

## L'enzyme bifonctionnelle hydratase/déshydrogénase et l'oxydation peroxysomiale des acides gras à très longue chaîne

La  $\beta$ -oxydation des acides gras a lieu en partie dans les peroxysomes et comprend plusieurs réactions enzymatiques successives; la deuxième enzyme, dite enzyme bifonctionnelle, catalyse l'hydratation puis la déshydrogénation des (dérivés d'acides gras) acyl-CoA à très longue chaîne. Ses deux fonctions principales (énoyl-CoA hydratase et 3-hydroxyacyl-CoA déshydrogénase) peuvent être associées à des activités complémentaires (épimérase, isomérase), sur la même protéine ou dues à l'action combinée de deux ou plusieurs enzymes. Ces activités enzymatiques peroxysomiales sont induites par les proliférateurs de peroxysomes qui activent des facteurs de transcription-récepteurs nucléaires, les PPAR (*peroxisome proliferator-activated receptor*). L'absence d'activité de l'enzyme bifonctionnelle est responsable de deux maladies très graves apparentées au syndrome de Zellweger, mortel dans la période néonatale.

---

Françoise Caira  
Mustapha Cherkaoui  
Malki  
Norbert Latruffe

---

**L**a  $\beta$ -oxydation des acides gras a lieu essentiellement dans les mitochondries où elle est couplée à la chaîne respiratoire, mais cette réaction est également localisée pour environ 10 % dans les peroxysomes. Ces organites sont connus pour leur implication dans la  $\beta$ -oxydation de nombreux composés, dont les intermédiaires des acides biliaires et les acides gras à très longue chaîne, ainsi que dans la biosynthèse des éthers phospholipidiques (ou plasmalogènes). Lors de la  $\beta$ -oxydation partielle

des acides gras à très longue chaîne, un acide gras à n atomes de carbone activé en acyl-CoA entre dans une spirale de dégradation dans laquelle chaque tour, qui comprend quatre réactions enzymatiques successives, le raccourcit de deux carbones (*figure 1*).

La découverte chez l'homme de deux maladies héréditaires caractérisées par l'absence de l'une de ces quatre enzymes de la  $\beta$ -oxydation peroxysomiale, l'enzyme bifonctionnelle (EB), a souligné l'importance et la complexité de cette enzyme. Le

### ADRESSE

F. Caira : *allocataire-moniteur MFSR*. M. Cherkaoui Malki : *docteur de l'université, maître de conférences*. N. Latruffe : *professeur des universités, directeur du laboratoire de biologie moléculaire et cellulaire*. LBMC, université de Bourgogne, BP 138, 21004 Dijon Cedex, France.

## RÉFÉRENCES

1. Issemann I, Green S. Activation of a member of the steroid hormone receptor superfamily by peroxisome proliferators. *Nature* 1990; 347: 645-9.
2. Latruffe N. Les peroxysomes et la prolifération cellulaire ou la prise en considération d'un organe méconnu. *médecine/sciences* 1992; 8: 239-48.
3. Wanders RJA, van Roermund CWT, Schelen A, Schutgens RBH, Tager JM, Stephenson JBP, Clayton PT. A bifunctional protein with deficient enzymatic activity: identification of a new peroxisomal disorder using novel methods to measure the peroxisomal  $\beta$ -oxidation enzyme activities. *J Inher Metab Dis* 1990; 13: 375-9.
4. Watkins PA, Chen WW, Harris CJ, Hoefler G, Hoefler S, Blake JDC, Balfe A, Kelley RI, Moser AB, Beard ME, Moser HW. Peroxisomal bifunctional enzyme deficiency. *J Clin Invest* 1989; 83: 771-7.
5. Osumi T, Hashimoto T. Purification and properties of mitochondrial and peroxisomal 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase from rat liver. *Arch Biochem Biophys* 1980; 203: 372-83.
6. Feigenbaum-Binstock J, Pramanik A, Schulz H. Isolation of a multi-enzyme complex of fatty acid oxidation from *E. Coli*. *Proc Natl Acad Sci USA* 1977; 74: 492-5.
7. Yang SU, Schulz H. The large subunit of the fatty-acid oxidation complex from *E. coli* is a multifunctional polypeptide. *J Biol Chem* 1983; 258: 9780-5.
8. Reddy MK, Usuda N, Reddy MN, Kuczmarski ER, Rao MS, Reddy JK. Purification, properties and immunocytochemical localization of human liver peroxisomal enoyl-CoA hydratase/3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase. *Biochemistry* 1987; 84: 3214-8.
9. Chen G, Balfe A, Erwa W, Hoefler G, Gaertner J, Aikawa J, Chen W. Import of human bifunctional enzyme into peroxisomes of human hepatoma cells *in vitro*. *Biochem Biophys Res Commun* 1991; 178: 1084-91.
10. Hoefler G, Forstner M, McGuinness MC, Hulla W, Hiden M, Krisper P, Kenner L, Ried T, Lengauer C, Zechner R, Moser HW, Chen GL. cDNA cloning of the human peroxisomal enoyl-CoA-hydratase-3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase bifunctional enzyme and localization to chromosome 3Q26.3-3Q28- A free left alu arm is inserted in the 3' noncoding region. *Genomics* 1994; 19: 60-7.
11. Carpenter K, Pollitt R, Middleton B. Human liver long-chain 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase is a multifunctional membrane-bound  $\beta$ -oxidation enzyme of mitochondria. *Biochem Biophys Res Commun* 1992; 182: 443-8.
12. Osumi T, Hashimoto T. Peroxisomal  $\beta$ -oxidation system of rat liver. Copurification of enoyl-CoA hydratase and 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase. *Biochem Biophys Res Commun* 1979; 89: 580-4.

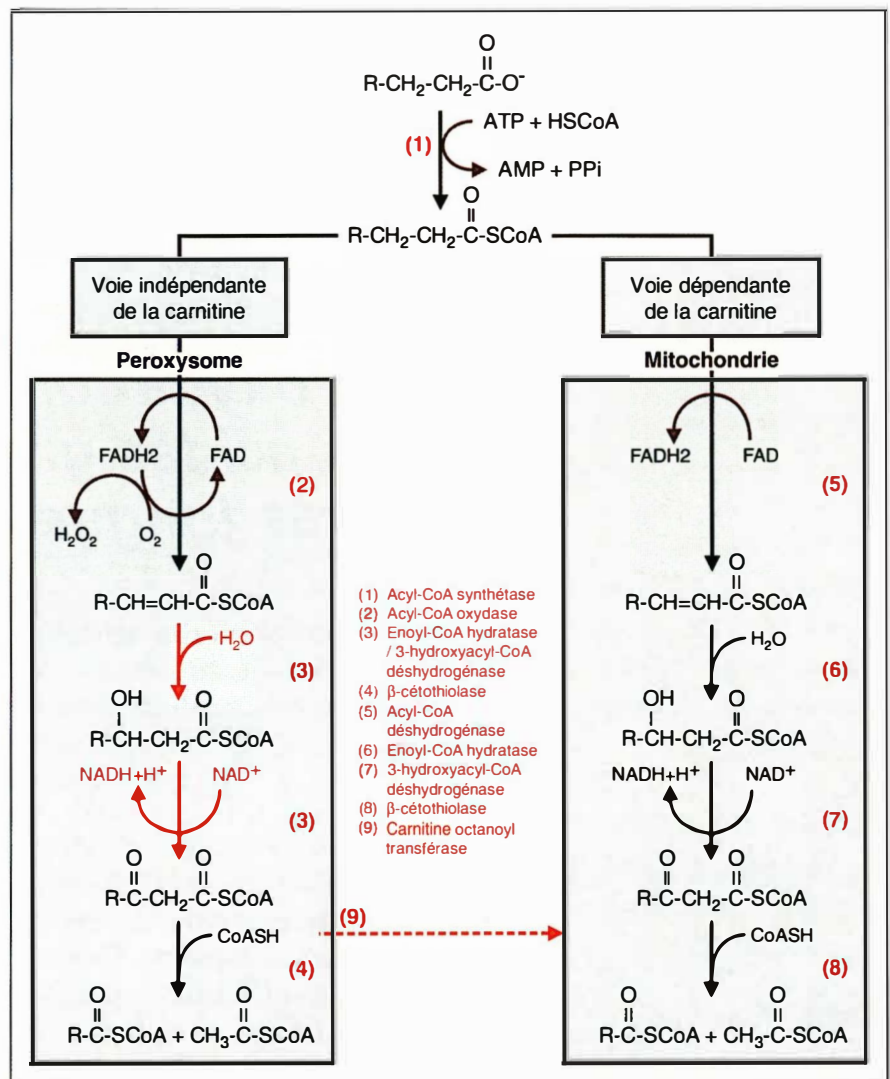


Figure 1. **Schéma des systèmes de  $\beta$ -oxydation mitochondriale et peroxysomiale des acides gras.** Dans le peroxysome, l'enzyme bifonctionnelle catalyse les deux étapes centrales de la  $\beta$ -oxydation: l'hydratation des dérivés trans 2-énol-CoA et la déshydrogénation des esters 3 hydroxyacyl-CoA (flèches rouges). Les acides gras ainsi oxydés dans les peroxysomes jusqu'au stade 8 à 10 carbones sont ensuite acheminés par des transférases (9) dans les mitochondries où la  $\beta$ -oxydation est achevée.

métabolisme des lipides a, par ailleurs, fait l'objet d'un regain d'intérêt depuis le début des années 1990 grâce à la découverte par Issemann et Green [1] du PPAR (*peroxisome proliferator-activated receptor*), récepteur nucléaire impliqué dans la régulation de l'expression des gènes codant pour les enzymes de la  $\beta$ -oxydation peroxysomiale des acides gras à très longue chaîne (*m/s n° 3*, vol. 8, p. 294) [2]. L'activité de ces enzymes est fortement augmentée chez les rongeurs lors de traitements par les

fibrates (molécules provoquant également la prolifération des peroxysomes). Chez le rat traité par ces fibrates, l'EB devient l'une des protéines les plus abondantes dans les peroxysomes hépatiques. La compréhension du mécanisme de régulation de son expression aurait des conséquences importantes dans le domaine de la santé: en effet, les fibrates hypolipémiants sont utilisés couramment chez l'homme dans la prévention des hyperlipémies et des hypercholestérolémies.

Le but de la présente revue n'est pas de recenser toutes les données disponibles sur la  $\beta$ -oxydation et les désordres peroxysomiaux, mais de résumer l'essentiel des connaissances actuelles concernant cette deuxième enzyme de la  $\beta$ -oxydation peroxysomiale, l'EB, qui catalyse l'hydratation puis la déshydrogénation des dérivés d'acyl-CoA à très longue chaîne (*figure 1*). Nous verrons quelles sont les activités qui peuvent lui être associées, quelles sont ses relations structurales et fonctionnelles avec ses analogues mitochondriales de plusieurs espèces et les maladies génétiques qui lui sont directement imputables. Enfin nous parlerons des mécanismes de régulation de l'expression des gènes de la  $\beta$ -oxydation et plus particulièrement du gène de l'EB; nous verrons ainsi pourquoi il est important de poursuivre les efforts de recherche dans ce domaine.

### **Aspects cliniques, génétiques et biochimiques de deux maladies héréditaires liées à un déficit de l'enzyme bifonctionnelle peroxysomiale**

Depuis 1982, une douzaine de maladies génétiques peroxysomiales humaines ont été découvertes et étudiées. On peut classer ces maladies en trois groupes selon que la perte des activités enzymatiques peroxysomiales est généralisée (groupe A), multiple (groupe B) ou unique (groupe C).

L'équipe de Wanders [3] d'Amsterdam (Pays-Bas) a décrit un malade qui présentait les symptômes classiques du syndrome de Zellweger (*m/s n°6, vol. 4, p. 391*) (hypotonie massive, crises, troubles visuels, surdité, altération du développement) à l'exception de la dysmorphie crânio-faciale. Des concentrations élevées d'acides gras à très longue chaîne et d'intermédiaires des acides biliaires, détectés dans le plasma du malade suggéraient une altération du système de la  $\beta$ -oxydation. Afin de vérifier si d'autres fonctions peroxysomiales étaient défaillantes, Wanders *et al.* ont mis au point un système de mesure à l'aide de fibroblastes en culture prélevés sur le malade. Ces analyses

ont révélé que la  $\beta$ -oxydation d'un acide gras saturé à 26 carbones ajouté au milieu était déficiente, alors que la synthèse de plasmalogènes et la concentration de catalase étaient normales. De façon surprenante, aucune des trois enzymes impliquées dans la  $\beta$ -oxydation des acides gras à très longue chaîne (*figure 1*) n'était absente dans les fibroblastes, comme l'a révélé une analyse par immunodétection. Les activités enzymatiques peroxysomiales ont été mesurées dans les fibroblastes en culture, et les résultats obtenus ont permis d'affirmer que cette affection nouvellement détectée était due à l'enzyme bifonctionnelle (EB) normalement présente mais fonctionnellement inactive. Cette enzyme, encore appelée énoyl-CoA hydratase et 3-hydroxyacyl-CoA déshydrogénase, catalyse les deuxième et troisième étapes de la  $\beta$ -oxydation peroxysomiale des acides gras, à savoir l'hydratation des dérivés 2-trans énoyl-CoA, suivie de la déshydrogénation des esters 3-hydroxyacyl-CoA (*figure 1*), ces deux activités étant localisées sur la même protéine. D'après les auteurs, il semblerait que ce soit l'activité hydratase qui soit déficiente dans ce cas, probablement par suite d'une mutation située au niveau du site actif.

Par ailleurs, Watkins *et al.* [4] ont décrit un jeune patient dont la maladie, diagnostiquée à l'origine comme étant une adrénoleucodystrophie (ALD) néonatale, était en fait due à un déficit de l'activité de l'enzyme bifonctionnelle. Le jeune enfant, né macrocéphale, présentait dès la naissance une hypotonie sévère, des réflexes très réduits et des contractions faciales incontrôlables. A trois mois, son développement n'avait pas progressé, et son état neurologique demeurait inchangé. Un examen du fond de l'œil ne révélait aucun des changements de la rétine caractéristiques de l'ALD néonatale et du syndrome de Zellweger. Cependant, le taux plasmatique d'acides gras à très longue chaîne était très élevé. A l'âge de cinq mois et demi, un examen radiologique révélait le développement d'une entérocologie nécrotique et le décès intervenait rapidement. L'examen post-mortem révélait que, comme chez les malades atteints d'ALD néonatale, les glandes surrénales étaient atrophiées et que le cor-

tex, habituellement composé de trois zones, était remplacé par un seul type de cellules chargées de lipides. Le thymus présentait également un cortex caractérisé par la présence de petits amas composés de gros macrophages chargés de lipides. Enfin, le foie était de taille supérieure à la normale et le cerveau enrichi en acides gras à très longue chaîne accumulés sous forme d'esters de cholestérol. C'est la concentration plasmatique élevée d'acides gras à très longue chaîne qui avait orienté le diagnostic clinique vers l'ALD néonatale. Cependant, à la différence de ce que l'on observe dans cette maladie, des analyses biochimiques et cytochimiques montraient que, dans ce cas, les peroxysomes étaient intacts et la synthèse de plasmalogènes normale. Des analyses par immunodétection révélèrent que l'enzyme bifonctionnelle (EB) était absente des échantillons de foie prélevés *post-mortem* et des fibroblastes de ce malade, alors que les première et dernière enzymes de la  $\beta$ -oxydation (acyl-CoA oxydase et  $\beta$ -cétotiolase, respectivement) étaient présentes. Bien que l'EB fût absente, les analyses par *Northern blot* démontraient cependant que l'ARNm codant pour l'EB était présent dans les fibroblastes du malade. La déficience en EB peroxysomiale était donc vraisemblablement due à un défaut post-transcriptionnel et/ou traductionnel.

Ces deux maladies héréditaires récemment détectées montrent ainsi l'intérêt qu'il y a à approfondir nos connaissances sur l'EB, dont le déficit ou le dysfonctionnement provoque des situations cliniques très graves.

### **Caractéristiques structurales et fonctionnelles de l'enzyme bifonctionnelle**

Notre choix d'étudier plus particulièrement l'EB qui catalyse les deux réactions centrales de la  $\beta$ -oxydation (*figure 1*) a été guidé par le fait surprenant que la structure de cette enzyme diffère considérablement selon sa distribution intracellulaire (mitochondrie ou peroxysome) et selon l'espèce. En effet, ces deux activités enzymatiques peuvent être por-



## RÉFÉRENCES

13. Osumi T, Ishii N, Hijikata M, Kamijo K, Ozasa H, Furuta S, Miyazawa S, Kondo K, Inoue K, Kagamiyama H, Hashimoto T. Molecular cloning and nucleotide sequence of the cDNA for rat peroxisomal enoyl-CoA: hydratase-3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase bifunctional enzyme. *J Biol Chem* 1985; 260: 8905-10.
14. Palosaari PM, Hiltunen JK. Peroxisomal bifunctional protein from rat liver is a trifunctional enzyme possessing 2-enoyl-CoA hydratase, 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase, and  $\Delta^3$ - $\Delta^2$  enoyl-CoA isomerase activities. *J Biol Chem* 1990; 265: 2446-9.
15. Smeland TE, Li J, Chu C, Cuebas D, Schulz H. The 3-hydroxyacyl-CoA epimerase activity of rat liver peroxisomes is due to the combined actions of two enoyl-CoA hydratases. *Biochem Biophys Res Commun* 1989; 160: 988-92.
16. Hiltunen JK, Palosaari PM, Kunau WH. Epimerization of 3-hydroxyacyl-CoA esters in rat liver. *J Biol Chem* 1989; 264: 13536-40.
17. Furuta S, Miyazawa S, Osumi T, Hashimoto T, Ui N. Properties of mitochondrial and peroxisomal enoyl-CoA hydratases from rat liver. *J Biochem* 1980; 88: 1059-70.
18. Uchida Y, Izai K, Orii T, Hashimoto T. Novel fatty acid  $\beta$  oxidation enzymes in rat liver mitochondria: purification and properties of enoyl-CoA hydratase/3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase/3-ketoacyl-CoA thiolase trifunctional protein. *J Biol Chem* 1992; 267: 1034-41.
19. Hiltunen JK, Wenzel B, Beyer A, Erdmann R, Fossa A, Kunau WH. Peroxisomal multifunctional  $\beta$ -oxidation protein of *Saccharomyces cerevisiae*. Molecular analysis of the *fox2* gene and gene product. *J Biol Chem* 1992; 267: 6646-53.
20. Nuttley WM, Aitchison JD, Rachubinski RA. cDNA cloning and primary structure determination of the peroxisomal trifunctional enzyme hydratase-dehydrogenase-epimerase from the yeast *Candida tropicalis* pK 233. *Gene* 1988; 69: 171-80.
21. Pawar S, Schulz H. The structure of the multienzyme complex of fatty acid oxidation from *E. coli*. *J Biol Chem* 1981; 256: 3894-9.
22. Yang X, Schulz H, Elzinga M, Yu-Yang S. Nucleotide sequence of the promoter and *fad B* gene of the *fad BA* operon and primary structure of the multifunctional fatty acid oxidation protein from *E. coli*. *Biochemistry* 1991; 30: 6789-94.
23. Palosaari PM, Vihinen M, Mäntsälä PI, Alexson SEH, Pihlajaniemi T, Hiltunen JK. Amino acid sequence similarities of the mitochondrial short chain  $\Delta^3$ , $\Delta^2$ -enoyl-CoA isomerase and peroxisomal multifunctional  $\Delta^3$ , $\Delta^2$ -enoyl-CoA isomerase, 2-enoyl-CoA hydratase, 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase enzyme in rat liver. *J Biol Chem* 1991; 266: 10750-3.

tées par deux protéines différentes, comme c'est le cas dans la mitochondrie de rat [5], ou bien être portées par la même protéine et associées à d'autres activités enzymatiques comme chez *Escherichia coli*, où une protéine multifonctionnelle possède cinq activités liées à la  $\beta$ -oxydation [6, 7]. Le terme « protéine multifonctionnelle » (PMF) sera utilisé dans cette revue pour décrire les complexes protéiques composés de plusieurs sous-unités et portant plusieurs activités enzymatiques, alors que le terme enzyme multifonctionnelle (EMF) décrira les monomères portant plusieurs activités enzymatiques réparties le long de la séquence protéique.

## L'enzyme bifonctionnelle humaine

L'EB purifiée en 1987 [8] et située dans la matrice peroxysomiale a une masse moléculaire de 79 kDa. Cette protéine possède, comme celle du rat, le tripeptide ser-lys-leu en C-terminal, responsable de son importation dans le peroxysome [9]. Récemment, Hoefler *et al.* ont cloné l'ADNc codant pour cette enzyme peroxysomiale [10]. Il comporte 3 779 nucléotides, soit 696 nucléotides de plus que celui du rat, surtout du fait d'une extension située en 3', dans la région non codante ayant très peu d'analogie entre les deux espèces (Tableau 1). Des comparaisons de séquence entre les deux espèces ont

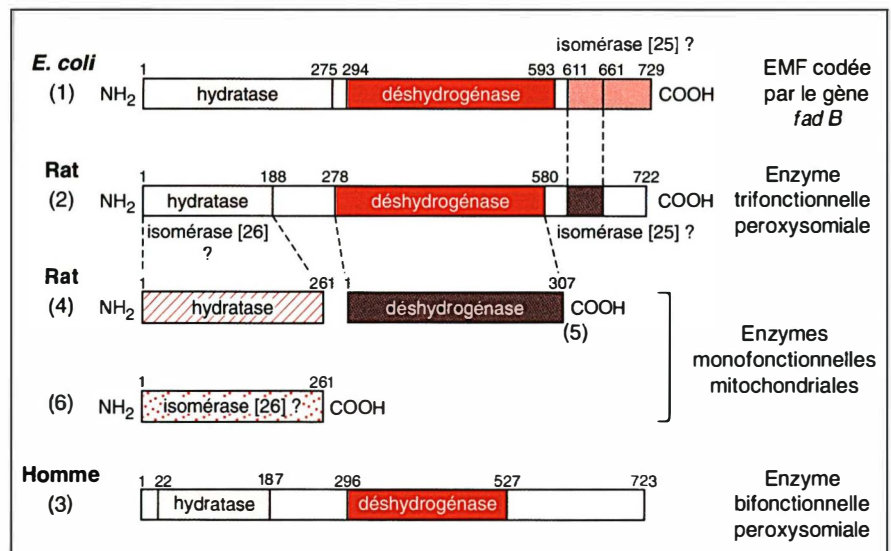


Figure 2. Localisation des domaines fonctionnels hydratase, déshydrogénase et isomérase sur les polypeptides multifonctionnels de trois espèces. Localisation des domaines fonctionnels sur l'EMF d'*E. coli* codée par le gène *fad B* (1), l'enzyme trifonctionnelle peroxysomiale de rat (2) et l'enzyme bifonctionnelle peroxysomiale humaine (3) par comparaison des séquences entre elles et avec les enzymes monofonctionnelles mitochondriales de rat (4, 5, 6). Les parties N-terminales et C-terminales des trois protéines multifonctionnelles sont fortement analogues et porteraient, respectivement, les activités énoyl-CoA hydratase et 3-hydroxyacyl-CoA déshydrogénase. La localisation de l'activité isomérase chez le rat et *E. coli* est controversée. En effet, la séquence en acides aminés de la  $\Delta^3$ - $\Delta^2$  énoyl-CoA isomérase mitochondriale de rat montre des similitudes avec les parties N-terminales de l'enzyme trifonctionnelle de rat et de l'EMF d'*E. coli* et avec la 2-énoyl-CoA hydratase mitochondriale de rat. Ces analogies ont permis aux auteurs [23] de positionner le domaine fonctionnel de l'isomérase du côté N-terminal de la protéine multifonctionnelle chez le rat et *E. coli*. Cependant, des résultats contradictoires [22] montrent que la région C-terminale de l'EMF d'*E. coli* codée par le gène *fad B* et celle de l'enzyme trifonctionnelle de rat sont analogues. Les auteurs proposent que la région allant de l'acide aminé 581 à 722 chez le rat et la région correspondante chez *E. coli* portent l'activité  $\Delta^3$ - $\Delta^2$  énoyl-CoA isomérase.

établi qu'il y a 80 % d'analogie au niveau de l'ADN et 78 % au niveau protéique. L'analyse par *Northern blot* révèle un ARNm de 3,7 kb environ, surtout abondant dans le foie et les reins. Deux régions contiennent les activités énoyl-CoA hydratase (acides aminés 22 à 187) et 3-hydroxyacyl-CoA déshydrogénase (acides aminés 296 à 527) (figure 2). Ces régions ont des analogies importantes avec celles de rat : il y a seulement un acide aminé supplémentaire chez l'homme (proline en position 68).

Tout comme chez le rat, il existe chez l'homme, à côté de ce système peroxysomial minoritaire de  $\beta$ -oxydation, des enzymes monofonctionnelles mitochondriales ainsi qu'une protéine multifonctionnelle (PMF) mitochondriale, liée à la membrane interne [11]. Cette protéine est composée de deux sous-unités non identiques, associées sous forme de tétramère. Cette PMF est particulière car, contrairement aux autres PMF connues, elle n'est pas soluble mais

localisée dans la membrane mitochondriale, et elle ne porte pas de troisième activité isomérase mais une activité thiolase.

#### L'enzyme chez le rat

Après la copurification, à partir de foie de rat, des activités énoyl-CoA hydratase et 3-hydroxyacyl-CoA déshydrogénase localisées sur le même polypeptide peroxysomial de masse moléculaire de 78 kDa [12], l'ADNc codant pour cette enzyme bifonctionnelle a été cloné [13] (Tableau I). Cette enzyme est, en fait, une protéine trifonctionnelle possédant, outre les activités déjà décrites, l'activité  $\Delta^3$ - $\Delta^2$  énoyl-CoA isomérase responsable de l'isomérisation *cis-trans* des dérivés énoyl-CoA [14]. En effet, les acides gras polyinsaturés nécessitent des enzymes auxiliaires pour leur oxydation peroxysomiale. Par comparaison avec les enzymes monofonctionnelles mitochondriales (figure 2), les activités hydratase et iso-

mérase ont été localisées dans la partie N-terminale de l'enzyme trifonctionnelle peroxysomiale, alors que l'activité déshydrogénase est située côté C-terminal (nous verrons cependant que la localisation de l'activité  $\Delta^3$ - $\Delta^2$  énoyl-CoA isomérase est contestée par d'autres chercheurs).

Dès 1989, deux groupes de chercheurs [15, 16] soulevaient le problème de l'épimérisation des composés 3-hydroxyacyl-CoA. En effet, les deux stéréoisomères D et L de ces composés coexistent dans les peroxysomes bien qu'aucune épimérase monofonctionnelle n'ait été purifiée à ce jour chez le rat. Hiltunen *et al.* [16] ont réussi à séparer par chromatographie la 2-énoyl-CoA hydratase peroxysomiale classique d'une nouvelle 2-énoyl-CoA hydratase, dite hydratase 2. Aucune des deux enzymes n'est capable de catalyser seule l'épimérisation des esters D-3 hydroxyacyl-CoA en esters L-3 hydroxyacyl-CoA, mais en recombinant les deux enzymes, on reconstitue l'activité épimérase.

Tableau I  
COMPARAISONS STRUCTURALES DE L'ENZYME BIFONCTIONNELLE PEROXYSOMIALE ET DE L'ARNm CORRESPONDANT CHEZ CINQ ESPÈCES

Espèce	Protéine			ARNm		ADNc/gène		
	SU	MM	Ig aa	Activités	Ig nt	COL	Références	Code d'accès
Homme	1	79,3 kDa	723 aa	hydratase déshydrogénase	3779 nt	2 169 nt	Reddy <i>et al.</i> [8] Chen <i>et al.</i> [9] Chatterjee <i>et al.</i> [34] Hoefler <i>et al.</i> [10]	Genbank n° L07077
Cochon d'Inde		79,3 kDa	726 aa	hydratase déshydrogénase	2 494 nt		Caira <i>et al.</i> [soumis]	EMBL n° X85112
Rat	1	78,5 kDa	722 aa	hydratase déshydrogénase isomérase	3 083 nt	2 166 nt	Osumi <i>et al.</i> [13] Ishii <i>et al.</i> [35] Palosaari <i>et al.</i> [14]	Genbank RATPECOA1
<i>S. cerevisiae</i>	2	98,7 kDa	900 aa	D-hydratase D-déshydrogénase épimérase		2 700 nt	Hiltunen <i>et al.</i> [19]	Genbank/EM BL n° M86456
		$\alpha = 42$ kDa	387 aa	thiolase				gènes <i>fad A</i> et <i>B</i>
<i>E. coli</i>	2 ( $\alpha 2\beta 2$ )	$\beta = 79,6$ kDa	729 aa	hydratase déshydrogénase isomérase épimérase	3 700 nt	3 348 nt	Feigenbaum <i>et al.</i> [6] Yang <i>et al.</i> [22]	EMBL n° X52837

SU: sous-unité; PM: poids moléculaire; Ig aa: longueur en acides aminés; COL: cadre ouvert de lecture; nt: nucléotide; kb: kilobases



## RÉFÉRENCES

24. Preisig-Müller K, Gühne-Schäfer K, Kindl H. Domains of tetrafunctional protein acting in glyoxysomal fatty acid  $\beta$ -oxidation. *J Biol Chem* 1994; 269: 20475-81.

25. Zhang B, Marcus S, Sajjadi FG, Alvares K, Reddy JK, Subramani S, Rachubinski RA, Capone JP. Identification of a peroxisome proliferator-responsive element upstream of the gene encoding rat peroxisomal enoyl-CoA hydratase/3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; 89: 7541-5

26. Bardot O, Aldridge T, Latruffe N, Green S. PPAR-RXR heterodimer activates a PPRE upstream of the bifunctional enzyme gene. *Biochem Biophys Res Commun* 1993; 192: 37-45.

27. Zhang B, Marcus SL, Miyata KS, Subramani S, Capone JP, Rachubinski RA. Characterization of protein-DNA interactions within the PPRE of the rat hydratase-dehydrogenase gene. *J Biol Chem* 1993; 268: 12939-45.

28. Alvares K, Fan G, Dadras SS, Yelandi AV, Rachubinski RA, Capone JP, Subramani S, Iannacone PM, Rao MS, Reddy JK. An upstream region of the enoyl-coenzyme A hydratase/3-hydroxyacyl-Coenzyme A dehydrogenase gene direct luciferase expression in liver in response to peroxisome proliferators in transgenic mice. *Cancer Res* 1994; 54: 2303-6.

29. Issemann I, Prince RA, Tugwood JD, Green S. The RXR enhances the function of the PPAR. *Biochimie* 1993; 75: 251-6.

30. Dreyer C, Keller H, Mahfoudi A, Laudet V, Krey G, Wahli W. Positive regulation of the peroxisomal  $\beta$ -oxidation pathway by fatty acids through activation of peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR). *Biol Cell* 1993; 77: 67-76.

31. Göttlicher M, Widmark E, Li Q, Gustafsson JA. Fatty acids activate a chimera of the clofibrate acid-activated receptor and the glucocorticoid receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; 89: 4653-7.

32. Lavau C, Jansen J, Weis K, Lamond A, Dejean A. Leucémie aiguë promyélocytaire et acide rétinoïque: le paradoxe. *médecine/sciences* 1994; 10: 817-24.

33. Ricquier D. Obésité et recherche en 1994. *médecine /sciences* 1994; 10: 1079-81.

34. Chatterjee M, Murty CVR, Olson MJ, Roy AK. Cloning and expression of the rat liver cDNA for peroxisomal enoyl-CoA hydratase, 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase in lambda gt11. *J Biochem* 1987; 166: 273-8.

35. Ishii N, Hijikata M, Osumi T, Hashimoto T. Structural organisation of the gene for rat enoyl-CoA hydratase: 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase bifunctional enzyme. *J Biol Chem* 1987; 262: 8144-50.

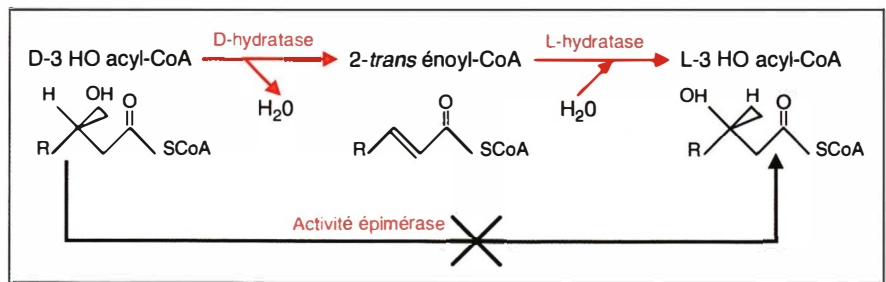


Figure 3. **Épimérisation des esters 3-hydroxyacyl-CoA.** L'épimérisation du D-3-hydroxyacyl-CoA chez le rat consisterait en la déshydratation du composé par une hydratase spécifique de la forme D, suivie de son hydratation par une hydratase spécifique de la forme L. Cette épimérisation indirecte emprunterait la voie du 2-trans enoyl-CoA comme intermédiaire. (D'après [15]).

L'hypothèse alors formulée est que l'épimérisation des esters 3-hydroxyacyl-CoA dans le foie de rat proviendrait de l'action combinée de déshydratation/hydratation catalysées par deux hydratases différentes: une énoyl-CoA hydratase spécifique de la forme D et une hydratase spécifique de la forme L comme, par exemple, l'enzyme trifonctionnelle peroxysomiale appelée également crotonase (figure 3).

Dans les mitochondries de rat, les deux activités sont catalysées par des protéines séparées [17, 5]: l'énoyl-CoA hydratase et la 3-hydroxyacyl-CoA déshydrogénase. Cependant, il existe également dans les mitochondries de foie de rat (et dans d'autres tissus) une protéine membranaire trifonctionnelle, possédant les activités 2-énoyl-CoA hydratase/3-hydroxyacyl-CoA déshydrogénase/3-cétoacyl-CoA thiolase et organisée en un oligomère de 460 kDa [18]. Ainsi, l'idée selon laquelle les protéines multifonctionnelles ne sont présentes que dans les peroxysomes et les organismes procaryotes, et que le système mitochondrial de  $\beta$ -oxydation des animaux supérieurs est constitué uniquement de protéines monofonctionnelles et structurellement indépendantes n'est actuellement plus valable.

### L'enzyme chez la levure

Chez les eucaryotes unicellulaires tels que *Saccharomyces cerevisiae*, on trouve également une protéine multifonctionnelle (PMF), sous forme d'homodimère, responsable de la  $\beta$ -oxydation des acides gras [19] (Tableau I).

La  $\beta$ -oxydation des acides gras chez cette levure suit une voie stéréochimique, jusqu'alors inconnue, via le D-3 hydroxyacyl-CoA comme intermédiaire, ce qui explique qu'on ne trouve dans cette PMF que les activités 2-énoyl-CoA hydratase 2 et D-3-hydroxyacyl-CoA déshydrogénase. L'incapacité totale de la PMF de catalyser l'oxydation des L-3-hydroxyacyl-CoA a mis en évidence aussi bien l'absence de 3-hydroxyacyl-CoA épimérase que l'absence d'une action combinée de deux hydratases de stéréospécificité différente, prouvant ainsi que la PMF ne possède pas l'activité 2-énoyl-CoA hydratase 1 (ou L-hydratase, ou crotonase).

La comparaison de la séquence protéique de cette PMF avec celles de nombreux autres champignons, dont *Candida tropicalis*, révèle des similitudes importantes [20]. Cependant, l'EMF d'*E. coli* codée par le gène *fad B*, la protéine trifonctionnelle peroxysomiale et les enzymes monofonctionnelles mitochondriales de rat ne montrent pas de similitude de séquence avec la PMF fongique. Cette absence d'analogie semble indiquer que les PMF qui catalysent des réactions de stéréospécificité différente (hydratase 1 et L-3-hydroxyacyl-CoA déshydrogénase chez le rat ou *E. coli*, contre hydratase 2 et D-3-hydroxyacyl-CoA déshydrogénase chez *S. cerevisiae*) ne seraient pas liées phylogénétiquement.

### L'enzyme chez *Escherichia coli*

Lorsque la bactérie *E. coli* est mise en culture en présence d'acides gras à

longue chaîne comme seule source de carbone, toutes les enzymes de la  $\beta$ -oxydation sont induites de façon coordonnée, comme si les gènes de la crotonase, de la 3-hydroxyacyl-CoA déshydrogénase et de la thiolase formaient un opéron. A l'aide de mutants, Feigenbaum-Binstock [6] a réussi à isoler chez *E. coli* un complexe protéique responsable de la  $\beta$ -oxydation des acides gras et possédant en effet les trois activités enzymatiques. Ce complexe utilise comme substrats aussi bien les acyl-CoA à courte et moyenne chaîne que ceux à longue chaîne.

Quelques années plus tard, Pawar et Schulz [21] mettaient en évidence la structure de ce complexe sous forme  $\alpha_2\beta_2$  (Tableau 1), ainsi que la présence de deux nouvelles activités associées : la 3-hydroxyacyl-CoA épimérase et la *cis*  $\Delta 3$ -*trans*,  $\Delta 2$  énoyl-CoA isomérase (enzymes auxiliaires nécessaires à la  $\beta$ -oxydation des acides gras polyinsaturés). Des travaux effectués par Yang et Schulz [7] ont permis de localiser sur la sous-unité  $\beta$  (codée par le gène *fad B*) les activités énoyl-CoA hydratase, 3-hydroxyacyl-CoA déshydrogénase, 3-hydroxyacyl-CoA épimérase et *cis*  $\Delta 3$ -*trans*  $\Delta 2$  énoyl-CoA isomérase alors que la thiolase est la seule enzyme associée à la sous-unité  $\alpha$  (codée par le gène *fad A*). Ces travaux ont également confirmé l'organisation en opéron (*fad BA*) de ces gènes de la  $\beta$ -oxydation.

Des analogies de séquence entre l'enzyme multifonctionnelle (EMF), codée par le gène *fad B*, et l'enzyme trifonctionnelle peroxysomiale de rat (figure 2), suggèrent l'existence d'un gène ancestral commun aux deux enzymes [22]. Cependant, ces résultats qui positionnent l'activité isomérase dans l'extrémité C-terminale sont en contradiction avec ceux de Palosaari *et al.* [23] qui localisent cette activité dans la partie N-terminale des deux protéines, en se fondant sur des analogies de séquence avec l'isomérase mitochondriale de rat. Ces résultats contradictoires peuvent sans doute s'expliquer par le fait que dans les deux études, les pourcentages d'identité entre les deux enzymes multifonctionnelles ou entre les enzymes multi- et monofonctionnelles restent faibles (figure 2) ne permettant pas aux auteurs de conclure avec certitude sur la position de cette

activité. Des expériences de mutagenèse dirigée et de synthèse de protéines tronquées pourraient éclaircir ce problème. Par ailleurs, les travaux récents de Preisig-Müller *et al.* [24], sur l'enzyme tétrafonctionnelle de glyoxysomes de concombre, situent l'activité isomérase à l'extrémité N-terminale, semblant ainsi confirmer l'hypothèse de Palosaari.

### **Mécanismes de régulation du gène de l'enzyme « bifonctionnelle »**

La prolifération des peroxysomes dans les hépatocytes de rongeurs, ainsi que l'induction sélective des activités enzymatiques de la  $\beta$ -oxydation peroxysomiale sous l'effet de traitement par les fibrates sont actuellement très bien documentées. L'enzyme trifonctionnelle devient une des protéines les plus abondantes dans les peroxysomes de foie de rat traité par les proliférateurs de peroxysomes (PP) [12]. Depuis ces premières observations, il a été montré que l'augmentation de l'activité enzymatique est, en fait, due à l'augmentation rapide de la quantité d'ARNm correspondant. C'est pourquoi Reddy *et al.* ont proposé dès 1983 que les PP agiraient sur la transcription par un mécanisme impliquant l'interaction d'un complexe ligand-récepteur avec l'ADN.

En 1990, Issemann et Green clonèrent, chez la souris, l'ADNc codant pour un récepteur activable *in vitro* par des PP dont certains hypolipémiants, d'où son nom : PPAR (*mouse peroxisome proliferator-activated receptor*) [1]. Sa structure primaire est analogue à celle des récepteurs de la famille des récepteurs des hormones stéroïdes, suggérant ainsi que, comme eux, ce PPAR est un facteur de transcription activé par un ligand (jusqu'à présent non identifié). Les récepteurs de cette famille reconnaissent sur l'ADN de courtes séquences appelées éléments de réponse aux hormones ou ERH, souvent localisées en amont des gènes cibles et agissant comme des activateurs transcriptionnels (*enhancers*). On a supposé que les gènes codant pour les enzymes induites au niveau transcriptionnel par les PP possédaient eux

aussi un élément de réponse et étaient vraisemblablement des gènes cibles du PPAR. L'analyse des promoteurs des gènes de la  $\beta$ -oxydation peroxysomiale, dont celui de l'enzyme trifonctionnelle de rat [25] a, en effet, permis l'identification d'éléments de réponse au PPAR appelés *peroxisome proliferator response element* ou PPRE. Le PPRE du gène de l'enzyme trifonctionnelle de foie de rat lui confère son activation transcriptionnelle par le PPAR [26, 27]. Ces PPRE possèdent tous une séquence consensus constituée de répétitions directes (RD, c'est-à-dire dans le même sens) de motifs « de type » TGACCT, séparés par un ou plusieurs nucléotides. Zhang *et al.* ont mis en évidence dans la région 5' flanquante du gène de l'enzyme trifonctionnelle de rat, un PPRE, similaire à celui du gène de l'acyl-CoA oxydase et situé entre -2952 et -2918 [25]. Ce PPRE confère à l'enzyme trifonctionnelle la réponse aux PP et contient trois répétitions de motifs voisins du TGACCT parfait. Les deux premiers motifs sont espacés de 2 pb et constituent la RD2 (répétition directe 2), le troisième est espacé de 1 pb du deuxième, l'ensemble constituant la RD1 (figure 4). Une bonne corrélation a été observée entre la capacité des PP d'induire *in vivo* la prolifération des peroxysomes et leur capacité d'activer, lors d'études de transfection de cellules, un récepteur chimère constitué du domaine de liaison à l'ADN du récepteur de l'œstrogène (domaine C) accolé au domaine supposé de liaison du ligand du PPAR (domaine E). Tout récemment, Alvares *et al.* [28] ont fusionné la région 3,2 kb, située en amont du gène codant pour l'enzyme bifonctionnelle et contenant le PPRE, à la région du gène rapporteur luciférase pour fabriquer des souris transgéniques. Les auteurs ont pu démontrer que trois lignées indépendantes de souris transgéniques exprimaient la luciférase en réponse au ciprofibrate, et que cette induction était spécifique du foie. Ces résultats suggèrent donc que le PPAR transmet l'effet biologique des proliférateurs. Cependant, il a été établi que si le PPAR est activé par les PP, ceux-ci ne seraient pas directement les ligands de ce récepteur, étant donné notamment la grande diversité structurale



de ces composés. En revanche, ils pourraient moduler l'activité du PPAR par un mécanisme indirect, tel qu'une perturbation du métabolisme lipidique, qui induirait le ligand naturel du PPAR. Plusieurs groupes de chercheurs ont montré que certains acides gras activaient le PPAR [29, 30]. En particulier, Göttlicher *et al.* [31] ont montré qu'un récepteur chimère composé, d'une part, du domaine de liaison à l'ADN du récepteur humain des glucocorticoïdes et, d'autre part, du domaine supposé de liaison du ligand du rPPAR (l'homologue chez le rat du mPPAR) était activé *in vitro* par les PP mais aussi par les acides arachidonique et linoléique à la concentration physiologique de 150  $\mu$ M, et par certains acides gras saturés à longue chaîne. Cependant, le mécanisme de cette activation n'est toujours pas connu. Il est peu probable que ces acides gras agissent comme des ligands directs du PPAR, mais ils peuvent, au contraire, déclencher l'apparition d'un second messager naturel qui activerait le PPAR. Une autre hypothèse plausible serait la transduction d'un signal membranaire et sa transmission au noyau par une cascade de phosphorylation.

Comme pour d'autres récepteurs nucléaires, la capacité du PPAR de se lier *in vitro* à l'ADN est fortement augmentée par l'ajout de RXR (récepteur de l'acide 9-*cis* rétinolique) au milieu [26]. Bardot *et al.* [26] ont montré que, ni le PPAR, ni le RXR seul n'étaient capables de se lier *in vitro* au PPRE de l'enzyme trifonctionnelle de rat. Ces données indiquent que le RXR est essentiel à la liaison du PPAR sur l'élément de réponse et suggèrent que les deux récepteurs s'associent et se lient au PPRE sous forme de dimère [32]. A la différence de ce qui est observé avec le PPRE de l'acyl-CoA oxydase [29], l'ajout du ligand de RXR, l'acide 9-*cis* rétinolique, n'a aucun effet transcriptionnel, indiquant que, si la présence du RXR est nécessaire à la liaison du PPAR au PPRE de l'enzyme trifonctionnelle, elle ne contribue pas à l'activation de la transcription du gène.

Deux différences apparaissent donc principalement chez le rat au niveau de la régulation de l'expression des gènes, entre l'acyl-CoA oxydase (pre-

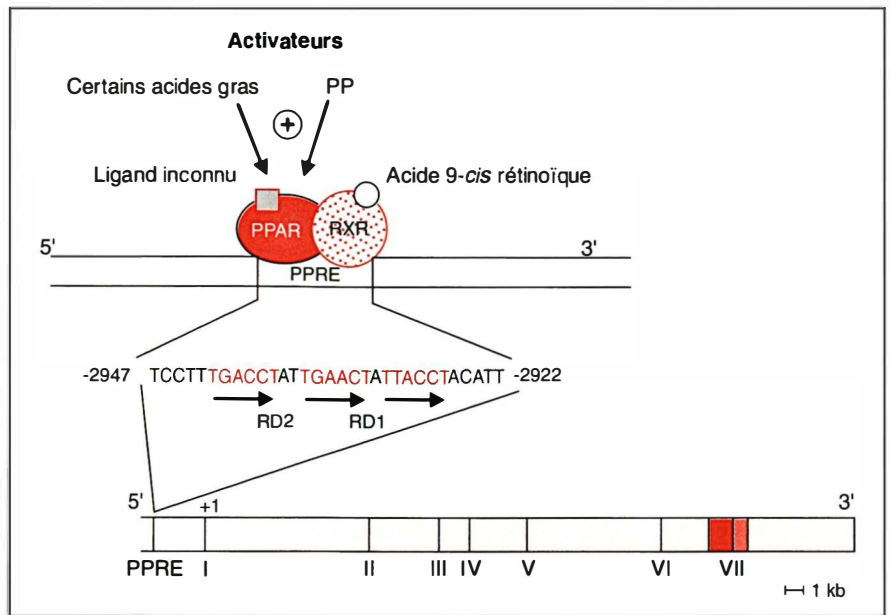


Figure 4. Structures du gène codant pour l'enzyme trifonctionnelle peroxy-somiale de rat [35] et de la région 5' flanquante du gène [26]. Les chiffres I à VII représentent les exons de ce gène de 31 kb. L'exon VII (2166 pb) est constitué de 1259 pb codantes (zone rouge) et d'une région 3' de 907 pb non codantes (zone rose). Il représente 58% de la séquence codante totale. La séquence représentée entre -2947 et -2922 contient le PPRE de l'enzyme trifonctionnelle de rat. Les trois motifs voisins de TGACCT du PPRE sont encadrés. Certains acides gras polyinsaturés à très longue chaîne et les PP seraient activateurs du PPAR. PP: proliférateur de peroxy-somes, PPAR: récepteur activé par les proliférateurs de peroxy-somes, PPRE: élément de réponse au PPAR, RD: répétition directe, RXR: récepteur à l'acide 9-*cis* rétinolique, +1: site de début de transcription.

mière enzyme limitante de la  $\beta$ -oxydation peroxy-somiale) et l'enzyme trifonctionnelle. Tout d'abord, il est surprenant de voir que, contrairement à la plupart des éléments de réponse reconnus par des récepteurs nucléaires, dont le PPRE de l'acyl-CoA oxydase, celui de l'enzyme trifonctionnelle est constitué, non pas de deux, mais de trois motifs voisins de TGACCT. Sachant que la forme RD1 est optimale pour la liaison de l'hétérodimère PPAR/RXR au PPRE de l'acyl-CoA oxydase et à l'activation transcriptionnelle du gène [29], quel peut être le rôle de ce troisième motif, contribue-t-il ou non à la régulation transcriptionnelle? La deuxième différence importante concerne le fait que, si la présence du RXR dans le milieu est indispensable à la liaison du dimère sur l'ADN, on n'est curieusement pas parvenu à démontrer qu'il intervenait dans l'activation de la transcription du gène de l'enzyme

trifonctionnelle, contrairement à l'interaction fonctionnelle des deux récepteurs observée dans le cas du gène de l'acyl-CoA oxydase [29]. Ces deux différences et le fait qu'elle soit la seule enzyme multifonctionnelle du système de  $\beta$ -oxydation peroxy-somiale font de l'enzyme «bifonctionnelle» une enzyme atypique au sein du peroxy-some.

## Conclusion

Sous le terme générique d'enzyme bifonctionnelle se cache en fait toute une famille de polypeptides enzymatiques à une ou plusieurs fonctions. Aux deux fonctions principales (énoyl-CoA hydratase et 3-hydroxyacyl-CoA déshydrogénase) peuvent être ou non associés des activités complémentaires (épimérase, isomérase), directes ou dues à l'action combinée de deux ou plusieurs enzymes. Chez *E. coli*, toutes les acti-



vités liées à la  $\beta$ -oxydation sauf une, l'acyl-CoA oxydase, sont associées en un complexe protéique composé de deux sous-unités distinctes, mais chez les mammifères les enzymes peroxy-somiales catalysant l'hydratation et la déshydrogénation des dérivés acyl-CoA sont le plus souvent associées, seules ou avec d'autres activités, sur un même polypeptide formant une enzyme dite, selon le cas, bi, tri ou multifonctionnelle. Malgré cette différence de structure, le domaine fonctionnel déshydrogénase de la protéine trifonctionnelle peroxy-somiale de rat (acides aminés 278 à 580) montre plus d'analogie avec la séquence correspondante (acides aminés 294 à 593) de l'EMF d'*E. coli*, qu'avec la séquence de la 3-hydroxyacyl-CoA déshydrogénase mitochondriale de cœur de porc. Le système de  $\beta$ -oxydation peroxy-somiale des mammifères semble donc plus proche du système procaryotique que du système mitochondrial.

Chez le malade décrit par Wanders, la déficience se situait au niveau protéique, avec une EB normale d'un point de vue immunologique mais inactive du point de vue enzymatique. Cette enzyme était-elle présente dans les peroxy-somes mais inactive ou alors était-elle située hors du peroxy-some et de ce fait rendue non fonctionnelle? Chez le malade décrit par Watkins, la protéine bifonctionnelle était absente (analyse par immunodétection) et, par conséquent, les deux activités hydratase et déshydrogénase étaient déficientes malgré la présence de l'ARNm.

Des mutations, faux-sens chez le premier malade, non-sens ou faux-sens conférant à l'enzyme une instabilité chez le second, pourraient être en cause.

La purification et la caractérisation de toutes les formes de l'enzyme bifonctionnelle sont importantes, non seulement pour les études de pathologie moléculaire, mais aussi pour l'analyse comparative des enzymes de la  $\beta$ -oxydation en relation avec l'évolution de ces enzymes et l'origine des organites et, enfin, pour mieux connaître la régulation moléculaire du métabolisme lipidique dont l'importance a été rappelée récemment [33] ■

#### TIRÉS À PART

N. Latruffe.

#### \* ABRÉVIATIONS \*

**ALD**: adrénoleucodystrophie.

**CoA**: coenzyme A.

**EB**: enzyme bifonctionnelle.

**EMF**: enzyme multifonctionnelle.

**ERH**: élément de réponse aux hormones.

**PMF**: protéine multifonctionnelle.

**PP**: proliférateur de peroxy-somes.

**PPAR**: peroxisome proliferator-activated receptor, récepteur activé par les proliférateurs de peroxy-somes.

**PPRE**: peroxisome proliferator response element, élément de réponse aux proliférateurs de peroxy-somes.

**RD**: répétition directe.

**RXR**: récepteur de l'acide 9-cis rétinolique.

### Summary

#### Involvement of the peroxisomal bifunctional enzyme hydratase dehydrogenase in the very long chain fatty acid $\beta$ -oxidation

The peroxisomal  $\beta$ -oxidation of very long chain fatty acids (VLCFA) has been extensively studied for three decades. One of its characteristics, as compared to the  $\beta$ -oxidation mitochondrial system, is that the polyunsaturated VLCFA with a double bond in an odd-numbered position can be quickly oxidized in peroxisomes, due to the presence of a multifunctional enzyme. One of its activities, the  $\Delta^3$ - $\Delta^2$  enoyl-CoA isomeration, allows their degrada-

tion in a classic way. This multifunctional enzyme is structurally different depending on the organelle and species. As two hereditary diseases are only due to the deficiency of this enzyme, purification and characterisation of all its different forms are important, not only for studying these diseases, but also on an evolutionary viewpoint. This article presents a review of the generally termed "bifunctional enzyme", its evolution, and its significance in clinical studies.