

La cascade mitogène de l'AMPc dans la thyroïde et dans d'autres tissus

L'hormone hypophysaire thyrotrope, TSH, par la liaison à son récepteur et l'activation de l'adénylyl cyclase, provoque une élévation de la concentration d'AMPc intracellulaire, responsable de la stimulation de la fonction, de la prolifération et de la différenciation des thyrocytes. La cascade de l'AMPc est caractérisée par une élévation précoce et transitoire des proto-oncogènes c-Myc et JunB. La régulation temporelle très précise de leur expression pourrait rendre compte de la stimulation de la prolifération tout en maintenant l'expression de la différenciation. La cascade mitogène de l'AMPc est, jusqu'au niveau des cyclines et de leurs kinases, distincte des cascades activées par les facteurs de croissance ou la protéine kinase C. Son activation constitutive provoque la formation d'adénomes hyperfonctionnels ou d'hyperfonctionnements congénitaux; son inactivation conduit à l'hypofonctionnement et à l'atrophie de l'organe cible.

Carine Maenhaut
Isabelle Pirson
Mireille Baptist
Françoise Lamy
Françoise Miot
Pierre Roger
Jacques E. Dumont

Remerciements

Les travaux du laboratoire mentionnés dans cette revue ont bénéficié du soutien du Ministère de la politique scientifique (PAI), du Fonds national de la recherche scientifique, du Fonds Télévie, de l'Association belge Contre le Cancer, de l'Association sportive Contre le Cancer, de l'APMO et du programme Biomed de la Communauté européenne.

ADRESSES

C. Maenhaut : première assistante. F. Lamy, F. Miot : chef de travaux. J.E. Dumont : professeur. P. Roger : chercheur qualifié au Fonds national de la recherche scientifique. I. Pirson, M. Baptist : chercheur « Télévie ». Institut de recherches interdisciplinaires, faculté de médecine, université libre de Bruxelles, campus Erasme, 808, route de Lennik, B-1070 Bruxelles, Belgique.

TIRÉS À PART

C. Maenhaut.

La prolifération cellulaire résulte d'une succession d'événements réglés par des signaux biologiques pouvant agir positivement ou négativement. Les signaux extracellulaires réglant la prolifération sont transmis à des protéines spécifiques, les récepteurs, entraînant ainsi une première réponse (formation d'un signal intracellulaire, phosphorylation de protéines cibles) qui a de multiples conséquences, chacune de celles-ci entraînant d'autres événements (phosphorylations, induction de gènes) et ainsi de suite. Des rétroactions existent entre des événements aux différents niveaux de la cascade. L'ensemble de ces relations cause-effet est appelé cascade de régulation. Un réseau ou circuit de régulation

est constitué de plusieurs cascades et de leurs interactions. La cinétique des événements suivant un signal permet de les classer en précoces ou tardifs (*early immediate, early ... late*). Les mécanismes de base directement impliqués dans la décision ultime qu'est la division cellulaire sont vraisemblablement communs à toutes les voies mitogènes et bien conservés dans les différentes cellules eucaryotes : en effet, des études de complémentation de levures bloquées par défaut génétique dans leur cycle cellulaire et incapables de se diviser ont abouti à la mise en évidence de gènes homologues et agissant de façon similaire dans les cellules de mammifères et de levure. Citons l'exemple de la kinase CDC2 qui fait aussi partie du complexe induisant la

méiose des ovocytes [1]. En revanche, les modes de régulation permettant le contrôle des mécanismes de base de la prolifération cellulaire par les signaux extracellulaires varient de manière importante d'un type cellulaire à l'autre, et, pour un même type cellulaire, d'une espèce à l'autre. Le rôle même des cascades de régulation, positif ou négatif, varie aussi d'un type cellulaire à l'autre. La voie phorbol-ester (TPA)/protéine kinase C induit dans la thyroïde prolifération et dédifférenciation, mais exerce des effets opposés dans les kératinocytes. La voie de l'AMPc inhibe la prolifération des fibroblastes et des lymphocytes, mais la stimule pour les thyrocytes et les kératinocytes [2]. Nos connaissances et perceptions actuelles de la régulation de la prolifération dérivent principalement d'études réalisées *in vitro* sur des lignées fibroblastiques. Ces cellules constituent un modèle expérimental bien défini et reproductible, bien que leur immortalité suggère l'existence d'altérations génétiques. Deux voies intracellulaires principales reliant le signal extracellulaire et la mitogenèse ont été décrites : les voies

des facteurs de croissance activant leur récepteur à activité protéine tyrosine kinase, et les voies comportant les agents qui activent le renouvellement du phosphatidylinositol bisphosphate, avec production d'inositol triphosphate et de diacylglycérol [3]. Le diacylglycérol ou ses analogues pharmacologiques, les esters de phorbol, activent la protéine kinase C. Bien que clairement distinctes dans leur partie initiale (niveau des récepteurs, des premiers signaux intracellulaires), ces voies convergent sur différents événements tels que l'activation de l'échange Na⁺/H⁺, la phosphorylation sur résidus tyrosine des MAP-kinases, et l'augmentation des taux d'ARNm des proto-oncogènes c-Myc et c-Fos [4]. Une troisième cascade impliquée dans la régulation de la prolifération cellulaire est la voie de l'AMPc. Dans les années 1970, il était généralement admis que l'AMPc était un régulateur négatif de la prolifération. Ce dogme était le résultat d'études réalisées sur des fibroblastes et lignées cellulaires d'origine mésenchymateuse. Les faits et conclusions étaient valables, la généralisation abusive. En réalité, dans de nom-

breuses cellules épithéliales ainsi que dans la levure *Saccharomyces cerevisiae*, l'AMPc apparaît au contraire comme un régulateur positif de la prolifération [2, 5]. Dans la glande thyroïde humaine ou canine*, les trois types de voies de prolifération décrites ci-dessus coexistent. Les voies des récepteurs de facteurs de croissance à activité tyrosine kinase peuvent être subdivisées en deux branches. Certains facteurs de croissance (EGF, par exemple) induisent la prolifération des thyrocytes tout en réprimant l'expression des caractéristiques de différenciation (expression des gènes spécifiques du thyrocyte, thyroglobuline, thyroperoxydase, récepteur de la thyrotropine ou TSH...). D'autres facteurs, comme le FGF ou l'IGF1 sont, soit mitogènes comme le FGF, soit nécessaires à l'effet prolifératif d'autres facteurs sans être mitogènes par eux-mêmes, comme l'IGF1, mais ces agents n'inhibent pas l'expression des caractéristiques de la différenciation. La cascade de l'AMPc, activée par l'hormone hypophysaire TSH, quant à elle, stimule à la fois la prolifération et l'expression des gènes de l'état différencié [6].

Rôle de la cascade de l'AMPc dans la thyroïde

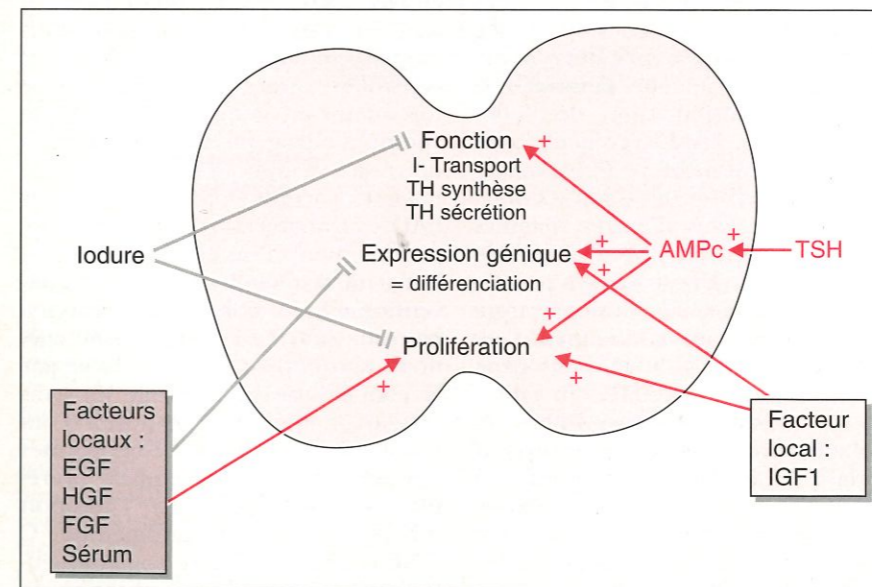


Figure 1. Principaux contrôles physiologiques s'exerçant sur la fonction, la différenciation et la prolifération de la cellule thyroïdienne. EGF : epidermal growth factor. FGF : fibroblast growth factor. HGF : hepatic growth factor. I : iodure. IGF1 : somatomedine C. TH : hormones thyroïdiennes T4 et T3. TSH : thyrostimuline.

La cellule thyroïdienne est soumise à deux régulations physiologiques opposées : stimulation par la thyrotropine hypophysaire, dont la sécrétion est inhibée par l'hormone thyroïdienne, et inhibition par un dérivé oxydé de l'iodure synthétisé par le thyrocyte et encore non identifié (appelé XI) (figure 1) [6, 7]. Les effets de la TSH sont relayés par l'activation de l'adénylyl cyclase et l'augmentation rapide (moins d'une minute) et durable (au moins deux jours), des concentrations d'AMPc intracellulaires. Elle active la fonction, induit l'expression de gènes spécifiques de la thyroïde tels la thyroglobuline, la thyroperoxydase, le transporteur d'iodure, etc. (effet de différenciation) ; elle active aussi la prolifération (synthèse d'ADN, multi-

* Dans la suite du texte, sauf exception explicite, les données expérimentales discutées concernent des thyrocytes des deux espèces, humaine et canine.

RÉFÉRENCES

1. Nurse P. Universal control mechanism regulating onset of M-phase. *Nature* 1990 ; 3 : 503-8.
2. Dumont JE, Jauniaux JC, Roger PP. The cyclic AMP-mediated stimulation of cell proliferation. *Trends Biochem Sci* 1989 ; 14 : 67-71.
3. Chambard JC, Paris S, L'Allemain G, Pousségur J. Two growth factor signalling pathways in fibroblasts distinguished by permissis toxin. *Nature* 1987 ; 326 : 800-3.
4. Chardin P. Protéines Ras et transmission des signaux mitogènes. *médecine/sciences* 1994 ; 10 : 657-64.
5. Boynton AL, Whitfield JF. The role of cyclic AMP in cell proliferation : a critical assessment of the evidence. *Adv Cyclic Nucleotide Res* 1983 ; 15 : 193-294.
6. Dumont JE, Lamy F, Roger P, Maenhaut C. Physiological and pathological regulation of thyroid cell proliferation and differentiation by thyrotropin and other factors. *Physiol Rev* 1992 ; 72 : 667-97.
7. Van Sande J, Grenier G, Willems C, Dumont JE. Inhibition by iodide of the activation of the thyroid cyclic 3',5'-AMP system. *Endocrinology* 1975 ; 96 : 781-6.
8. Roger P, Hotimsky A, Moreau C, Dumont JE. Stimulation by thyrotropin, cholera toxin and dibutyryl cyclic AMP of the multiplication of differentiated thyroid cells *in vitro*. *Mol Cell Endocrinol* 1982 ; 26 : 165-76.
9. Roger PP, Taton M, Van Sande J, Dumont JE. Mitogenic effects of thyrotropin and cyclic AMP in differentiated human thyroid cells *in vitro*. *J Clin Endocrinol Metab* 1988 ; 66 : 1158-65.
10. Wynford-Thomas D, Smith P, Williams ED. Proliferative response to cyclic AMP elevation of thyroid epithelium in suspension culture. *Mol Cell Endocrinol* 1987 ; 51 : 163-6.
11. Dere WH, Rapoport B. Control of growth in cultured rat thyroid cells. *Mol Cell Endocrinol* 1986 ; 44 : 195-9.
12. Endo T, Shimura H, Saito T, Onaya Y. A cloning of malignantly transformed rat thyroid (FRTL) cells with thyrotropin receptors and their growth inhibition by 3',5'-cyclic adenosine monophosphate. *Endocrinology* 1990 ; 126 : 1492-7.
13. Tramontano D, Rotella CM, Toccafondi R, Ambesi-Impiombato SF. Thyrotropin-independent mutant clones from FRTL-5 rat thyroid cells : hormonal control mechanisms in differentiated cells. *Endocrinology* 1986 ; 118 : 862-8.

plication cellulaire). Tous ces effets peuvent être reproduits par les analogues de l'AMPc ainsi que par les activateurs généraux de l'adénylyl cyclase (forskoline, toxine du choléra) [6]. L'iodure et son dérivé postulé XI inhibent la fonction et la prolifération de la cellule thyroïdienne, principalement en inhibant l'adénylyl cyclase.

Le rôle mitogène de la TSH et de l'AMPc a été démontré dans des cellules thyroïdiennes canines [8], humaines [9] et murines [10] en culture ainsi que dans la lignée de cellules thyroïdiennes de rat FRTL-5 [11]. Toutefois, le rôle de l'AMPc, dans ces cellules, peut être inversé en modifiant leur phénotype : ainsi, dans des cellules tumorales dédifférenciées dérivées des FRTL-5, l'AMPc inhibe la prolifération comme dans les fibroblastes [12]. Dans d'autres clones de FRTL-5 mutées, on observe au contraire une croissance indépendante de la TSH et de l'AMPc [13]. Tout cela montre que la voie mitogène de l'AMPc est un des caractères de différenciation de la cellule thyroïdienne et que ce caractère peut être perdu. La stimulation de la prolifération par l'AMPc est relayée par l'activation des protéines dépendantes de l'AMPc (PKA). La PKA de type I jouerait un rôle prédominant dans ce processus. En effet, des combinaisons d'analogues de l'AMPc activant spécifiquement cette enzyme ont un effet mitogène puissant. De plus, la désensibilisation de l'effet prolifératif de l'AMPc coïncide avec une régulation négative (*down regulation*) de la PKA, et des données obtenues *in vivo* dans d'autres systèmes sont également en faveur d'un rôle positif de cette kinase dans la prolifération [6] (figure 2). Plusieurs arguments convaincants soutiennent l'extrapolation *in vivo* du rôle mitogène de la cascade de l'AMPc *in vitro* : (1) les autoanticorps thyroïdiens stimulants dirigés contre le récepteur de la TSH activent ce récepteur. La stimulation chronique de la glande aboutit à l'hyperthyroïdie de la maladie de Basedow. Aux concentrations présentes *in vivo*, ces immunoglobulines activent exclusivement la cascade de l'AMPc dans les cellules thyroïdiennes humaines [14]; (2) le récepteur de l'adénosine A2 se comporte, dans des cellules transfectées

avec le gène codant pour ce récepteur, comme un activateur physiologique constitutif de l'adénylyl cyclase. Dans les cellules thyroïdiennes de chien en culture primaire, son expression est suffisante pour induire la synthèse d'ADN [15]. Exprimé dans la thyroïde de souris transgéniques, il induit hyperthyroïdie et goitre (croissance). Les souris meurent finalement, soit des suites de leur hyperthyroïdie, soit, si elles ont été traitées par des agents antithyroïdiens, des conséquences de leur énorme goitre (notamment par compression de leur trachée) [16]; (3) des mutations conférant au récepteur de la TSH une activation constitutive de l'adénylyl cyclase induisent aussi adénomes hyperfonctionnels et hyperthyroïdie congénitale (*m/s n° 12, vol. 9, p. 1421*).

Les étapes biochimiques de la cascade de l'AMPc et de la voie des facteurs de croissance dans la thyroïde

Dans les cellules animales quiescentes, la phase préreplicative, phase de latence de 10 à 20 h, sépare les premiers événements, qui suivent l'interaction d'un facteur de croissance avec ses récepteurs, du début de la synthèse d'ADN. La progression dans le cycle cellulaire est principalement contrôlée durant cette phase. Une fois atteint un stade tardif spécifique (point d'engagement ou de restriction), les cellules sont engagées de manière irréversible à répliquer l'ADN et à effectuer la mitose, indépendamment d'un contrôle externe. Dans un système expérimental conventionnel, le fibroblaste embryonnaire de souris 3T3, l'action mitogène du sérum peut être remplacée par la coopération séquentielle de trois facteurs : une brève exposition au PDGF rend les cellules compétentes à progresser à travers la phase préreplicative en réponse à l'addition d'EGF puis de somatomédine C (IGF-1) ; cette dernière contrôle seule l'engagement de la réplication de l'ADN. Ce modèle a, le premier, fait apparaître la phase préreplicative comme une séquence ordonnée d'événements régulateurs majeurs [17].

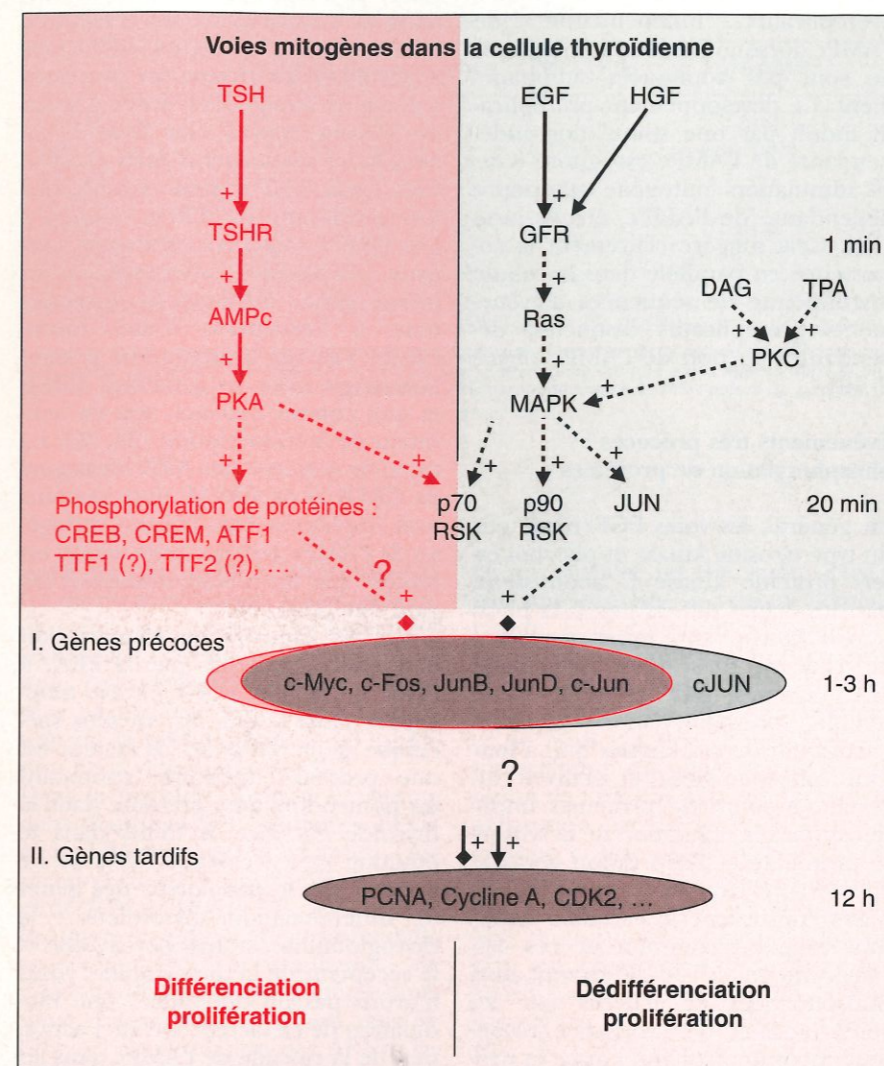


Figure 2. Voies mitogènes de la cellule thyroïdienne. Les voies contrôlées par des facteurs de croissance, bien que présentant chacune leur spécificité, sont regroupées en une voie, qui converge rapidement avec la voie des promoteurs de tumeur (esters de phorbol) et de la protéine kinase C au niveau des MAP kinases. La cascade de l'AMPc est principalement activée dans la thyroïde par la TSH et son récepteur. ATF1, CREB, CREM : facteurs de transcription dont l'activité est réglée par l'AMPc ; PKA : protéine kinases activées par l'AMPc ; CDK : kinases activées par les cyclines. c-Myc, c-Fos, c-Jun, JunB, JunD : facteurs de transcription, proto-oncogènes. Cycline A : cycline contrôlant les kinases (CDK2). DAG : diacylglycérol. EGF : epidermal growth factor. GFR : récepteurs de facteurs de croissance. HGF : hepatic growth factor. MAPK : kinase activée par les mitogènes. PCNA : proliferating cell nuclear antigen. PHOS., PROT. : protéines phosphorylées. PKC : protéine kinase C. Ras : protéine G, proto-oncogène. RSK : S6 kinases réglées par des signaux extracellulaires. TPA : tumor promoting agents, esters de phorbol. TSH : thyrostimuline. TSH-R : récepteur de la TSH. TTF1, TTF2 : facteurs de transcription spécifiques de la cellule thyroïdienne et impliqués dans la différenciation et dans l'expression de gènes spécifiques de la thyroïde.

Caractéristiques cinétiques

Les cellules thyroïdiennes de chien, cultivées sans sérum mais en présence d'insuline, restent quiescentes. La TSH et l'AMPc, l'EGF, l'HGF, le TPA ou le sérum induisent la synthèse d'ADN d'une part significative (20 % à 60 %) de la population cellulaire, après une phase préreplicative de 16 à 20 h. En combinaison, la TSH, l'EGF et le sérum induisent la synthèse d'ADN dans 90% des cellules, et une prolifération qui se poursuit pendant au moins 5 cycles avec un temps de cycle minimum de 26 h [18]. Lorsque l'on compare la stimulation dépendante de l'AMPc (TSH) à une stimulation équipotente indépendante de l'AMPc (EGF + sérum), on observe un allongement du cycle cellulaire en phase S et surtout en phase G2 [19] ; cet allongement reflète probablement l'influence négative universelle de l'AMPc sur la transition G2/mitose, qui coexiste ici avec un puissant effet de l'AMPc sur la progression en phase G1. Dans les cellules thyroïdiennes, la stimulation par la TSH dépend de concentrations physiologiques d'insuline ou de somatomédine C (IGF-1), alors que la stimulation par l'EGF requiert l'activation des récepteurs de l'IGF-1 [18]. Une analyse cinétique montre que l'ensemble de la progression en phase préreplicative, jusqu'à un stade précédant de peu l'initiation de la synthèse d'ADN, dépend de l'action coordonnée et continue de l'AMPc et de l'IGF-1 [20].

L'EGF stimule la progression en phase préreplicative de cellules thyroïdiennes, de manière indépendante de l'AMPc, mais aussi en synergie avec celui-ci. Dans des cellules traitées simultanément par l'EGF et la forskoline, cette synergie se traduit par une augmentation de la fraction de cellules qui prolifèrent et par un raccourcissement de 4 h de la phase préreplicative compensé par un allongement de la phase de synthèse d'ADN [19]. Lorsque les additions d'EGF et de forskoline (AMPc) sont espacées de 24 h, une amplification de la réponse proliférative est également observée, mais avec un délai égal à la durée complète de la phase préreplicative. Ce résultat est particulièrement étonnant, car l'AMPc et l'EGF peuvent contrôler indépen-

RÉFÉRENCES

14. Laurent E, Van Sande J, Ludgate M, Corvilain B, Rocmans P, Dumont JE, Mockett J. Unlike thyrotropin, thyroid-stimulating antibodies do not activate phospholipase C in human thyroid slices. *J Clin Invest* 1991; 87: 1-9.
15. Maenhaut C, Van Sande J, Libert F, Abramowicz M, Parmentier M, Vanderhaeghen JJ, Dumont JE, Vassart G, Schiffmann S. RDC8 codes for an adenosine A2 receptor with physiological constitutive activity. *Biochem Biophys Res Commun* 1990; 173: 1169-78.
16. Ledent C, Dumont JE, Vassart G, Parmentier M. Thyroid expression of an A2 adenosine receptor transgene induces thyroid hyperplasia and hyperthyroidism. *EMBO J* 1992; 11: 537-42.
17. O'Keefe EJ, Pledger WJ. A model of cell cycle control: sequential events regulated by growth factors. *Mol Cell Endocrinol* 1983; 31: 167-86.
18. Lamy F, Roger PP, Contor L, Reuse S, Raspé E, Van Sande J, Dumont JE. Control of thyroid cell proliferation: the example of the dog thyrocyte. *Horm Cell Regul* 1987; 153: 169-80.
19. Baptist M, Dumont JE, Roger PP. Demonstration of cell cycle kinetics in thyroid primary culture by immunostaining of proliferation cell nuclear antigen. *J Cell Science* 1993; 105: 69-80.
20. Roger PP, Servais P, Dumont JE. Regulation of dog thyroid epithelial cell cycle by forskolin, an adenylate cyclase activator. *Exp Cell Res* 1987; 172: 282-92.
21. Thomas G. MAP kinase by any other name smells just as sweet. *Cell* 1992; 68: 3-6.
22. Lamy F, Wilkin F, Baptist M, Posada J, Roger PP, Dumont JE. Phosphorylation of mitogen-activated protein kinases is involved in the epidermal growth factor and phorbol ester but not in the thyrotropin/cAMP, thyroid mitogenic pathway. *J Biol Chem* 1993; 268: 8398-401.
23. Contor L, Lamy F, Lecocq R, Roger PP, Dumont JE. Differential protein phosphorylation in induction of thyroid cell proliferation by thyrotropin, epidermal growth factor, or phorbol ester. *Mol Cell Biol* 1988; 8: 2494-503.
24. Sassone-Corsi P. Le gène CREM et les bases moléculaires de l'horloge biologique. *médecine/sciences* 1993; 9: 1253-5.
25. Angrand PO. Les domaines de liaison à l'ADN des facteurs de transcription eucaryotes. *médecine/sciences* 1993; 9: 725-36.

damment l'ensemble de la progression en phase préreplicative [20]. Il indique que les événements induits lors d'une stimulation dépendante de l'AMPc ne peuvent être intégrés dans une séquence d'événements préreplicatifs indépendante de l'AMPc, lorsque les deux stimulations ne sont pas appliquées simultanément. Le développement préreplicatif induit par une stimulation indépendante de l'AMPc est ignoré dans la stimulation mitogène ultérieure dépendante de l'AMPc, et *vice versa* [18]. Cela suggère clairement la coexistence en parallèle dans la cellule thyroïdienne de séquences d'événements préreplicatifs distinctes, dépendantes ou non de l'AMPc (figure 2) [6].

Événements très précoces : phosphorylation de protéines

En général, les voies EGF/récepteur du type tyrosine kinase et phorbol esters/protéine kinase C aboutissent, par des étapes différentes, à la phosphorylation sur thréonine et tyrosine de chacune des deux principales MAP kinases p42 et p44. Cette double phosphorylation entraîne l'activation de ces kinases qui, à leur tour, phosphorylent et activent un certain nombre de protéines impliquées dans la régulation de la synthèse protéique et l'expression génique (p90RSK, c-Myc, etc). Les MAP kinases constituent le véritable carrefour et point commun de ces cascades mitogènes [21]. Elles sont aussi phosphorylées et activées par les voies facteurs de croissance/récepteurs tyrosine protéine kinase et protéine kinase C dans les cellules thyroïdiennes (figure 2). La voie mitogène dépendante de l'AMPc, au contraire, stimule la phosphorylation de onze protéines spécifiques qui n'incluent pas les MAP kinases. La phosphorylation et l'activation de ces kinases n'est donc pas requise pour l'effet mitogène de l'AMPc [22]. De plus, les deux premières voies d'une part, et la voie AMPc, d'autre part, entraînent la phosphorylation d'ensembles différents de protéines [23]. Dans la voie dépendante de l'AMPc, l'activation des protéine kinases (PKA) conduit à une translocation de leur sous-unité catalytique vers le noyau où celle-ci phosphoryle et acti-

ve des protéines nucléaires, notamment celles du type CREB ou CREM (*cyclic AMP response element binding protein* ou *modulator*) ou ATF (*activating transcription factor*) (*m/s n° 4, vol. 7, p. 506*). Cette famille de facteurs de transcription est constituée d'au moins dix protéines différentes appartenant au groupe des protéines à domaine basique et à tirette à leucine (*leucine zipper*). Ces facteurs se lient à des séquences d'ADN du type CRE (*cyclic AMP response element*) sous forme d'homo- ou d'hétérodimères. Les CREM, dont les messagers sont issus d'épissages alternatifs d'un même gène, inhibent la transcription, à l'exception d'une forme CREM Tau qui présente une grande homologie avec les protéines CREB et qui, comme celles-ci, agit en activateur de la transcription [24, 25]. La thyroïde contient des ARN messagers de CREB et de CREM, dont certains sont impliqués dans l'action mitogène de l'AMPc puisque cette action est inhibée par un mutant dominant négatif de CREB [26]. Outre les facteurs de transcription ubiquitaires modulés par la PKA, il existe un facteur TTF-1 (*thyroid transcription factor-1*) qui, lui, est plus spécifique de la thyroïde. Ce facteur est une protéine nucléaire, contenant un homéodomaine, présente dans la thyroïde et, chez le fœtus dans le poumon et le cerveau. TTF-1 se lie sur et règle le promoteur des gènes de différenciation thyroïdiens : la thyroglobuline, la thyroperoxydase et le récepteur de la thyrotropine. Nous n'avons pas pu démontrer une modulation de ce facteur lors de l'activation de la cascade de l'AMPc dans les thyrocytes, mais il est possible que l'expression de ce facteur, comme celle de GHF1 dans l'hypophyse, soit nécessaire pour la stimulation mitogène.

Événements précoces : l'induction des proto-oncogènes

Les proto-oncogènes des familles Myc, Fos et Jun font partie des facteurs de transcription jouant un rôle important dans la régulation de la prolifération et de la différenciation. Dans un grand nombre de cellules, leur expression est rapidement et transitoirement activée ou induite par les stimuli mitogènes et semble

Tableau I
ACTION DES FACTEURS DE CROISSANCE (EGF, HGF, SÉRUM), DES ESTERS DE PHORBOL ET DE LA CASCADE TSH-AMPc SUR L'EXPRESSION DES GÈNES D'EXPRESSION RAPIDE (EARLY IMMEDIATE GENES) DANS LA THYROÏDE

	Facteurs de croissance	PKC-TPA	TSH-AMPc
c-MYC	↑	↑	↑ puis ↓
MAX	rien puis ↑	rien puis ↑	rien puis ↓
c-JUN	↑	↑	↓
JUN	↑	↑	↑ puis ↓
JUNB	↑	↑	↑ puis ↓
c-FOS	↑	↑	↑
Prolifération	+	+	+
Différenciation	-	-	+

Certaines modulations sont biphasiques. Il faut noter que la réponse de la cellule thyroïdienne aux facteurs de croissance est classique et correspond à la réponse connue à ces agents dans la plupart des types cellulaires étudiés (fibroblastes). PKC: protéine kinase C. TPA: esters de phorbol.

jouer un rôle dans la transition G0-G1 du cycle cellulaire. Si l'expression de *c-FOS* accompagne la plupart des stimulations cellulaires, mitogènes ou non, celle de *c-MYC* et de *c-JUN* est plus particulièrement liée à l'activation de la prolifération et à l'inhibition de la différenciation [27]. Dans la thyroïde (Tableau I), comme dans d'autres types cellulaires, l'EGF et le TPA augmentent d'abord l'expression de *c-Fos*, puis, celle de *c-Myc* et de *JUN* (*c-JUN*, *JUNB*, *JUND*) dans les thyrocytes. La TSH et la forskoline stimulent l'accumulation de l'ARNm de *c-Fos* selon la même cinétique. Elles activent d'abord puis inhibent l'accumulation des ARNm de *c-Myc* et de *JunB*. La stimulation initiale n'est pas surprenante, puisque ces agents sont mitogènes. Dans la thyroïde de porc, où l'AMPc n'est pas mitogène, la TSH n'induit pas l'expression de *c-Myc* et de *c-Fos*. En revanche, l'inhibition ultérieure de l'expression de *c-MYC* et *JUNB* rappelle qu'une décroissance rapide des concentrations de *c-Myc* et *Jun B* correspond, dans un grand nombre de types cellulaires, à un effet de différenciation. L'AMPc stimulant à la fois la prolifération et la différenciation des thyrocytes, on peut comprendre que l'expression de *c-MYC* et *JUNB* soit biphasique et que sa cinétique soit étroitement contrôlée,

ce qui suggère qu'elle serait activée par une protéine à renouvellement rapide. L'inhibition est, de fait, abolie par un inhibiteur de synthèse protéique, la cycloheximide. L'AMPc augmente le taux d'ARNm de *c-Myc* et de *JunB* par une induction de la transcription du gène et une stabilisation de l'ARNm. Elle diminue cette expression par un arrêt de la transcription et une déstabilisation de cet ARNm [6, 27]. La synthèse de *Max*, qui forme des hétérodimères avec *Myc* et qui module donc l'action de *Myc*, est aussi réglée de manière opposée par l'EGF et le TPA, d'une part, et par la TSH et l'AMPc, d'autre part (*m/s n° 9, vol. 6, p. 923; n° 8, vol. 7, p. 866*) [28]. Dans de nombreux types cellulaires, la prolifération s'accompagne d'une augmentation de l'expression du proto-oncogène *c-JUN*. Dans des cellules où l'AMPc est inhibiteur de prolifération, tels les fibroblastes, l'expression de *c-JUN* est inhibée. Son expression était donc considérée comme un marqueur de prolifération cellulaire. En fait, dans la cellule thyroïdienne, la TSH et l'AMPc induisent la prolifération mais inhibent l'expression de *c-JUN*. Il n'y a donc pas de parallèle généralisable entre l'expression de *c-JUN* et la prolifération. La réduction de *c-JUN* pourrait, elle aussi, être impliquée dans l'ac-

tion de différenciation de l'AMPc [29]. On peut donc constater que, jusqu'au niveau de l'expression des *early immediate genes*, les cascades mitogènes de l'EGF et du TPA, d'une part, de la TSH et de l'AMPc, d'autre part, restent largement distinctes [6].

Événements tardifs : activation et induction de cyclines et des kinases dépendantes des cyclines

La transition de la quiescence à la synthèse d'ADN dans le cycle cellulaire eucaryote nécessite la synthèse de protéines régulatrices associées directement à la machinerie de réplication de l'ADN [1, 30]. Les protagonistes centraux et généraux de la régulation du cycle cellulaire sont les cyclines et les protéine kinases qu'elles activent (CDK) [31-33]. Toutes les voies mitogènes de la thyroïde entraînent une phosphorylation activatrice et une translocation dans le noyau de la p33^{CDK2} avant le début de la phase S. De même, l'induction de la cycline A puis de p34^{CDK2} pendant la phase S et leur colocalisation nucléaire dans la transition G2/M sont, elles aussi, communes aux trois cascades mitogènes. Seules les cinétiques diffèrent avec un allongement des phases S et G2 dans la cascade de l'AMPc (M. Baptist, résultats non publiés). La PCNA (*proliferating cell nuclear antigen*) a un rôle de cofacteur de l'ADN polymérase δ , mais pourrait aussi être un régulateur important de la transition G1/S puisqu'on l'a retrouvée liée aux cyclines D1, aux CDK2, 4 et 5 [30]. Dans les cellules thyroïdiennes, la synthèse de PCNA est stimulée par la TSH, via l'AMPc, bien avant l'entrée en phase de synthèse d'ADN, alors que dans les voies mitogènes indépendantes de l'AMPc, l'augmentation de PCNA n'est détectée qu'à la phase S [34]. A partir de la fin de la phase préreplicative, les événements biochimiques de régulation du cycle cellulaire apparaissent donc communs aux stimulations mitogènes dépendante et indépendante de l'AMPc, alors que celles-ci divergent partiellement dans leurs événements précoces. Entre ces deux types d'événements, le niveau de convergence des différentes stimulations au cours de la phase G1 reste incertain.

RÉFÉRENCES

26. Woloshin PI, Walton KM, Rehlfuss RP, Goodman RH, Cone RD. 3',5'-cyclic adenosine monophosphate-regulated enhancer binding (CREB) activity is required for normal growth and differentiated phenotype in the FRTL5 thyroid follicular cell line. *Mol Endocrinol* 1992 ; 6 : 1725-33.
27. Marcu KB, Bossone SA, Patel AJ. Myc function and regulation. *Annu Rev Biochem* 1992 ; 61 : 809-60.
28. Pirson I, Reuse S, Dumont JE. Regulation of the Max gene expression by different mitogenic pathways in dog primary thyrocytes. *Exp Cell Res* 1994 ; 210 : 33-8.
29. Reuse S, Pirson I, Dumont JE. Differential regulation of protooncogenes *c-jun* and *jun D* expressions by protein tyrosine kinase, protein kinase C, and cyclic-AMP mitogenic pathways in dog primary thyrocytes : TSH and cyclic-AMP induce proliferation but downregulate *c-jun* expression. *Exp Cell Res* 1991 ; 196 : 210-5.
30. Xiong Y, Zhang M, Beach D. D type cyclins associate with multiple protein kinases and the DNA replication and repair factor PCNA. *Cell* 1992 ; 71 : 505-14.
31. Pagano M, Pepperkok R, Lukas J, Baldin V, Ansorge W, Bartek J, Draetta G. Regulation of the cell cycle by the *cdk2* protein kinase in cultured human fibroblasts. *J Cell Biol* 1993 ; 121 : 101-11.
32. Gu Y, Rosenblatt J, Morgan DO. Cell cycle regulation of CDK2 activity by phosphorylation of Thr 160 and Tyr 15. *EMBO J* 1992 ; 11 : 3995-4005.
33. Lamas E, Zindy F, Sobczack J, Paterlini P, Wang J, Chenivresse X, Henglein B, Bréchet C. Cyclin A et cancer. *médecine/sciences* 1993 ; 9 : 676-83.
34. Lamy F, Roger PP, Lecocq R, Dumont JE. Protein synthesis during induction of DNA replication in thyroid epithelial cells : evidence for late markers of distinct mitogenic pathways. *J Cell Physiol* 1989 ; 138 : 568-78.
35. Maenhaut C, Roger PP, Reuse S, Dumont JE. Activation of the cyclic AMP cascade as an oncogenic mechanism : the thyroid example. *Biochimie* 1991 ; 73 : 29-36.
36. Parma J, Duprez L, Van Sande J, Cochaux P, Gervy C, Mockel J, Dumont JE, Vassart G. Somatic mutations in the thyrotropin receptor gene cause hyperfunctioning adenomas. *Nature* 1993 ; 345 : 649-51.
37. Weinstein LS, Shenker A, Lejman PV, Merino MS, Friedman E, Spiegel AM. Activating mutations of the stimulatory G protein in the McCune-Albright syndrome. *N Engl J Med* 1991 ; 325 : 1687-95.
38. Raymond JR. Hereditary and acquired defects in signaling through the hormone receptor G protein complex. *Am J Physiol* 1994 ; 266 : 163-74.

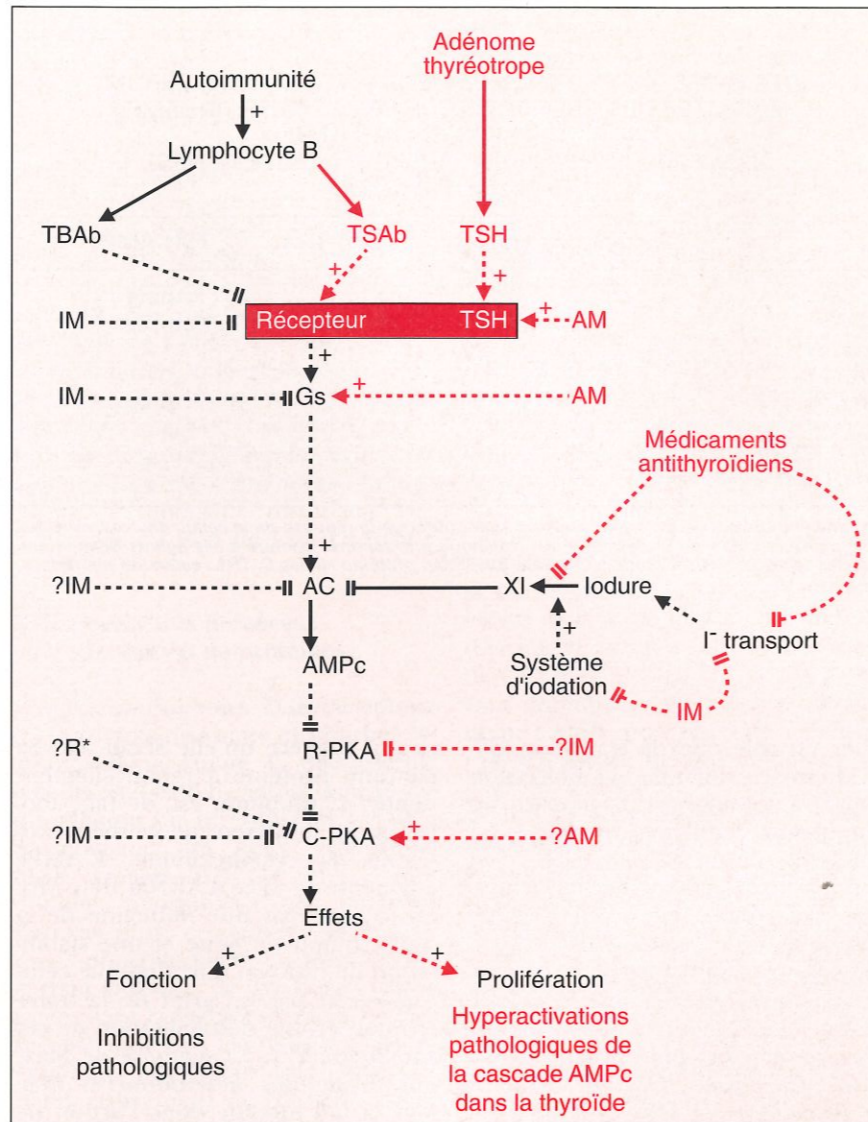


Figure 3. **Pathogénie de la cascade TSH/AMPc dans la thyroïde.** Les protéines de cette cascade peuvent être la cible d'agents pathologiques (immunoglobulines, par exemple), pharmacologiques (médicaments antithyroïdiens) ou de mutations activatrices ou inhibitrices. Les facteurs activant la cascade sont colorés en rouge, les facteurs l'inhibant en noir. AC : adénylyl cyclase. AM : mutation activatrice. C-PKA : sous-unité catalytique de la protéine kinase activée par l'AMPc. R-PKA : sous-unité régulatrice (inhibitrice) de la protéine kinase activée par l'AMPc. R* : forme dominante négative de R-PKA. TBAb : immunoglobuline bloquant le récepteur de la TSH. TSAb : immunoglobuline stimulant le récepteur de la TSH. XI : iodure synthétisé par le thyrocyte, non encore identifié.

La cascade mitogène de l'AMPc dans d'autres types cellulaires

L'AMPc est le médiateur intracellulaire de l'activité mitogène d'hormones ou de neurotransmetteurs dans un certain nombre de cellules épithéliales en culture primaire ou en lignées à caractéristiques différenciées [2, 5]. Outre les cellules thyroïdiennes, les exemples les mieux documentés concernent les cellules somatotropes hypophysaires, les cellules épithéliales mammaires, les cellules acinaires des glandes parotides, les kératinocytes, les mélanocytes, les cellules de Schwann et une lignée de cellules embryonnaires de souris (Swiss 3T3) (Tableau II). L'action mitogène de l'AMPc, second messager d'hormones trophiques, a également été démontrée *in vivo* (épiderme, glandes mammaires, thyroïde, glandes parotides, cortex surrénalien...).

Dans les différents systèmes, la stimulation de la prolifération par l'AMPc dépend de l'action co-mitogène d'autres facteurs, principalement l'IGF-I. Une synergie supplémentaire peut être apportée par l'EGF ou des activateurs de la cascade de la phospholipase C (Tableau II). Dans d'autres systèmes, l'influence mitogène de l'AMPc peut s'expliquer par des méca-

nismes différents. Dans les cellules thyroïdiennes, l'AMPc déclenche directement sa propre cascade mitogène. Il en est probablement de même dans les autres systèmes cités dans le Tableau II. Des interactions positives de l'AMPc avec les cascades de signalisation d'autres mitogènes sont aussi fréquemment observées. Ainsi, dans les cellules de Schwann, le puissant effet prolifératif de l'AMPc peut s'expliquer par l'induction de récepteurs du PDGF et par l'inhibition de la production d'un facteur autocrine négatif. De même, l'AMPc peut induire la sécrétion par un type cellulaire d'un facteur mitogène autocrine ou paracrine. Par exemple, l'effet prolifératif de l'ACTH et de l'AMPc sur le cortex surrénalien semble être indirect. Les différentes stratégies de stimulation de la croissance par l'AMPc ne sont pas exclusives et pourraient coopérer dans un même système [6].

Le plus souvent, dans les cellules où l'AMPc exerce un contrôle positif sur la prolifération, il stimule également les fonctions spécialisées, et *vice versa*. La signification physiologique en est probablement qu'un tissu dont la fonction est stimulée répétitivement développe sa capacité de répondre à cette stimulation par sa croissance. Dans les tissus adultes, la croissance est l'adaptation à long terme à des sti-

mulations fonctionnelles. Dans les cellules thyroïdiennes et somatotropes, et probablement dans de nombreux autres types cellulaires dont la fonction est contrôlée par l'AMPc, la stimulation de la prolifération dépendante de l'AMPc apparaît elle-même comme une caractéristique spécifique de différenciation. Dans les cellules somatotropes, l'AMPc induit le facteur de transcription GHF1, spécifique de ce lignage cellulaire. Ce facteur, nécessaire à la transcription du gène de l'hormone de croissance, l'est aussi très spécifiquement pour la prolifération de ces cellules hypophysaires. Considérant donc le contrôle prolifératif de l'AMPc comme une fonction spécialisée, il n'est pas surprenant de constater que différentes étapes de cette cascade peuvent, indépendamment, se surajouter aux mécanismes plus généraux de contrôle de la prolifération stimulés par les facteurs de croissance [6].

La cascade mitogène de l'AMPc en pathologie

Le nombre d'actions possibles d'un signal extracellulaire et de sa cascade de régulation sur une cellule cible est réduit. Il peut : (1) stimuler ou inhiber la fonction ; (2) induire la prolifération, l'arrêt du cycle ou la mort

Tableau II
CONTRÔLE PROLIFÉRATIF POSITIF PAR L'AMPc DANS LES CELLULES DE MAMMIFÈRES

Type cellulaire	Signal extracellulaire	Effet mitogène <i>in vitro</i> via AMPc démontré par	Méthodes génétiques	Effet de synergie proliférative avec	Stimulation de différenciation	Effet mitogène <i>in vivo</i> via AMPc démontré par
		Forskoline, Chol. tox., analogues AMPc				Approches pharmacologiques Transgènes
Swiss 3T3	VIP, PGE adénosine ATP	+	+	IGF-1, EGF vasopressine	?	
MDCK	PGE, glucagon	+		IGF-1, EGF	+	
Kératinocytes	β-adrénergique VIP	+		EGF	+	+
Thyrocytes	TSH	+	+	IGF-1, EGF	+	+
Somatotrophes	GRH	+		?	+	+
Épithélium mammaire	β-adrénergique PGE	+		IGF-1, EGF	+	+
Mélanocytes	MSH, ?	+		FGF, IGF-1	+	
Cellules acinaires des parotides	β-adrénergique			?	+	+

VIP : vasoactive intestinal peptide ; PGE : prostaglandine E ; GRH : growth hormone releasing hormone ; MSH : melanocyte stimulating hormone ; IGF : insulin-related growth factor ; Chol. tox. : cholera toxin.

Tableau III			
MUTATIONS CONNUES AFFECTANT LA CASCADE DE L'AMPc DANS LA THYROÏDE			
Gène	Mutation		Maladie
Récepteur TSH	activatrice	congénitale	hyperthyroïdie congénitale avec goitre
		somatique	adénome hyperfonctionnel (nodule chaud)
Gs	activatrice	congénitale	Syndrome de McCune Albright
		(mosaïque)	
		somatique	adénome hyperfonctionnel (nodule chaud)
Transport de I ⁻	inactivatrice	congénitale	goitre congénital hypothyroïdien
		somatique	adénome non fonctionnel (nodule froid)
Système d'organification (système producteur de H ₂ O ₂ , thyroperoxydase)	inactivatrice	congénitale	goitre congénital hypothyroïdien
		somatique	adénome non fonctionnel (nodule froid)

cellulaire; (3) modifier le programme de la cellule, c'est-à-dire sa différenciation. Les deux premiers types d'effets sont quantitatifs, le troisième qualitatif. Stimulation de fonction et prolifération, et inhibition de fonction et atrophie vont, souvent, et pour des raisons évidentes, de pair. Les conséquences d'une activation ou d'une inhibition d'une cascade, que le mécanisme soit génétique ou biochimique, dépendent bien entendu de la nature des effets de cette cascade sur ce type de cellule.

Conséquences de l'activation

Dans des cellules comme la cellule thyroïdienne, dans lesquelles l'AMPc règle positivement la fonction et la prolifération cellulaire, toute activation pathologique conduira à l'hyperfonction et à l'hyperplasie (figure 3) [35]. Le stimulus peut être un agent physiologique comme la TSH, sécrétée anormalement par un adénome hypophysaire (adénome thyroïdienne), ou des immunoglobulines pathologiques comme les TSAb (thyroid stimulating antibodies) sécrétées par des lymphocytes B dans une réaction auto-immunitaire (goitre de Basedow). Ces anticorps se lient au récepteur de la TSH et l'activent, comme la TSH. Dans ces deux cas, le stimulus étant général, toute la glande est impliquée et le malade présente une hyperthyroïdie et un goitre. Dans le cas de mutation activatrice d'un des éléments positifs de la cascade (récepteur, Gs, adénylyl cyclase, sous-unités C de la protéine kinase

dépendante de l'AMPc...) ou d'une mutation inhibitrice d'un des éléments négatifs de la cascade (transport de l'iode, système d'organification de l'iode, c'est-à-dire les systèmes conduisant à la synthèse de XI; sous-unité régulatrice de la protéine kinase dépendante de l'AMPc), l'effet sera général si la mutation est héréditaire ou congénitale, avec goitre et hyperfonctionnement. Il sera local si la mutation est somatique, comme dans le cas de l'adénome hyperfonctionnel (Tableau III) (m/s n° 12, vol. 9, p. 1421) [36]. Évidemment, si la mutation inactive aussi le métabolisme spécialisé de l'iode (par exemple, le transport de l'iode, son oxydation par la thyroperoxydase, etc.), le stimulus fonctionnel ne permettra pas la synthèse d'hormone thyroïdienne, il n'y aura donc pas d'hyperthyroïdie. Dans le cas d'une mutation somatique de ce type, la lésion résultante est un adénome hypofonctionnel (nodule froid). Si la mutation est congénitale, la maladie est le goitre congénital hypothyroïdien (m/s n° 10, vol. 8, p. 1113; n° 4, vol. 9, p. 471). Dans ce cas, l'absence d'hormone thyroïdienne lève le contrôle négatif sur les cellules thyrotropes de l'hypophyse, entraînant une hypersécrétion de TSH et une hyperactivation secondaire qui s'ajoute à celle causée par la levée du contrôle négatif exercé par l'iode sur la cascade de l'AMPc. Le traitement pharmacologique par les médicaments antithyroïdiens, ou les goitrogènes de l'alimentation qui inhibent le transport ou l'organification de l'iode, aboutissent au même résultat que les lésions génétiques affectant ces métabolismes [6].

Le même raisonnement peut être appliqué à tous les types cellulaires dans lesquels la cascade de l'AMPc stimule prolifération et fonction; c'est ainsi que près de 50 % des acromégalies sont dues à des adénomes à cellules somatotropes dans lesquels une mutation activatrice de Gs (protéine G stimulant l'adénylyl cyclase) peut être démontrée. Les caractéristiques de la lésion dépendent de l'importance relative des effets fonctionnels et prolifératifs de la cascade. C'est ainsi que, dans la puberté précoce congénitale, la mutation activatrice du récepteur de la LH a surtout des conséquences fonctionnelles. Un bon aperçu des conséquences d'une hyperactivation générale de la cascade de l'AMPc est donné par les caractéristiques du syndrome de McCune Albright (m/s n° 2, vol. 8, p. 184) dans lequel une mutation activatrice de Gs affecte une certaine proportion des cellules de chaque tissu (adénomes de la thyroïde, de l'hypophyse, de la surrénale, puberté précoce, hyperpigmentation, hypertrophie cardiaque, hépatomégalie...). Dans ce dernier syndrome, il est évident que les cellules dans lesquelles la cascade de l'AMPc a un effet inhibiteur sur la prolifération (fibroblastes, par exemple) vont être désavantagées et auront tendance à disparaître. Cela explique probablement pourquoi le syndrome de McCune Albright n'existe que sous la forme de mosaïque affectant seule-

ment une proportion des cellules; la mutation héréditaire, c'est-à-dire généralisée à toutes les cellules, serait probablement létale [37]. Des mutations somatiques activatrices de protéines de la cascade de l'AMPc, en aval de Gs, pourraient rendre compte d'autres adénomes autonomes hyperfonctionnels: adénylyl cyclase, protéine kinase dépendante de l'AMPc, etc. Elles seront certainement recherchées et trouvées dans les années à venir [35]. En revanche, on ne peut s'attendre à trouver de telles mutations héréditaires car elles seraient létales, mais, comme dans le syndrome de McCune Albright, le mosaïcisme pourrait permettre leur expression.

Conséquences de l'inhibition

Dans les cellules où la cascade de l'AMPc stimule la fonction et la prolifération, toute inhibition pathologique de la cascade conduit au déficit de la fonction et à la régression de l'organe. Cela implique que toute mutation somatique inhibitrice, à quelque niveau de la cascade que ce soit, ne donnera lieu à aucune manifestation pathologique puisque la cellule affectée sera désavantagée et aura tendance à disparaître. Si l'inhibition porte sur toutes les cellules (de la thyroïde par exemple), elle entraînera hypothyroïdie et atrophie de la glande. Pour la thyroïde, l'agent inhibiteur pathologique le mieux connu est l'anticorps bloquant qui, produit dans la maladie auto-immune de la thyroïde, se lie au récepteur de la TSH et inhibe l'action de la TSH. Ce mécanisme est responsable d'une partie des hypothyroïdies dans les thyroïdites. Au point de vue génétique, un certain nombre de cas d'hypothyroïdies congénitales avec absence de réponse de la thyroïde à la TSH ont été décrits et une mutation inhibitrice du récepteur a été définie (voir l'article de C. Ledent *et al.*, p. 215 de ce numéro). Le nombre d'affections dues à une mutation congénitale inhibitrice de récepteurs couplés positivement à la cascade de l'AMPc ne cesse d'augmenter: nanisme hypophysaire par défaut du récepteur de la GRH (growth releasing hormone) (m/s n° 5 vol. 7, p. 519-20), diabète insipide par défaut du récepteur V2 de la vasopressine (m/s n° 10, vol. 9, p. 1138), etc. [38].

En aval du récepteur, l'inactivation

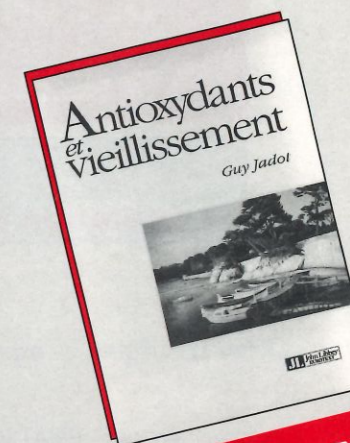
générale d'un allèle de Gs suffit à entraîner la pseudohypoparathyroïdie. Dans cette affection, l'ensemble des types de cellules dans lesquelles la cascade de l'AMPc stimule fonction et parfois prolifération est affecté. Cela conduit à un syndrome d'hypoparathyroïdie (défaut de réponse à la PTH), hypothyroïdie (défaut de réponse à la TSH), etc. Dans ce cadre, l'inactivation d'un des allèles du gène d'une protéine activatrice de la cascade de l'AMPc (adénylyl cyclase, unité catalytique de la PKA) pourrait conduire à une maladie similaire ■

Summary

The mitogenic cascade of cAMP in the thyroid and other tissues

The study of cell proliferation control in the thyroid gland led us to define the mitogenic role of the cAMP cascade. TSH (thyroid stimulating hormone), via its binding to its receptor and activation of adenylyl cyclase increases the intracellular level of cAMP, leading to the stimulation of the function, the proliferation and the expression of differentiation in thyrocytes. The cAMP cascade is characterized by an early and transient rise of protooncogene c-MYC and JUNB expression. The tight kinetic regulation of these expressions could account for the apparently paradoxical coupling of mitogenesis and differentiation. The cyclic AMP mitogenic cascade is, down to the level of cyclins and their kinases, distinct from the growth factor activated cascades or the phorbol ester-protein kinase C cascade. In the cell types in which the cAMP cascade stimulates function and proliferation, its constitutive activation would induce growth and hyperfunction, i.e. the generation of hyperfunctional autonomous adenoma or congenital hyperfunctions; its inactivation would lead to loss of function and atrophy of the organ involved. Our present knowledge of the cAMP cascade and of its role thus allows us to predict the alterations of this pathway that could cause hyperfunctional hyperplastic lesions or their converse counterpart.

John Libbey
EUROTEXT



NOUVEAUTÉ

GUY JADOT

1994
Broché, 312 pages

120 FF

ANTIOXYDANTS ET VIEILLESSE

- Parmi toutes les théories avancées sur le vieillissement de l'Homme, celle qui fait intervenir la toxicité des radicaux libres de l'oxygène revêt de nos jours une importance primordiale.
- En 1994, le lien causal direct entre radicaux libres de l'oxygène et vieillissement a été établi.

BON DE COMMANDE

NOM Prénom

Adresse

.....

Désire recevoir **ANTIOXYDANTS ET VIEILLESSE**
au prix de 120 FF + 30 FF de frais de port, soit 150 FF.
Ci-joint mon règlement à l'ordre de **John Libbey Eurotext** 127, avenue de la République.
92120 MONTROUGE, FRANCE
Tél. : (1) 46.73.06.60.