe de Fahimi [4] a pu reconstituer l'organisation intracellulaire de cet organe qui se présente comme un véritable réseau peroxysomial. Cette structure en réticulum est à relier au mécanisme de biogenèse de peroxysomes dérivant de la division de peroxysomes préexistants, une fois que ceux-ci ont incorporé suffisamment de matériel protéique et lipidique nouvellement synthétisé.

---

#### ADRESSE ET TIRÉS À PART

---

N. Latruffe : *professeur* : Laboratoire de biologie moléculaire et cellulaire (LBMC), faculté des sciences Mirande, université de Bourgogne, BP 138, 21004 Dijon, France.

## RÉFÉRENCES

1. De Duve C, Baudhuin P. Peroxisomes (microbodies and related particles). *Physiol Rev* 1966 ; 46 : 323-57.
2. Lazarow PB, Fujiki Y. Biogenesis of peroxisomes. *Ann Rev Cell Biol* 1985 ; 1 : 489-530.
3. Cherkaoui Malki M, Bardot O, Lhuguenot JC, Latruffe N. Expression of liver peroxisomal proteins as compared to other organelle marker enzymes in rats treated with hypolipidemic agents. *Biol Cell* 1990 ; 69 : 83-92.
4. Yamamoto K, Fahimi HD. Three dimensional reconstruction of a peroxisomal reticulum in regenerating rat liver : evidence of interconnections between heterogene segments. *J Cell Biol* 1987 ; 105 : 713-22.
5. Diczfalussy U, Kase BF, Alexon SEH, Bjorkhem I. Metabolism of prostaglandin in F2 in Zellweger syndrome. Peroxisomal  $\beta$ -oxidation is a major importance for *in vivo* degradation in humans. *J Clin Invest* 1991 ; 88 : 978-84.
6. Osmunden H, Bremer J, Pedersen JI. Metabolic aspects of peroxisomal  $\beta$ -oxidation. *Biochim Biophys Acta* 1991 ; 1085 : 141-58.
7. Hodge VJ, Gould SJ, Subramani S, Moser HW, Krisans SK. Normal cholesterol synthesis in human cells requires functional peroxisomes. *Biochem Biophys Res Commun* 1991 ; 181 : 537-41.
8. Borst P. Peroxisome biogenesis revisited. *Biochim Biophys Acta* 1989 ; 1008 : 1-13.
9. Poll-The BT, Vamecq J, Draye JP, Saubray JM. Un nouveau groupe d'erreurs innées du métabolisme : les maladies peroxysomiales. *médecine/sciences* 1988 ; 4 : 553-9.
10. Aubourg P. Adrénoleucodystrophie : progrès récents et perspectives thérapeutiques. *médecine/sciences* 1989 ; 5 : 225-32.
11. Purdue PE, Allshop J, Isaya G, Rosenberg LE, Danpure CJ. Mistargeting of peroxisomal L-alanine : glyoxylate aminotransferase to mitochondria in primary hyperoxaluria patients depends upon activation of a cryptic mitochondrial targeting sequence by a point mutation. *Proc Natl Acad Sc USA* 1991 ; 88 : 10900-4.
12. Kamijo K, Tocketani S, Yokota S, Osumi T, Hashimoto T. The 70 kDa peroxisomal membrane protein is a member of the Mdr (p-glycoprotein)-related ATP binding superfamily. *J Biol Chem* 1990 ; 265 : 4534-40.
13. Ossendorf BC, Van Heusden PH, De Beer ALJ, Bos K, Schouten GL, Wirtz KWA. Identification of the cDNA clone which encodes the 58 kDa protein containing the aminoacid sequence of rat liver non specific lipid transfer protein (sterol-carrier protein 2). Homology with rat peroxisomal and mitochondrial 3-oxoacyl CoA thiolases. *Eur J Biochem* 1991 ; 201 : 233-9.

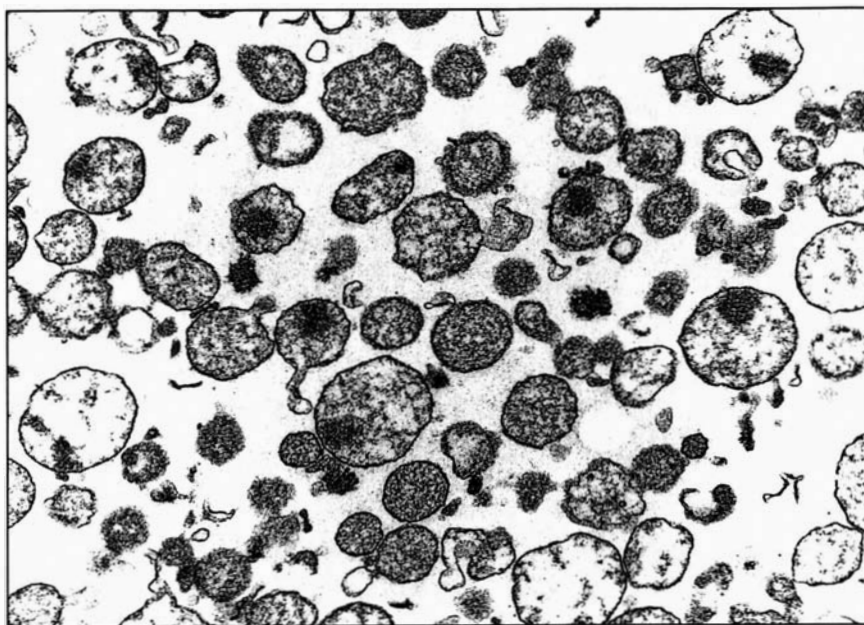


Figure 1. Photographie en microscopie électronique de peroxysomes purifiés de foie de rat ( $\times 50\ 000$ ). (D'après [3].)

### Pourquoi les peroxysomes sont-ils importants ?

Si l'équipe de C. de Duve a montré que la catalase, responsable de la dégradation du peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ), était essentiellement localisée dans les peroxysomes, d'où leur nom, on mesure mieux maintenant l'importance de ces organites dans le métabolisme cellulaire, en particulier grâce à l'apport de la pathologie [5-7]. Ainsi, ils sont responsables du catabolisme oxydatif de « plusieurs substances » : (1) les acides gras à très longue chaîne (AGTLC), essentiellement poly-insaturés, dont les prostaglandines [5], cela par un mécanisme de  $\beta$ -oxydation. Il s'agit d'un raccourcissement des chaînes jusqu'en C12 — voire en C8 —, celles-ci étant reprises par les mitochondries [6] ; (2) des dérivés du cholestérol (l'acide trihydroxycoprostanolique) transformés en acides biliaires ; (3) des acides aminés D et L ; (4) des bases puriques ; (5) des polyamines. Ils sont également le siège, ou le point de départ, de plusieurs voies de biosynthèse : le dolichol, le cholestérol [7], les deux premières étapes de la synthèse des éthers-lipides (ou plasmalogènes), dont l'un d'eux est un médiateur lipidique bien connu : le PAF-acéther.

La  $\beta$ -oxydation des acides gras à très longue chaîne a été jusqu'à présent l'objet d'attentions particulières en raison de l'inductibilité de ses enzymes par les agents proliférateurs de peroxysomes. Il s'agit de l'acyl-CoA synthétase membranaire (moyennement induite), de la carnitine-octanoyl transférase, qui assure la sortie vers l'extérieur du peroxysome des acides gras raccourcis, et des trois enzymes de la  $\beta$ -oxydation proprement dite : l'acyl-CoA oxydase, une enzyme à FAD génératrice de  $H_2O_2$  ; l'énoyl-CoA hydratase-déshydrogénase, ou enzyme bifonctionnelle, et la thiolase.

Suivant les espèces dans l'échelle du règne vivant, les peroxysomes possèdent un équipement enzymatique qui peut aussi comporter les enzymes du cycle du glyoxylate dans les graines d'oléagineux en germination [8], les peroxysomes prenant alors le nom de glyoxysomes, alors que les glycosomes des protozoaires (par exemple, des trypanosomes) renferment les enzymes de la glycolyse. Les peroxysomes de levure contiennent quant à eux des enzymes de la dégradation du méthanol. On peut noter des curiosités telles que les hydrogénosomes de *Trichomonas*. Il est possible aussi de trouver dans les peroxysomes quel-



ques transaminases particulières, la citrate synthase ou la malate déshydrogénase.

L'intérêt porté aux peroxysomes a été renforcé par la découverte, en 1982, de l'existence, chez l'homme, de maladies génétiques [9] liées soit à un déficit multiple en enzymes peroxysomiales entraînant des troubles de la biogénèse, tels que les syndromes de Zellweger ou de Refsum infantile où l'on note une absence de peroxysomes alors que les gènes codant pour les enzymes peroxysomiales sont exprimés, soit à des déficits isolés, une seule enzyme peroxysomiale étant alors absente ; par exemple, déficit en acyl-CoA oxydase dans l'adrénoleucodystrophie liée à l'X [10]. Il s'agit de maladies infantiles létales caractérisées par un syndrome hépato-cérébro-rénal avec, en particulier, accumulation d'acides gras à très longue chaîne et déficit en plasmalogènes.

La biogénèse des peroxysomes et de leur membrane est un processus post-traductionnel d'importation de protéines nouvellement synthétisées sur des polysomes libres. La voie du réticulum endoplasmique n'est donc pas impliquée dans cette biogénèse, ce qui explique qu'aucune protéine peroxysomiale ne soit glycosylée. Si la plupart des précurseurs de protéines de peroxysomes ne possèdent pas de séquences d'adressage du côté N-terminal, le signal d'entrée de ces protéines dans l'organe est généralement la séquence C-terminale « SKL » (ser-lys-leu) [8].

Ne disposant actuellement que de données fragmentaires, on peut penser que le mécanisme de translocation des protéines à travers la membrane du peroxysome est analogue à celui des mitochondries, c'est-à-dire qu'il ferait intervenir un récepteur membranaire et des protéines chaperonnes extra- et intra-peroxysomiales respectivement responsables du dépliement et du repliement de la chaîne polypeptidique de la protéine nouvellement synthétisée (*m/s n° 5, vol. 7, p. 496*). Un travail récent a montré qu'une maladie génétique peroxysomiale caractérisée par une hyperoxalurie était due à une mutation ponctuelle du gène de l'alanine : glyoxylate aminotransférase peroxysomiale qui « déroute » l'enzyme vers les mitochondries par démasquage d'une séquence d'adres-

sage mitochondriale (*m/s n° 4, vol. 7, p. 389*) [11]. Enfin, l'énergie apparaît nécessaire au passage des protéines à travers la membrane des peroxysomes. Celle-là pourrait être apportée par la protéine P70 qui appartient à la superfamille des protéines liant l'ATP, superfamille incluant la protéine MDR (*multidrug resistance*) [12].

Le peroxysome ne possède pas d'ADN, bien que ce compartiment cellulaire soit souvent classé avec les mitochondries et les chloroplastes dans le groupe des organites semi-autonomes en raison de leur processus de biogénèse similaire et peut-être aussi d'une origine endosymbiotique commune [8]. Les mouvements intracellulaires des lipides (phospholipides) sont bien sûr impliqués dans la biogénèse de la membrane des peroxysomes [13].

Un ouvrage récent témoigne de l'intérêt grandissant porté aux peroxysomes [14], ainsi que l'organisation passée ou à venir de grands congrès internationaux sur le sujet : 1980 (New York, organisé par P. B. Lazarow) ; 1986 (Heidelberg, sous l'égide de H. D. Fahimi) et avril 1993 (Dijon, mis en œuvre par le GIS toxicologie cellulaire).

### **Pourquoi les peroxysomes sont-ils reliés à la lipémie ?**

Les inducteurs de la prolifération de peroxysomes de la classe des fibrates (noyau phénoxyacétique) sont utilisés comme hypolipémiants efficaces dans la prévention de risques cardiovasculaires [15]. En effet, par des mécanismes encore mal connus, ils activent le transport hépatique du cholestérol et des triglycérides en diminuant le taux des LDL (lipoprotéines de moyenne densité) circulantes par activation des mécanismes d'endocytose de celles-ci. La FABP (*fatty acid binding protein*) serait également impliquée [16]. Enfin, l'effet hypolipémiant est conforté par la stimulation des enzymes de la  $\beta$ -oxydation peroxysomiale et par la prolifération hépatique de ces organites.

### **Les molécules induisant la prolifération de peroxysomes**

Une large variété de molécules de

nature lipophile possède une telle action. Souvent le caractère structural commun est un noyau aromatique, en général porteur d'une fonction acide carboxylique et d'autres substituants comme des halogènes [17] ; par exemple, des molécules hypolipémiantes de la famille des fibrates (*figure 2*) utilisées comme médicaments, des assouplisseurs de plastique de type phtalates ou adipates, largement utilisés dans les emballages alimentaires ou dans le stockage des produits biologiques, des herbicides comme le 2,4D (acide 2,4 dichlorophénoxyacétique) ou le 2,4,5T (acide 2,4,5 trichlorophénoxyacétique), voire des substances médicamenteuses comme, par exemple, l'aspirine. On trouve aussi des substances alimentaires comme l'acide phytique, constituant de la chlorophylle, des acides gras polyinsaturés d'huiles de poisson, des arômes utilisés en cosmétologie (linalool), ou des substances endogènes comme des hormones stéroïdiennes (déhydroépiandrosterone, estradiol) ou thyroïdiennes, ou encore un morphogène comme l'acide rétinoïque [18].

On verra que le marqueur de prolifération peroxysomiale généralement utilisé est l'activité acyl-CoA oxydase insensible au cyanure, activité pouvant augmenter d'un facteur 20 (*Tableau I*). Les enzymes des autres voies métaboliques sont peu induites, de même que la catalase. Cependant, la multiplication des peroxysomes peut être directement observée en microscopie optique ou électronique révélée par histochimie (mise en évidence de l'activité catalasique avec la 3,3'-diaminobenzidine et  $H_2O_2$ ) (*figure 3*).

### **Spécificité de tissu et d'espèce**

Chez le rat ou la souris de laboratoire, la prolifération des peroxysomes est très importante au niveau du foie, avec un effet nettement atténué dans les reins. Tous les autres tissus testés ne montrent pas de prolifération significative. Tout aussi intéressante est la différence entre les espèces : prolifération très forte chez le rat, modérée chez le hamster, faible ou nulle chez le cobaye, le chien, le chat, le singe et l'homme [19]. Dans

## RÉFÉRENCES

14. Roels F. Peroxisomes, a personal account. Bruxelles : VUB Press, 1991 : 152.

15. Daviou F. Quels types d'hypocholestérolémiant pour quels types d'hypercholestérolémies. *Ann Cardiol Angeriol* 1990 ; 30 : 591-5.

16. Cannon JR, Eacho PI. Interaction of LY17 1883 and other peroxisome proliferators with fatty-acid-binding protein isolated from rat liver. *Biochem J* 1991 ; 280 : 387-91.

17. Cherkaoui Malki M, Assaka L, Pacot C, Bardot O, Latruffe N. Effect of different hypolipemic agents on rat liver peroxisomal and mitochondrial functions and biogenesis. *Cell Mol Biol* 1991 ; 37 : 723-33.

18. Hertz R, Bar-Tana J. Induction of peroxisomal  $\beta$ -oxidation genes by retinoic acid in cultured rat hepatocytes. *Biochem J* 1992 ; 281 : 41-3.

19. Blaauboer BJ, Van Holsteijn CWM, Bleumink R, *et al.* The effect of blectobric acid and clofibrate acid in peroxisomal  $\beta$ -oxidation and peroxisome proliferation in primary cultures of rat, monkey and human hepatocytes. *Biochem Pharmacol* 1990 ; 40 : 521-8.

20. Goodman JM, Trapp SB, Hwang H. Peroxisomes induced in *Candida boidinii* by methanol, oleic acid and D-alanine vary in metabolic function but share common integral membrane proteins. *J Cell Science* 1990 ; 97 : 193-204.

21. Milton MN, Elcombe CR, Gibson GG. On the mechanism of induction of microsomal cytochrome P450 IV A1 and peroxisome proliferation in rat liver by clofibrate. *Biochem Pharmacol* 1990 ; 40 : 2727-32.

22. Oda T, Fumai T, Ichiyama K. Generation from a single gene of two mRNAs that encode the mitochondrial and peroxisomal serine : pyruvate aminotransferase of rat liver. *J Biol Chem* 1990 ; 265 : 7513-9.

23. Fröhlich KU, Fries HW, Rudiger M, Erdmann R, Bostein D, Mecke D. Yeast cell cycle protein CDC 48p shows full length homology to the mammalian protein VCP and is a member of a protein family involved in secretion, peroxisome formation and gene expression. *J Cell Biol* 1991 ; 114 : 443-53.

24. Cherkaoui Malki M, Lone YC, Corral-Debrinski M, Latruffe N. Differential proto-oncogene mRNA induction from rats treated with peroxisome proliferators. *Biochem Biophys Res Commun* 1990 ; 173 : 855-61.

25. Orellana A, Hidalgo PC, Morales MN, Mezzano D, Bronfman M. Palmitoyl CoA and the acyl-CoA thioester of the carcinogenic peroxisome proliferator ciprofibrate potentiate diacyl-glycerol-activated protein kinase c by decreasing the phosphatidyl-serine requirement of the enzyme. *Eur J Biochem* 1990 ; 190 : 57-61.

26. Bieri F, Bentley P, Waechter F, Staübli W. Mitogenicity of peroxisome proliferators in monolayers of adult rat hepatocytes. *Fd Chem Toxic* 1986 ; 24 : 709.

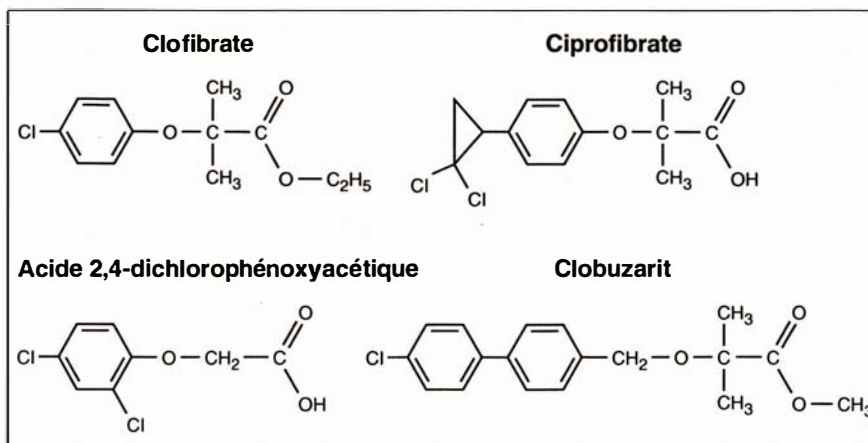


Figure 2. Structure chimique de quelques molécules de la famille des fibrates ayant une action hypolipémiante. (D'après [16].)

les organismes unicellulaires (levures ou champignons microscopiques), la prolifération est surtout déclenchée par le méthanol ou l'oléate, selon les espèces [20].

Ce phénomène puissant et spectaculaire de prolifération des peroxysomes intéresse actuellement un nombre croissant d'équipes internationales. Par exemple, l'équipe de G. Gibson a mis en évidence une étroite corrélation entre l'augmentation de l'activité acyl-CoA oxydase peroxysomiale

et l'activité cytochrome P450 IVA1 ( $\omega$ -lauryl hydroxylase) du réticulum endoplasmique. Ces mêmes auteurs ont montré que l'expression du gène du cytochrome P450 IVA1 (ARNm et polypeptide) non seulement précède celle de l'acyl-CoA oxydase, mais de plus était nécessaire à cette dernière [21].

La prolifération des peroxysomes est donc bien un phénomène qui fait appel à l'expression contrôlée et concertée de plusieurs gènes.

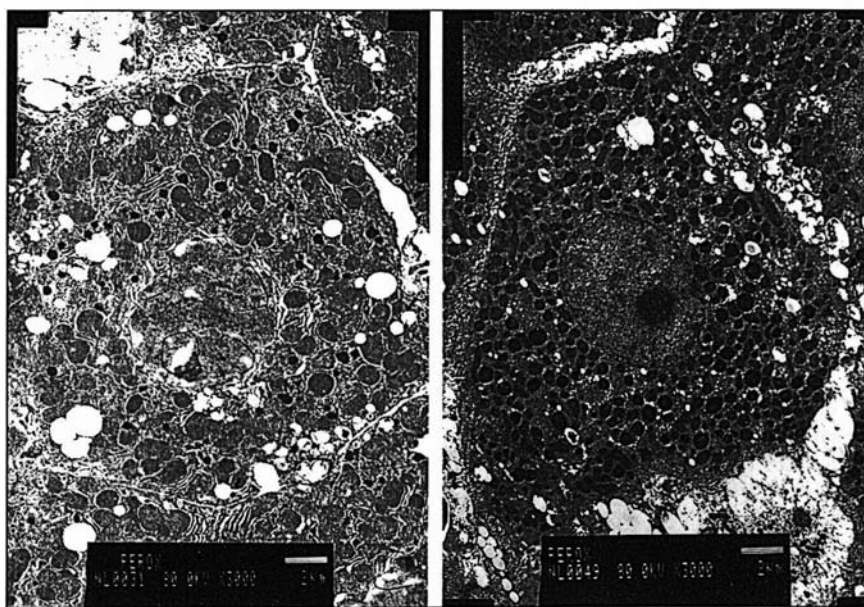


Figure 3. Examen en microscopie électronique (X 3 000) de coupes ultra-fines de tissu hépatique obtenues : (A) à partir de rats témoins ; (B) à partir de rats traités par le ciprofibrate (100 ppm) pendant 26 semaines. Révélation colorée des peroxysomes en présence de 3,3'diaminobenzidine et  $H_2O_2$ . (D'après [17].)



Tableau I

EFFET D'AGENTS HYPOLIPÉMIANTS SUR L'INDEX SOMATIQUE DE DIFFÉRENTS ORGANES CHEZ LE RAT ET SUR L'ACTIVITÉ PALMITOYL-CoA OXYDASE DE PEROXYSONES HÉPATIQUES (D'après [24])

Traitement	Hypolipémiant inclus dans la nourriture (ppm)	Index somatique poids de l'organe/poids corporel (g/100 g)				Activité hépatique CN-PCoA peroxysomiale ( $\mu$ mol palmitoyl CoA/min/mg prot. de foie)
		foie	reins	cœur	cerveau	
2 semaines (ST)						
Témoin [4]	-	4,1 $\pm$ 0,2	0,8 $\pm$ 0,08	0,3 $\pm$ 0,01	0,8 $\pm$ 0,2	6,3 $\pm$ 81 1,2
Cip [4]	250	8,8 $\pm$ 0,2 (2,14)	1,0 $\pm$ 1,13 (1,25)	0,3 $\pm$ 0,01 (1,0)	0,8 $\pm$ 0,09 (1,0)	170,8 $\pm$ 6,4 (23)
Clo [4]	500	7,2 $\pm$ 0,4 (1,75)	1,0 $\pm$ 0,05 (1,25)	0,3 $\pm$ 0,01 (1,0)	0,9 $\pm$ 0,2 (1,12)	77,2 $\pm$ 3 (12)
52 semaines (LT)						
Témoin [4]	-	2,4 $\pm$ 0,2	0,8 $\pm$ 0,02	0,3 $\pm$ 0,02	0,4 $\pm$ 0,1	5,2 $\pm$ 1,4
Cip [4]	25	8,8 $\pm$ 0,2 (3,66)	1,0 $\pm$ 0,04 (1,25)	0,3 $\pm$ 0,01 (1,0)	0,5 $\pm$ 0,1 (1,25)	76,4 $\pm$ 8,1 (14,7)
Clo [6]	50	3,7 $\pm$ 0,2 (1,54)	1,1 $\pm$ 0,12 (1,37)	0,3 $\pm$ 0,02 (1,0)	0,4 $\pm$ 0,06 (1,0)	17,2 $\pm$ 2,9 (3,3)

[ ] = nombre d'animaux, ( ) = facteur d'augmentation par rapport au témoin.

Abréviations : Cip, ciprofibrate ; Clo, clofibrate ; LT, traitement long terme ; CN-PCoA, palmitoyl CoA oxydase insensible au cyanure (spécifique des peroxysomes).

L'index somatique est un indicateur de la variation du poids d'un organe après traitement des animaux avec un hypolipémiant.

### Régulation des gènes codant pour les protéines peroxysomiales

Le clonage des gènes codant pour les protéines peroxysomiales (Tableau II) a permis non seulement de disposer de sondes d'hybridation pour entreprendre les recherches sur les mécanismes de régulation des gènes, mais aussi de connaître la séquence en acides aminés des polypeptides de peroxysomes et de faire des études d'homologie de séquences particulièrement intéressantes. Par exemple, un haut degré de conservation a été noté entre la protéine de transfert non spécifique de lipide et une protéine membranaire de peroxysomes [13] ; entre les thiolases ou sérines : pyruvate aminotransférases de mitochondries et de peroxysomes [22] ; ou encore, chez la levure, entre la protéine de contrôle du cycle cellulaire CDC48p et une protéine de la membrane des peroxysomes essentielle à sa biogenèse [23].

Les estimations du taux des transcrits sont faites en Northern blot par hybridation, avec des sondes marquées au  $^{32}$ P, ADNc [24] ou oligonucléotides

de synthèse [3]. La détection peut être également réalisée avec des sondes froides (marquage à la digoxigénine suivi d'une révélation immunologique, ou marquage avec la peroxydase et le luminol et révélation de type autoradiographique). La figure 4B montre le taux de transcrits de l'acyl-CoA oxydase de foie chez des rats traités à court terme (deux semaines) et à long terme (52 semaines) avec deux hypolipémiants : le clofibrate et le ciprofibrate. Le taux de transcrits, fortement augmenté après un traitement de deux semaines, est maintenu à un niveau élevé lorsque le traitement est prolongé, indiquant l'absence de phénomène de neutralisation de cet effet. Au niveau du tissu rénal, l'augmentation du taux de transcrits est décelable, surtout avec un inducteur puissant de prolifération comme le ciprofibrate. Aucun messenger n'est mis en évidence dans le cœur et le cerveau (Cherkaoui Malki, résultats non publiés).

Nous avons montré, par ailleurs, que le taux de transcrits codant pour une autre enzyme de la  $\beta$ -oxydation peroxysomiale, la thiolase, était éga-

lement augmenté dans le foie, alors que celui du messenger de la catalase ne variait pas significativement [3]. L'immunodétection a aussi été utilisée, soit par Western blot [3, 17], soit après immunoprécipitation des produits de traduction d'ARN *in vitro*, pour étudier les protéines peroxysomiales après induction de la prolifération.

### Relation entre prolifération des peroxysomes et prolifération cellulaire

C'est sans doute dans le domaine du contrôle cellulaire que les peroxysomes présentent actuellement le plus d'intérêt, compte tenu de la complexité et des conséquences du phénomène. Une observation simple fixe les idées : lorsqu'il y a prolifération des peroxysomes, il y a hypertrophie et hyperplasie cellulaires, ce qui se traduit par une augmentation de l'index somatique du tissu. Cet accroissement de masse est évidemment le plus marqué au niveau du foie (hépatomégalie) et peut atteindre un facteur 3 après certains traitements (Tableau I). On peut néan-

Tableau II

## ADNc CLONÉS CODANT POUR DES PROTÉINES PEROXYSOMIALES (OU APPARENTÉES)

- 1) **Acyl-CoA oxydase** (rat : Miyazawa S *et al.*, *J Biol Chem* 1987 ; 262 : 8131-7 ; *Candida tropicalis* : Okazaki K *et al.*, *Proc Natl Acad Sci USA* 1986 ; 83 : 1232-6 ; Okazaki K *et al.*, *Gene* 1987 ; 58 : 37-44 ; Small GM, Lazarow PB, *J Cell Biol* 1987 ; 105 : 247-50 ; Murray *et al.*, *Gene* 1987 ; 51 : 119-28 ; *Candida maltosa* : Hill DE, *Nucleic Acids Res* 1988 ; 16 : 365-6).
- 2) **Enoyl CoA hydratase-3-hydroxyacyl CoA déshydrogénase ; enzyme bifonctionnelle** (foie de rat : Osumi T *et al.*, *J Biol Chem* 1985 ; 260 : 8905-10 ; Chatterjee B *et al.*, *Eur J Biochem* 1987 ; 166 : 273-8).
- 3) **3-cétoacyl CoA thiolase** (homme : Bout A *et al.*, *Nucleic Acids Res* 1988 ; 16 : 10369 ; Arakawa H *et al.*, *EMBO J* 1987 ; 6 : 1361-6 ; foie de rat : Bodnar AG, Rachubinski RA, *Gene* 1990 ; 91 : 193-9).
- 4) **Catalase** (reins humains : Bell GJ *et al.*, *Nucleic Acids Res* 1986 ; 14 : 5561-2 ; foie de rat : Furuta S *et al.*, *Proc Natl Acad Sci USA* 1986 ; 83 : 313-7 ; *Candida tropicalis* : Rachubinski RA *et al.*, *Biochem Biophys Acta* 1987 ; 903 : 35-43 ; Okada H *et al.*, *Eur J Biochem* 1987 ; 170 : 105-10 ; Murray WW, Rachubinski RA, *Nucleic Acids Res* 1987 ; 17 : 9).
- 5) **Urate oxydase** (foie de rat : Reddy PG *et al.*, *Proc Natl Acad Sci USA* 1988 ; 85 : 9081-5 ; Motojuina R *et al.*, *J Biol Chem* 1988 ; 263 : 16677-81).
- 6) **D-aminoacide oxydase** (*Hanseluna polymorpha* : Bruinenberg PG *et al.*, *Biochem Biophys Acta* 1989 ; 1008 : 157-67).
- 7) **Isocitrate lyase** (*Candida tropicalis* : Atomi H *et al.*, *J Biol Chem* 1990 ; 107 : 262-6).
- 8) **Carnitine octanoyl transférase** (foie de rat : Chatterjee B *et al.*, *Biochemistry* 1988 ; 27 : 9000-6).
- 9) **Protéine membranaire PMP 20** (*Candida boidini* : Garrard JP, Goodman JM, *J Biol Chem* 1989 ; 264 : 13929-37).
- 10) **Protéine membranaire PMP 35** (homme : Tsukamoto T *et al.*, *Nature* 1991 ; 350 : 77-81).
- 11) **Protéine membranaire PMP 47** (*Candida boidini* : McCammon MT *et al.*, *J Biol Chem* 1990 ; 265 : 20098-105).
- 12) **Protéine membranaire PMP 48** (*Saccharomyces cerevisiae* : Hohfeld J *et al.*, *J Cell Biol* 1991 ; 114 : 1167-78).
- 13) **Protéine membranaire PMP 70** (foie de rat : Kamijo R *et al.*, *J Biol Chem* 1990 ; 265 : 4534-40).
- 14) **PAS 1-gène** (*Saccharomyces cerevisiae* : Erdmann R *et al.*, *Cell* 1988 ; 64 : 499-520).
- 15) **POX 18-gène** (*Candida tropicalis* : Szabo LJ *et al.*, *Gene* 1989 ; 75 : 119-26).
- 16) **PPAR** (souris : Issemann I, Green S, *Nature* 1990 ; 347 : 645-49).

moins remarquer un accroissement de 25 % de la masse relative du tissu rénal.

La prolifération cellulaire normale dépend étroitement de la régulation du cycle cellulaire, c'est-à-dire des voies de signalisation (soit par l'interaction de molécules informationnelles avec des récepteurs de la surface cellulaire, soit par la voie de récepteurs nucléaires activés par des ligands spécifiques). Les quelques données qui suivent sont en faveur d'un lien entre la prolifération des peroxysomes et la multiplication cellulaire, normale ou anarchique.

- Les inducteurs de prolifération de peroxysomes sont capables de mimer la voie de signalisation des phosphoinositides par activation de la protéine kinase C [25]. D'autres effets sont également signalés, tels que la diminution de la liaison de l'EGF (facteur de croissance des cellules épithéliales)

à son récepteur ou l'altération de l'expression d'autres protéines de surface.

- Les inducteurs de prolifération de peroxysomes ont des effets mitogènes (ils stimulent la réplication de l'ADN), mais non mutagènes. Cependant, la réponse dose-effet à la réplication de l'ADN est supérieure à celle nécessaire au déclenchement de la prolifération de peroxysomes [26].

- Les tests de mutagénicité (test de réversion de Ames sur les salmonelles) sont pratiquement négatifs ou exceptionnels [27].

- Ces dernières années, un nombre important de travaux ont été consacrés à l'étude dite du « stress oxydatif » : c'est-à-dire aux effets d'une surproduction de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> provoquée par la forte activité de la β-oxydation peroxysomiale. Il y a dans ce cas un risque d'altération des bases nucléi-

ques par les radicaux libres en raison de la dégradation limitée de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> par la catalase ou par la glutathion peroxydase. En fait, après traitement de rats avec des hypolipémiants, bien que quelques bases modifiées aient pu être détectées par exemple, 5-hydroxyméthyl-2'-désoxyuridine (5-OHMdU) [28] ou 8-hydroxydésoxyguanine (8-OHdG), leur proportion reste très faible et elles sont probablement rapidement éliminées par les mécanismes naturels de réparation de l'ADN.

Des travaux, quelquefois controversés, ont mis en évidence la formation de tumeurs hépatiques chez des rats traités pendant plusieurs mois avec des inducteurs de prolifération de peroxysomes. Ce phénomène — qui passe par la formation de *foci*, puis de nodules — est beaucoup plus net lorsque la cancérisation a été initiée par une injection unique d'un agent



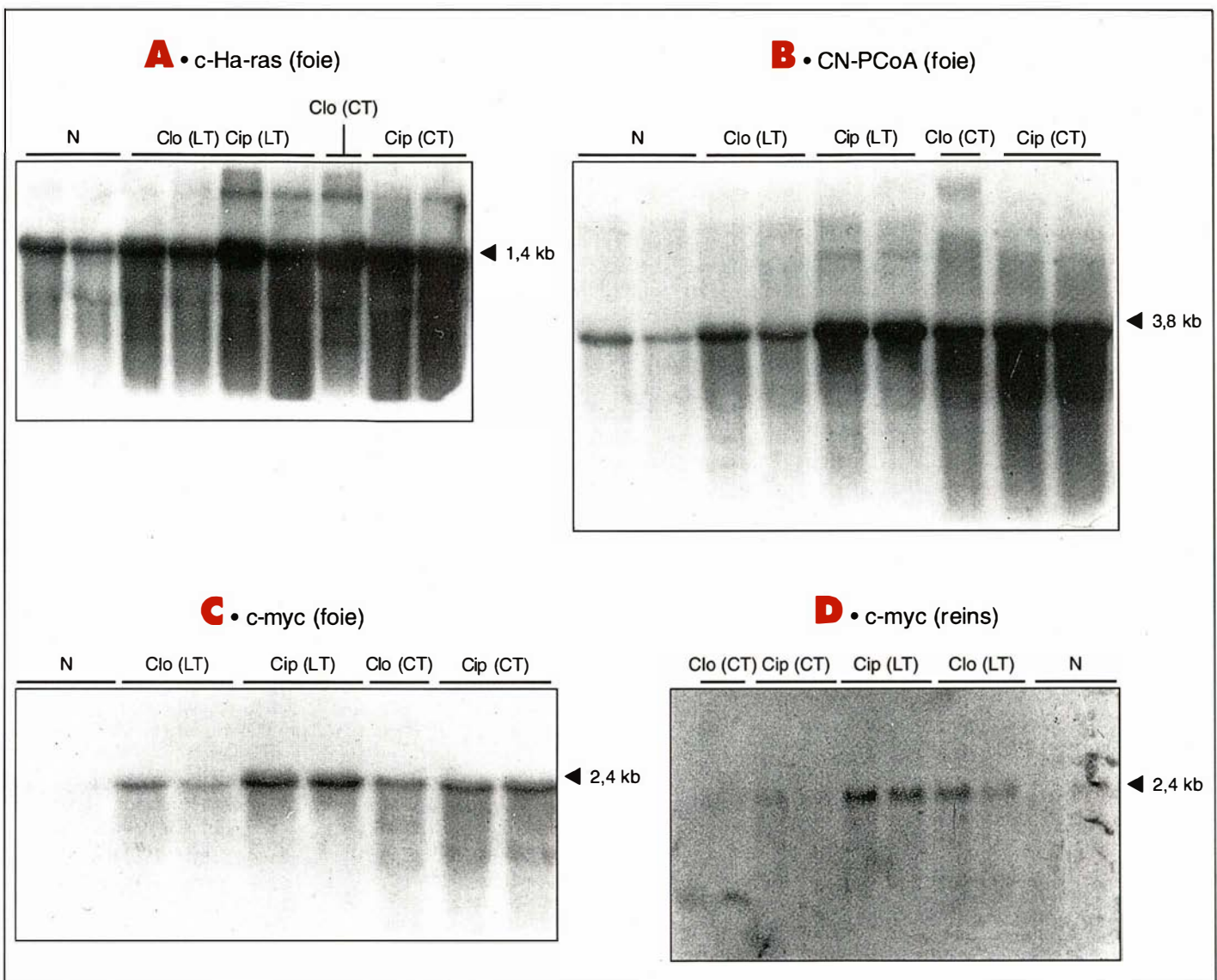


Figure 4. **Analyse en Northern blot d'ARNm de foie (A, B, C) ou de rein (D) de rat codant soit pour le proto-oncogène c-Ha-ras (A), soit pour l'acyl-CoA oxydase peroxysomiale insensible au cyanure (CN-PCoA) (B), soit pour le proto-oncogène c-myc (C et D).** Les essais correspondent aux animaux témoins (N), aux animaux traités au clofibrate (Clo) ou au ciprofibrate (Cip) pendant deux semaines (CT) ou 52 semaines (LT). (D'après [24].)

mutagène (diéthylnitrosamine ou aflatoxine). Cependant, les marqueurs de cette cancérisation ne sont pas ceux habituellement observés. Ainsi, on n'observe pas d'expression de l' $\alpha$ -foetoprotéine ou de la  $\gamma$ -glutamyl transférase [29]. Tous ces éléments ne convergeant pas vers une explication claire, nous avons recherché, en particulier, d'autres mécanismes responsables du développement de tumeurs hépatiques chez les rongeurs, en vue de répondre à la question fondamentale : « Y a-t-il, ou non, risque de

formation de tumeurs hépatiques chez l'homme à la suite d'une prise chronique d'hypolipémiants ? »

**L'hépatocarcinogénèse , démontrée chez les rongeurs, existe-t-elle chez l'homme ?**

**La piste des proto-oncogènes**

Les proto-oncogènes ont une place stratégique dans le contrôle de la croissance et de la division cellulaire,

et il existe probablement des effets synergiques entre des proto-oncogènes codant pour des protéines de la signalisation transmembranaire (cascade de réactions de phosphorylation) et d'autres codant pour des protéines nucléaires (facteurs de transcription ou autres protéines de liaison à l'ADN). Par ailleurs, des proto-oncogènes peuvent être activés dans des cellules non cancéreuses et dans des conditions physiologiques variées. Nos travaux (figure 4) ont montré, chez le rat Fischer 344, par estimation

## RÉFÉRENCES

27. Stott WT. Chemically induced proliferation of peroxisomes : implications for risk assessment. *Reg Toxicol Pharmacol* 1988 ; 8 : 125-59.
28. Srinivasan S, Glauert HP. Formation of 5-hydroxymethyl-2'-deoxyuridine in hepatic cDNA of rats treated with 8-irradiation, diethylnitrosamine, 2-acetyl aminofluorene or the peroxisome proliferator ciprofibrate. *Carcinogenesis* 1990 ; 11 : 2021-4.
29. Reddy JK, Rao MS. Xenobiotic — induced peroxisome proliferation role of tissue specificity and species differences in response in the evaluation of the implications for human health. *Arch Toxicol* 1987 ; 10 (suppl.) : 43-53.
30. Hsieh LL, Shinozuka H, Weinstein IB. Changes in expression of cellular oncogenes and endogenous retrovirus like sequences during hepatocarcinogenesis induced by a peroxisome proliferator. *Br J Cancer* 1991 ; 64 : 815-20.
31. Fox TR, Schumann AM, Watanabe PG, Yano BL, Maher VM, McCormick JJ. Mutation analysis of the H-ras oncogene in spontaneous C57BL/6 X C3H/He mouse liver tumors and tumors induced with genotoxic and non genotoxic hepatocarcinogens. *Cancer Res* 1990 ; 50 : 4014-9.
32. Lalvani ND, Alvarez K, Reddy MK, Reddy MN, Parikh I, Reddy JK. Peroxisome proliferator binding protein : identification and partial characterization of nafenopin-, clofibrac acid-, and ciprofibrate binding proteins from rat liver. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987 ; 84 : 5242-6.
33. Milton MN, Elcombe CR, Kass GE, Gibson GG. Lack of evidence for a hepatic peroxisome proliferator receptor and an explanation for the binding of hypolipodæmic drugs to liver homogenates. *Biochem Pharmacol* 1988 ; 37 : 793-8.
34. Alvarez K, Carrillon A, Yvan PM, Kawano H, Morimoto RI, Reddy JK. Identification of cytosolic peroxisome proliferator binding protein as a member of the heat shock protein HSP-70 family. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990 ; 87 : 5293-7.
35. Isseman I, Green S. Activation of a member of the steroid hormone receptor superfamily by peroxisome proliferators. *Nature* 1990 ; 347 : 645-50.
36. Osumi T, Wen JK, Hashimoto T. Two cis-acting regulatory sequences in the peroxisome proliferator-responsive enhancer region of rat acyl CoA oxidase gene. *Biochem Biophys Res Commun* 1991 ; 175 : 866-71.
37. Tugwood JD, Isemann I, Anderson RG, Bundell KR, Mc Pheat WL, Green S. The mouse peroxisome proliferator activated receptor recognizes a response element in the 5' flanking sequence of the rat acyl CoA oxidase gene. *EMBO J* 1992 ; 11 : 433-9.
- des taux d'ARNm spécifiques [24], des activations différentielles de l'expression de deux proto-oncogènes par des hypolipémiants, en fonction de la nature de ceux-ci et du tissu. Au niveau du foie, on observe — quel que soit l'agent utilisé (clofibrate ou ciprofibrate) et quel que soit le temps de traitement (2 semaines ou 1 an) —, une légère augmentation des messagers *ras* codant pour la protéine p21<sup>ras</sup> impliquée dans la signalisation transmembranaire (figure 4A). Des résultats similaires non rapportés sont observés dans les autres tissus étudiés (rein, cœur, cerveau). Les données obtenues avec *c-fos* au niveau du foie vont dans le même sens (Cherkaoui Malki, résultats non publiés). En revanche, les effets observés sur *c-myc* sont très différents puisque, dans les conditions normales, le gène n'est pas exprimé, quel que soit le tissu, alors qu'une quantité importante d'ARNm est détectée dans le foie après traitement, même bref, par les hypolipémiants (figure 4C). Dans les autres tissus étudiés, dans les mêmes conditions, seuls les reins expriment *c-myc* (figure 4D). D'autres auteurs ont étudié les ARNm *c-myc* et *c-Ha-ras* et obtenu des résultats comparables [30]. Enfin, il a été montré que les inducteurs de prolifération de peroxysomes étaient faiblement mutagènes pour le gène *c-Ha-ras* [31].
- En conclusion, chez le rat *Fischer 344*, souche très sensible aux carcinogènes chimiques, il y a surexpression de deux proto-oncogènes, *c-Ha-ras* et *c-myc*, connus pour agir en synergie. Cependant, il faut rester très prudent quant à une tentative de transposition de ces résultats chez l'homme, puisqu'à ce jour aucun travail de ce type sur matériel humain n'a été publié et que le rat *Fisher 344*, bien qu'étant la souche de référence dans les études toxicologiques, est connu pour développer des cancers spontanés.

### Récepteur(s) nucléaire(s) et régulation des gènes par les inducteurs de la profifération peroxysomiale

Depuis plusieurs années, l'hypothèse du contrôle de l'activation des gènes

codant pour les protéines de peroxysomes par un récepteur nucléaire a été avancée. Naturellement, la recherche s'est orientée vers des protéines liant avec affinité les agents inducteurs de prolifération. Il y a eu successivement plusieurs travaux faisant état (ou contestant) l'existence d'un tel récepteur : protéine hépatique liant les fibrates [32], assimilée ensuite à l'albumine [33], ou protéine de choc thermique (HSP70) [34]. Enfin, le dernier en date, un récepteur nucléaire de la superfamille du récepteur des œstrogènes, a été récemment cloné ([35] et *m/s* n° 10, vol. 6, p. 1017). Ce récepteur, appelé PPAR (*peroxisome proliferator activated receptor*), activé par les inducteurs de prolifération de peroxysomes, est fortement exprimé dans le foie de souris, mais également dans les reins et le cœur. Le pouvoir activateur sur la transcription de la protéine PPAR a été étudié comme indiqué dans *m/s* n° 10, vol. 6, p. 1017 : un ADNc hybride dont la région C (de liaison à l'ADN) provient de la séquence du récepteur des glucocorticoïdes ou des œstrogènes et la région E (de liaison du ligand) provient de PPAR a été construit et introduit par transfection dans des cellules, en même temps qu'un gène test contrôlé par des éléments de réponse aux glucocorticoïdes (GRE) ou aux œstrogènes (ERE). La protéine hybride se fixe aux éléments de réponse et active la transcription du gène test en présence d'inducteurs de prolifération des peroxysomes. En revanche, les expériences de détermination de sites de haute affinité pour ces molécules étaient, jusqu'à aujourd'hui, restées infructueuses, ce qui posait le problème de la nature du ligand de ce récepteur (*voir nouvelle de ce numéro, p. 294*).

Indépendamment, Osumi *et al.* [36] ont rapporté récemment leurs travaux sur la régulation en *cis* de l'acyl-CoA oxydase de foie de rat. Ils ont montré l'existence d'une région régulatrice en 5', située entre les positions -578 et -516, possédant deux séquences de régulation (A) et (B), l'une à effet positif, l'autre à effet négatif. La région A contient une séquence spécifique des gènes exprimés dans le foie ainsi qu'une courte séquence consensus qui est retrouvée dans les

*m/s* n° 3, vol. 8, mars 92



gènes des trois enzymes de la  $\beta$ -oxydation peroxysomiale. Cependant, l'interaction entre ces éléments actifs en *cis* et les facteurs protéiques les reconnaissant ne semble pas dépendre de la prolifération des peroxysomes.

Très récemment, Tugwood *et al.* [37] ont montré que leur récepteur (PPAR) est un facteur de régulation du gène de l'acyl-CoA oxydase qui se fixe dans la région -570, appelée PPRE (*peroxisome proliferator response element*), ce qui est en accord avec les travaux d'Osumi *et al.* [36].

Enfin, de nombreuses observations concourent au même constat : les inducteurs de prolifération de peroxysomes ne semblent pas être les ligands capables d'activer directement les facteurs de régulation. D'ailleurs, les travaux réalisés chez différentes espèces de levure font apparaître d'autres systèmes de régulation des gènes de peroxysomes ; ainsi, la protéine ADRI contrôle positivement les gènes de la catalase et des enzymes de la  $\beta$ -oxydation [38] ; le facteur d'activation ABF1 se fixe à la séquence -151 à -202 du gène de la thiolase [39].

Aussi peut-on proposer les hypothèses de travail suivantes :

- la prolifération des peroxysomes passerait par l'activation du gène du cytochrome P450 IVA1 qui engendrerait un (ou des) médiateur(s) lipidique(s) intracellulaire(s) qui serait(ent) le(s) véritable(s) ligand(s) du récepteur nucléaire contrôlant les gènes de peroxysomes. Parmi les candidats, on avance les acides gras dicarboxyliques, le leucotriène B4 ou les prostaglandines. De plus, l'activation des gènes de peroxysomes par l'acide rétinolique [18] nous conduit naturellement à faire le lien entre les propriétés du PPAR et celles du récepteur nucléaire de l'acide rétinolique. Enfin, il faut mentionner que les acides gras ramifiés (acide phytique, acide pristanique) ou non ramifiés, ou encore des acides gras modifiés (acides gras soufrés ou fluorés) sont de puissants inducteurs de prolifération des peroxysomes chez le rat. Par ailleurs, l'oléate semble remplacer les fibrates comme inducteur chez les levures ;
- l'agent inducteur se lierait à une protéine cytosolique, ce qui entraînerait, par interaction directe ou par

phosphorylation, l'activation du (ou des) récepteur(s) nucléaire(s) ;

- enfin, l'activation des gènes pourrait dépendre de la stéréo-spécificité de l'inducteur de prolifération, seul un stéréo-isomère étant parfois capable d'interagir avec le récepteur présumptif. Quelques éléments soutiennent cette hypothèse puisque l'activation de la palmitoyl-CoA oxydase, ainsi que celle du cytochrome P450 IVA1 sont différentes suivant l'énantiomère (R(+) ou S(-)) d'un analogue du clofibrate. La même observation a été faite récemment avec le MEHP (monoéthylhexylphthalate) (Lhuguenot, ENSBANA, Dijon, communication personnelle) ou le ciprofibrate (T. Gray, Sterling-Winthrop, Alnwick, UK, communication personnelle).

## Conclusions

Les travaux importants publiés ces derniers mois apportent un nouvel éclairage au mystère de la prolifération de peroxysomes, spécifique de tissu et d'espèce. La spécificité tissulaire serait due à la présence de séquences régulatrices localisées en 5' des gènes codant pour les protéines de peroxysomes. La spécificité d'espèces dépendrait largement de la pharmacocinétique de la substance, c'est-à-dire de son métabolisme (hydroxylation, glucuronocouplage) et de son taux intracellulaire, donc de son élimination urinaire.

La relation entre la prolifération des peroxysomes, la croissance et la division cellulaire normale et pathologique demande à être élucidée au niveau moléculaire. Dans ce domaine, la mesure de l'activation de certains proto-oncogènes pourrait se révéler être un marqueur précoce de la toxicité génique des inducteurs de la prolifération de peroxysomes. La cascade des signaux d'activation cellulaire depuis la surface membranaire jusqu'au noyau, par l'intermédiaire de protéines phosphorylées, n'a pas encore été assez explorée, bien qu'il ait récemment été montré qu'une protéine nucléaire, p60, était phosphorylée sous l'influence de bézafibrate. Doivent être aussi entreprises des recherches en relation avec les gènes ou les protéines impliqués dans le contrôle du cycle cellulaire, tels que

MPF (*maturation promoting factor*), *cdc2* (*cycle division control*), *cdc25* ou cycline A. A ce propos, une théorie unificatrice du contrôle de la croissance des cellules dans le règne vivant a été proposée par Nebert [40], théorie qui impliquerait des récepteurs nucléaires d'une même famille, ou d'une même origine phylogénétique, et des ligands ayant une analogie de structure, par exemple des stéroïdes, des auxines, des facteurs de différenciation chez *Dictyostelium discoideum*, ainsi que des xénobiotiques tels que le phénobarbital, la dioxine ou les inducteurs de prolifération des peroxysomes.

Dans l'état actuel des connaissances, beaucoup de travaux sont en faveur de l'idée que les risques de cancer hépatique chez l'homme soumis à une prise chronique d'hypolipémiants sont faibles compte tenu de la faible prolifération de peroxysomes observée chez les primates (dont l'homme), des faibles doses journalières de fibrates habituellement utilisées par des patients atteints d'hyperlipémie, et enfin compte tenu du métabolisme de ces molécules chez l'homme, qui est très différent de celui existant chez le rat ou la souris [41].

Cependant, on ne doit pas sous-estimer les effets de sommation de différentes substances ayant la même cible cellulaire — telles que les hypolipémiants, les additifs d'emballages alimentaires, les pesticides, les médicaments, les produits naturels ou cosmétiques (ajoutés aux facteurs endogènes de type hormonal) — auxquelles l'homme peut être exposé en raison de son mode de vie dans les civilisations occidentales. L'addition de ces éléments, associée aux prédispositions génétiques individuelles, peut ainsi vraisemblablement entraîner la création de « groupes à risque » ■

## Remerciements

Je suis reconnaissant à toutes les personnes du LBMC, du GIS Toxicologie cellulaire de Dijon, aux Laboratoires Sterling-Winthrop et à l'ARC pour leur aide efficace.

## RÉFÉRENCES

38. Simon M, Adam G, Rapatz W, Spevak W, Ruis H. The *Saccharomyces cerevisiae* ADR1 gene is a positive regulation of transcription of genes encoding peroxisomal proteins. *Mol Cell Biol* 1991 ; 11 : 699-704.
39. Einerhand AWC, Voornbrouwer TM, Erdmann R, Kunau WH, Tabak HF. Regulation of transcription of the gene coding for peroxisomal 3-oxoacyl-CoA thiolase of *Saccharomyces cerevisiae*. *Eur J Biochem* 1991 ; 200 : 113-22.
40. Nebert DW. Growth signal pathways. *Nature* 1990 ; 347 : 709-10.
41. Moody DE, Reddy JK, Lake BG, Popp JA, Reese DH. Peroxisome proliferation of non genotoxic carcinogenesis : commentary on a symposium. *Fund Appl Toxicol* 1991 ; 16 : 233-48.

### Summary

#### Peroxisomes and cell proliferation or new interest in a cell organelle

Ignored for a long time, peroxisomes are now becoming more and more attractive. Since their first isolation in 1966 by the De Duve laboratory, this interest has grown step by step due to some key metabolic functions (i.e. very long chain fatty specific  $\beta$ -oxidation, prostaglandins and polyamines catabolism, and first reactions in plasmalogen synthesis, as well as biliary salts), to their specific biogenesis mechanism and to their strong response to peroxisome proliferators. Two others major points of interest have also appeared in the past few years : the discovery of several human peroxisome-linked genetic diseases and the evidence that some peroxisome proliferators (including hypolipemic agents) can promote hepatocarcinogenesis in rodents. This review was necessary to the state of the art in the light of two recent breakthroughs : (1) the close relationship between peroxisome encoding gene activation with cell proliferation through protooncogene activation ; (2) the discovery of a peroxisome proliferator-activated nuclear receptor from the estrogen receptor superfamily.