



Activités cytotoxiques et pro-oxydantes d'acides gras à très longue chaîne sur des oligodendrocytes murins sauvages et déficients en Abcd1 et Acox1 : application à la physiopathologie de l'X-ALD et de la P-NALD

Mauhamad Baarine

► To cite this version:

Mauhamad Baarine. Activités cytotoxiques et pro-oxydantes d'acides gras à très longue chaîne sur des oligodendrocytes murins sauvages et déficients en Abcd1 et Acox1 : application à la physiopathologie de l'X-ALD et de la P-NALD. Sciences agricoles. Université de Bourgogne, 2010. Français. NNT : 2010DIJOS047 . tel-00597383

HAL Id: tel-00597383

<https://theses.hal.science/tel-00597383>

Submitted on 31 May 2011

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

UNIVERSITE DE BOURGOGNE

ECOLE DOCTORALE ENVIRONNEMENT – SANTE/STIC

THÈSE

Pour obtenir le grade de

Docteur de l'Université de Bourgogne

Discipline : Biochimie, Biologie Cellulaire et Moléculaire

Présentation et soutenance publiques par :

Mauhamad Baarine

15 Décembre 2010

Activités cytotoxiques et pro-oxydantes d'acides gras à très longue chaîne sur des oligodendrocytes murins sauvages et déficients en Abcd1 et Acox1 : application à la physiopathologie de l'X-ALD et de la P-NALD.

Directeur de thèse : Gérard Lizard

Membres du Jury :

Mme Nathalie Cartier, DR Inserm U745 - Université Paris Descartes (Paris 5)

Rapporteur

M. Saïd Ghandour, DR CNRS, LINC-IFR 37 - Université de Strasbourg

Rapporteur

M. Charbel Massaad, Pr CNRS UMR 8194 - Université Paris Descartes (Paris 5)

Examineur

M. Mustapha Cherkaoui-Malki, Pr Inserm U866 - Université de Bourgogne

Examineur

M. Gérard Lizard, CR Inserm U866 - Université de Bourgogne

Directeur de thèse

Qu'il me soit permis de remercier :

Les Docteurs Nathalie Cartier et Saïd Ghandour qui ont accepté de bien vouloir lire et évaluer ce travail. Qu'ils soient assurés de ma profonde reconnaissance,

Messieurs les Professeurs Charbel Massaad et Mustapha Cherkaoui-Malki pour avoir accepté d'examiner ce travail,

Monsieur le Professeur Patrick Aubourg pour avoir fourni les échantillons biologiques (plasmas de patients atteints de l'X-ALD),

Mesdames Anne Athias et Christine Arnould pour leur assistance technique (analyse lipidique et microscopie confocale),

Messieurs André Bouchot et Franck Ménétrier pour leur assistance technique (vidéo-Microscopie et Microscopie électronique à transmission),

Monsieur le Professeur Norbert Latruffe pour m'avoir accueilli dans son laboratoire,

Monsieur le Docteur Gérard Lizard de m'avoir accueilli dans son équipe et d'avoir supervisé ces travaux.

Mes remerciements vont également à tous les membres de l'équipe 'Biochimie Métabolique et Nutritionnelle' qui m'ont accompagné au quotidien dans mon travail de Thèse :

Stéphane Savary, Doriane Trompier, Valérie Nicolas, Stéphane Mandard, Pierre Andreoletti (Merci pour la mesure de l'activité Acox1, Catalase...).

Flore, Fred (arrête de toucher partout !!), Julie, Manu : (collègues du bureau), Hammam, Kévin, Ségolène, Didier, Emeric (toi alors !!!! t'as besoin d'une bonne correction), Virginie ou chromosome 28 (salsa ! salsa !), Jacques (le polonnais), Allan, Zilal, Thomas (le nouveau).

Et enfin à Nathalie Bancod (Mme Bancod) : Notre secrétaire si aimable, si rigolote (je sais que j'étais parfois lourd ☹ mais c'est toujours dans le bon sens☺)

Qu'ils trouvent ici mes sincères remerciements.

J'aimerais également remercier tous les amis de Dijon :

Maheer ou hamidaaaaa (Dr 3ala nafask), café des ducs, café droits-lettre, Hâagen-dazs.....ouffffff

Samer (pipo), celui qui n'arrête jamais alors jamais de parler

Houssein nasrallah (oh lalaNos folles soirées, nos matchs de foot où on s'engueule tout le temps ... que de bons souvenirs)

Jack hindieh ou jaco ou encore drink machin (l'irlandais)

Chadi dit il lembi

Toni abi habi : le canadien

Ahmad youssif (le grec) dit houbi wa hanani

Bilal abou cha3ar : il belgiqui

Jalal il 2awi wal batal

Omar kobani : le plus mauvais joueur de foot que je n'ai jamais vu

Bechara al bouna ou bach (mon voisin et mon super amigo)

Alawiyi : ya kabir, mon collègue de l'ESC de Dijon, et collègue de la pose café entre midi et deux

Cosette: Sadikati al 3akariyi WA oustazat al lough al3arabiya ☺

Roy : la2 PLeaz wati sawtak

Ouaiss : ami de Lyon

Stéphane : je pourrai dire qu'après 6 ans à Dijon j'ai un vrai ami français ☺

Guillaume et Ludiwine : mes amis les méditerranéens, les soirées, la piscine,... que de bons souvenirs

Grand merci à tous les autres que je n'ai pas pu citer...

Je n'oublie pas non plus mes parents, mes frères et sœurs et toute ma famille pour leur soutien moral et financier.

A ma mère
A mon père
A ma famille

Résumé

L’X-ALD et la P-NALD sont deux maladies peroxysomales, métaboliques et neurodégénératives rares. L’X-ALD et la P-NALD résultent de déficiences respectives en *ABCD1* et *ACOX1*. Ces deux maladies dans leurs formes sévères sont associées à des phénomènes de démyélinisation inflammatoire du SNC. Au niveau des lésions, des signes d’oxydation et une mort cellulaire sont observés. L’accumulation des AGTLC plasmatiques et tissulaires est le critère biochimique commun à ces deux maladies.

Dans un premier temps, nous avons caractérisé une lignée d’oligodendrocytes murins 158N afin de l’utiliser comme modèle. Cette lignée qui présente des caractéristiques d’oligodendrocytes matures (expression des protéines de myéline MOG, MBP, PLP) possède aussi des peroxysomes fonctionnels possédant les protéines *Abcd1* et *Acox1*. Ensuite, nous avons étudié les effets cytotoxiques et pro-oxydants des AGTLC (C24:0 et C26:0), ainsi que l’incidence de l’extinction d’*Abcd1* et d’*Acox1* par siRNA sur l’équilibre RedOx et la mort cellulaire. Les effets des AGTLC sur les caractéristiques biophysiques de la membrane cytoplasmique ont aussi été abordés. Par ailleurs, des marqueurs du stress oxydant ont été recherchés sur des plasmas des patients atteints de différentes formes d’X-ALD.

In vitro, nous avons montré que l’accumulation d’AGTLC dans les cellules 158N induit une surproduction d’espèces radicalaires de l’oxygène et de l’azote et une perturbation des défenses anti-oxydantes (catalase, SOD, GSH). Ceci s’accompagne d’une peroxydation lipidique, d’une carbonylation des protéines et d’une dégradation de l’ADN. L’extinction d’*Abcd1* et d’*Acox1* par des siRNA augmente la production d’espèces radicalaires et potentialise le stress oxydant induit par les AGTLC. Sur les plasmas de patients atteints de différentes formes d’X-ALD, comparativement à des sujets sains, nous avons montré l’accumulation des produits de peroxydation lipidiques (7-hydroxycholestérols, HODEs). Le taux de ces deux produits est corrélé avec la sévérité de la maladie: CCALD>AMN>Addison>ACALD.

Les AGTLC induisent aussi la mort des cellules 158N par un processus non apoptotique. Cette mort cellulaire est caractérisée par: une perturbation rapide du calcium intracellulaire, une diminution du pH, une chute du potentiel transmembranaire mitochondrial associée à des modifications structurales des mitochondries, une déstabilisation des lysosomes et une formation de figures d’autophagie. Les AGTLC perturbent aussi la fluidité membranaire. Par ailleurs, les AGTLC n’affectent pas l’expression des protéines majeures de la myéline PLP et MBP.

Ces travaux ont mis en évidence un lien direct entre l’accumulation des AGTLC, le stress oxydant et l’induction de mort cellulaire faisant intervenir les lysosomes. La déficience en *Abcd1* et *Acox1* favorise le stress oxydant. En accord avec les résultats obtenus *in vitro*, la mise en évidence de marqueurs de peroxydation lipidiques dans le plasma de malades atteints d’X-ALD conforte l’hypothèse d’une intervention du stress oxydant dans cette pathologie.

Mots-clés : Peroxysome, X-ALD, P-NALD, oligodendrocytes 158N, AGTLC, mort cellulaire, stress oxydant, protéines de myéline, siRNA, lysosome.

Abstract

X-ALD and P-NALD are two rare, peroxisomal metabolic and neurodegenerative diseases. ABCD1 and ACOX1 are known to be responsible for X-ALD and P-NALD, respectively. The actively demyelinating lesions in CNS, exhibited signs of oxidative stress and cell death. The accumulation of VLCFA in plasma and tissue is the biochemical common hallmark to both diseases.

First, we characterized a murine oligodendrocytes cell line 158N to use it as a model. This 158N cell line which has characteristics of mature oligodendrocytes (expression of myelin proteins MOG, MBP, PLP), has also functional peroxisomes with Abcd1 and Acox1 proteins. Then, we studied the cytotoxic and pro-oxidative effects of VLCFA (C24: 0 and C26: 0), and the effects of in vitro silencing of the *Abcd1* and *Acox1* genes by siRNA on the redox balance and cell death. Effects of VLCFA on the biophysical characteristics of cytoplasmic membrane were also evaluated. Moreover, markers of oxidative stress were researched on plasma of patients with different forms of X-ALD.

In vitro, we showed that the accumulation of VLCFA on 158N cells induced overproduction of reactive oxygen and nitrogen species and a disruption of antioxidant defense systems (catalase, SOD, GSH). This was accompanied by lipid peroxidation, protein carbonylation and degradation of DNA. The extinction of *Abcd1* and *Acox1* by siRNA increased the production of radical species and potentialized the oxidative stress induced by VLCFA. On plasma of patients with different forms X-ALD, compared to healthy subjects, we showed an accumulation of lipid peroxidation products (7-hydroxycholesterol, HODEs). The rate of these two products is correlated with the severity of the disease: CCALD> AMN> Addison> ACALD.

The VLCFA also induce cell death on 158N by a non-apoptotic process. This cell death is characterized by: a rapid increased of intracellular Ca^{2+} level, pH decrease, a loss of mitochondrial transmembrane potential associated with structural changes of mitochondria, a destabilization of lysosomes, and formation of autophagic vacuoles. The VLCFA also disrupt the membrane fluidity. Furthermore, VLCFA do not affect the expression of myelin major proteins PLP and MBP.

This work highlighted a direct link between VLCFA accumulation, oxidative stress and induction of cell death involving lysosomes. *Abcd1* and *Acox1* deficiency promotes oxidative stress. In agreement with results obtained in vitro, the detection of markers of lipid peroxidation in the plasma of X-ALD patients favors the hypothesis of an involvement of oxidative stress in this pathology.

Keywords : Peroxisome, X-ALD, P-NALD, oligodendrocytes 158N, AGTLC, cell death, oxidative stress, myelin proteins, siRNA, lysosome.

SOMMAIRE

LISTE DES FIGURES	3
LISTE DES TABLEAUX	4
ABREVIATIONS	5
ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE	7
I Avant-propos	8
II Le Peroxysome	10
1 Généralités	10
2 Structure des peroxysomes	10
3 Biogenèse des peroxysomes	10
3.1 Adressage des protéines vers le peroxysome	14
3.2 Prolifération peroxysomale	16
4 Rôles des peroxysomes	16
4.1 Fonctions peroxysomales en relation avec le métabolisme des lipides	17
4.1.1 Béta-oxydation peroxysomale	17
4.1.2 Alpha-oxydation peroxysomale	23
4.1.3 Synthèse d'éthers de lipides : les plasmalogènes	25
4.2 Autres fonctions métaboliques	27
4.2.1 Synthèse d'acide docosahexaénoïque (DHA)	27
4.2.2 Synthèse des acides biliaires	29
4.2.3 Métabolisme des leucotriènes	29
4.3 Fonctions de détoxification (catalase – oxydase)	30
4.4 Peroxysome et système nerveux central	32
4.4.1 Rôle du peroxysome dans le système nerveux central et incidence sur la myélinisation	32
4.4.2 Peroxysome et médiateurs lipidiques d'inflammation dans le système nerveux central	35
5 Interaction du peroxysome avec d'autres organelles	37
5.1 Interaction peroxysome - mitochondrie	37
5.2 Interaction peroxysome – réticulum endoplasmique	39
III Maladies peroxysomales	40
1 L'adrénoleucodystrophie liée au chromosome X (X-ALD)	40
1.1 Origine génétique de l'X-ALD et transporteurs ABCDs	40
1.2 Fonctions biochimiques du transporteur ALDP	41
1.3 Formes cliniques de l'X-ALD	42
1.4 Caractérisation des lésions d'X-ALD	43
1.5 Diagnostic de l'X-ALD	44
1.6 Traitement de l'X-ALD	45
2 La Pseudo-adrénoleucodystrophie néonatale P-NALD	45
IV Mort cellulaire	47
1 Apoptose	50
2 Nécrose/Oncose	52
3 Autophagie	53
4 Lysosome et mort cellulaire	55
5 X-ALD et mort cellulaire	58
V Stress oxydant	60
1 Espèces réactives de l'oxygène (ERO) et de l'azote (ERN)	60
2 Origines cellulaires des ERO et ERN	61
3 Défenses anti-oxydantes	62
3.1 Systèmes enzymatiques	63
3.2 Systèmes non enzymatiques	65
4 Effets du stress oxydant sur les molécules biologiques	66

4.1	Effets des ERO/ERN sur les lipides	67
4.1.1	Oxystérols et dégénérescence neuronale	69
4.1.2	Oxystérols et homéostasie du cholestérol	71
4.2	Effets des ERO/ERN sur les protéines	73
4.3	Effets des ERO/ERN sur les glucides	74
4.4	Effets des ERO/ERN sur l'ADN	74
5	Maladies associées à un stress oxydant	75
5.1	Maladies neurodégénératives	75
5.2	Diabète	75
5.3	Cancer	76
6	X-ALD, AGTLC et Oxydation	76
7	X-ALD, AGTLC et Inflammation	77
VI	Modèles d'études	78
1	In vitro	78
1.1	Vésicules lipidiques	78
1.2	Lignées cellulaires	78
1.3	Cultures primaires et organotypiques	79
1.4	Utilisation des siRNA	79
2	In vivo	80
2.1	Souris déficientes conventionnelles	80
2.2	Souris déficientes conditionnelles (système Cre-Lox)	81
	OBJECTIFS	82
	RESULTATS	85
I	Article 1 : Peroxisomal and Mitochondrial Status of Two Murine Oligodendrocytic Cell Lines (158N, 158JP): Potential Models for the Study of Peroxisomal Disorders Associated with Dysmyelination Processes	86
1	Introduction	86
II	Article 2 : Pro-oxidative activities of Abcd1 or Acox1 deficiency, and of VLCFA on murine oligodendrocytes support evidences of lipid peroxidation in X-ALD patients	104
1	Introduction	104
III	Article 3 : Characterization of cell death and myelin protein expression (PLP, MBP) in wild type and Abcd1 inactivated 158N Murine Oligodendrocytes treated with C24:0 or C26:0	153
1	Introduction	153
IV	Article 4 : Impact of 7-ketocholesterol and very long chain fatty acids on oligodendrocyte lipid membrane organization: evaluation via LAURDAN and FAMIS spectral image analysis.	186
1	Introduction	186
	DISCUSSION	219
I	Modèle cellulaire utilisé	220
II	Traitement avec les AGTLC	221
III	AGTLC et stress oxydant	222
IV	AGTLC et mort cellulaire	226
V	AGTLC et modulation des caractéristiques membranaires	229
	CONCLUSION ET PERSPECTIVES	230
	ANNEXES	234
	REFERENCES	238

LISTE DES FIGURES

FIGURE 1 : VOIE DE MATURATION DU PEROXYOSOME DEPENDANTE DU RE (KUNEAU, 2005)	12
FIGURE 2 : VOIE DE MATURATION DU PEROXYOSOME PAR DIVISION ET FISSION (LAZAROW, 2003)	13
FIGURE 3 : ADRESSAGE DES PROTEINES PEROXYOSOMALES MATRICIELLES OU CYTOSOLIQUE DU CYTOPLASME VERS LE PEROXYOSOME (MICHEL ET AL., 2005)	15
FIGURE 4 : METABOLISME DES DIFFERENTS SUBSTRATS DE B-OXYDATION PEROXYOSOMALE (WANDERS ET AL., 2010)	19
FIGURE 5 : ENZYMOLOGIE DE LA B-OXYDATION PEROXYOSOMALE : CHANGEMENT D'ISOFORMES ENZYMATIQUES SELON LE TYPE DE SUBSTRATS (WANDERS & WATERHAM, 2006A).....	21
FIGURE 6 : B-OXYDATION PEROXYOSOMALE : ACTIVATION DES AG DANS LE CYTOPLASME (A), B-OXYDATION DANS LE PEROXYOSOME (B), L'ACETYL-CoA EST TRANSFORME EN ACETYL-CARNITINE QUI EST TRANSPORTE VERS LA MITOCHONDRIE POUR ETRE B-OXYDE (WANDERS & WATERHAM, 2006A).	22
FIGURE 7 : VOIE D'A-OXYDATION DE L'ACIDE PHYTANIQUE ET DIFFERENTES ENZYMES IMPLIQUEES (STEINBERG ET AL., 1999)	24
FIGURE 8 : STRUCTURE D'UN PLASMALOGENE	26
FIGURE 9 : SYNTHÈSE DE DHA : DHA EST SYNTHÉTISÉ À PARTIR DE L'ACIDE A-LINOLEIQUE PAR DEUX ÉTAPES DANS LE RE PUIS DANS LE PEROXYOSOME (FERDINANDUSSE ET AL., 2001).....	28
FIGURE 10 : ENZYMES PEROXYOSOMALES IMPLIQUEES DANS L'HOMÉOSTASIE DES ERO (SCHRADER & FAHIMI, 2006).	31
FIGURE 11 : MODÈLE HYPOTHÉTIQUE DU RÔLE DES PEROXYOSOMES OLIGODENDROCYTAIRES DANS LA MYÉLINISATION, INCLUANT LA B-OXYDATION ET LA DÉGRADATION DES LIPIDES BIOACTIFS (KASSMAN & NAVE, 2008).	36
FIGURE 12 : ÉCHANGE ENTRE PEROXYOSOME ET MITOCHONDRIE (SCHUMANN & SUBRAMANI, 2008).....	38
FIGURE 13 : HYPOTHÈSE SUR LA PHYSIOPATHOLOGIE DE L'X-ALD IMPLIQUANT LE STRESS OXYDANT COMME FACTEUR DÉCLENCHANT (SING & PUJOL, 2010).	44
FIGURE 14 : DIFFÉRENTES VOIES CONDUISANT À LA MORT CELLULAIRE (FINK & COOKSON, 2005).....	49
FIGURE 15 : CHRONOLOGIE ET MORPHOLOGIE DE L'APOPTOSE	50
FIGURE 16 : MOLECULES RELARGUÉES PAR LA MITOCHONDRIE AU COURS DE LA MORT CELLULAIRE PAR APOPTOSE.....	52
FIGURE 17 : CHRONOLOGIE ET MORPHOLOGIE DE LA NECROSE.....	53
FIGURE 18 : DIFFÉRENTES FORMES ET MÉCANISMES D'AUTOPHAGIE (VICENCIO ET AL., 2008).	54
FIGURE 19 : RÉGULATION DE LA PERMEABILITÉ LYSOSOMALE ET IMPACT SUR L'ACTIVATION DE DIFFÉRENTES FORMES DE MORT CELLULAIRE (TANG ET AL., 2008).....	57
FIGURE 20 : FORMATION DES DIFFÉRENTES ERO ET ERN	61
FIGURE 21 : ORIGINE CELLULAIRE DU STRESS OXYDANT	62
FIGURE 22 : NIVEAUX D'ACTION ET LOCALISATION DES DIFFÉRENTS EFFECTEURS ANTI-OXYDANTS.....	63
FIGURE 23 : ENZYMES ANTI-OXYDANTES	64
FIGURE 24 : GLUTATHION PEROXYDASE ET REDUCTASE.....	65
FIGURE 25 : SYNTHÈSE DE GLUTATHION (FORMAN ET AL., 2009)	66
FIGURE 26 : VOIES ET PRODUITS DE PEROXYDATION LIPIDIQUE (VALKO ET AL., 2006).	68
FIGURE 27 : VOIES ET PRODUITS D'OXYDATION DU CHOLESTÉROL ENZYMATIQUES ET NON ENZYMATIQUES (BROWN & JESSUP, 2009)	69
FIGURE 28 : DIFFÉRENTES VOIES D'OXYDATION DE LA GUANINE CONDUISANT À DIFFÉRENTS PRODUITS.....	75
FIGURE 29 : DIFFÉRENCIATION ET MATURATION DES OLIGODENDROCYTES (OL).	87
FIGURE 30 : MODÈLE PROPOSÉ POUR L'ACTIVATION DE LA MORT CELLULAIRE OLIGODENDROCYTAIRE PAR LES AGTLC (C24:0 ET C26:0).....	228

LISTE DES TABLEAUX

TABLEAU 1 : LES FONCTIONS METABOLIQUES DES PEROXYSOMES (SCHRADER & FAHIMI, 2008).	17
TABLEAU 2 : PRINCIPALES ENZYMES PEROXYSOMALES IMPLIQUEES DANS LA DEGRADATION OU LA SYNTHÈSE DES ERO (ANGERMULLER ET AL., 2009; SCHRADER & FAHIMI, 2004; SCHRADER & FAHIMI, 2006).....	30
TABLEAU 3 : MALADIES PEROXYSOMALES AVEC DES PATHOLOGIES AU NIVEAU DU SNC (BAES & AUBOURG, 2009).	32
TABLEAU 4 : DIFFÉRENTES FORMES CLINIQUES D'X-ALD.	42

ABREVIATIONS

$\Delta\Psi_m$:	Potentiel transmembranaire mitochondrial
$^{\circ}\text{OH}$:	Radicaux hydroxyls
4-HNE :	4-hydroxy-2-nonenal
5-LOX :	5-lipoxygenase
7KC :	7-Cétocholesterol
7-OH :	7-hydroxycholestérol
7β-OH :	7 β -hydroxycholesterol
8-OHG :	8-oxoguanine
ABC :	ATP-binding cassette
ACALD :	Adolescent or Adult Cerebral ALD
Acox-1 :	AcylCoA oxydase-1
ADHAP-S :	Alkyl-dihydroxyacetone phosphate synthase
AGI :	Acides gras insaturés
AGPI :	Acides gras polyinsaturés
AGTLC :	Acides Gras à Très Longue Chaîne
ALD :	Adrenoleukodystrophy
ALDP :	Adrenoleukodystrophy Protein
ALDRP :	Adrenoleukodystrophy Related Protein
AMN :	Adrénomyélongueuropathie
APP :	Amyloïd protein precursor
CAT :	Carnitine Acétyl Transférase
CCALD :	Childhood Cerebral ALD
CNPase :	2', 3'-cyclic nucleotide 3-phosphohydrolase
COT :	Carnitine Octanoyl Transférase
CPG :	Chromatographie en Phase Gazeuse
CuZnSOD :	Superoxyde dismutase de cuivre-zinc
DHA :	Acide docosahéxaénoïque
DHAP :	Dihydroxyacétone phosphate
DHAP-AT :	Dihydroxyacétone phosphate acyltransférase
DRP1 :	Dynamin-Related Protein 1
ELOVL :	Elongation of Very-Long Chain Fatty Acids
ERN :	Espèces Réactives de l'Azote
ERO :	Espèces Réactives de l'Oxygène
Fis1 :	Mitochondrial fission protein
GFAP :	Glial Fibrillary Acidic Protein
GPx :	Glutathion-Peroxydase
GSH :	Glutathion réduit
H₂O₂ :	Peroxyde d'hydrogène
HDCA :	Acide hydrodésoxycholique
HODE :	Hydroxyoctadécadiénoic acid
HPLC :	Chromatographie Liquide à Haute Performance
LTs :	Leucotriènes
LysoPC :	Lysophosphatidilcholine
MAPL :	Mitochondria-Anchored Protein Ligase
MBP :	Myelin Basic Protein
MDA :	Malonedialdéhyde
MDVs :	Mitochondria-derived vesicles
M-LP :	Mpv17-like protein

MnSOD :	Superoxyde dismutase de manganèse
MS :	Spectrométrie de masse
NADPH:	Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate oxydase
NO :	Monoxyde d'azote
NOS :	NO synthase
O₂⁻ :	Anions superoxydes
OL :	Oligodendrocyte
ONOO⁻ :	Peroxynitrites
OPCs :	Précurseurs d'oligodendrocytes
PAF :	Platelet-Activating Factor
PBE :	Peroxisomal Bifunctional Enzyme
Pex :	Peroxine
PLP :	Proteolipid protein
P-NALD :	Pseudo-adrénoleucodystrophie néonatale
PPAR:	Peroxisome proliferator-activated receptor
pTh1 :	Thiolase (41 kDa)
PTS :	Peroxisomal Targeting Signal
RCDP2 et RCDP3 :	Chondrodysplasie rhizomelique ponctuée de type 2 et 3
RE :	Réticulum Endoplasmique
R-OOH :	Hydroperoxydes
SCPx :	Sterol carrier protein X
siRNA :	<i>small interfering</i> RNA
SNC :	Système Nerveux Central
SNP:	Système Nerveux Périphérique
THCA :	Acide trihydroxycholestanoïque
TNF:	Tumor necrosis factor
VIH :	Virus de l'immunodéficience humaine
VLCS :	Very Long Chain Acyl-CoA Synthetases
X-ALD :	Adrénoleucodystrophie liée au chromosome X

*ETUDE
BIBLIOGRAPHIQUE*

I Avant-propos

Depuis la découverte du peroxysome en 1954 par Rhodin et la révélation de sa fonction métabolique dans la dégradation du peroxyde d'hydrogène par la catalase mise en évidence par de Duve et Baudhuin en 1966, la recherche sur ces organelles n'a pas cessé de révéler des rôles cruciaux du peroxysome dans la physiologie des organismes mono et pluricellulaires. Du fait que les peroxysomes ont des fonctions essentielles dans le métabolisme et l'homéostasie lipidique, ainsi que dans le contrôle de l'équilibre RedOx, le(s) dysfonctionnement(s) de cet organelle peuvent entraîner toute une série de maladies plus ou moins graves, allant d'un simple dysfonctionnement métabolique jusqu'à une dégénérescence du système nerveux central (SNC) ou périphérique (SNP).

Les travaux les plus récents ont mis en évidence un rôle essentiel du peroxysome pour le bon fonctionnement du SNC.

Ainsi, les peroxysomes des cellules productrices de myéline dans le SNC (oligodendrocytes), jouent des rôles déterminants dans la myélinisation, ainsi que dans le métabolisme lipidique et le maintien de l'équilibre oxydatif et inflammatoire du SNC.

Parmi les maladies liées à des dysfonctionnements du peroxysome, l'X-ALD est la maladie la plus fréquente. Cette maladie génétique sous sa forme la plus sévère fait intervenir des phénomènes de démyélinisation au niveau du SNC associés à des problèmes inflammatoires et oxydatifs. Au niveau plasmatique et tissulaire, cette maladie est caractérisée par une accumulation d'Acides Gras à Très Longue Chaîne (AGTLC) en particulier C26:0 et C24:0. La séquence d'événements conduisant au phénotype de l'X-ALD est associée à des mutations du gène *ABCD1* localisé sur le chromosome X et à un processus de démyélinisation centrale et / ou périphérique encore mal connu. Les relations entre l'accumulation d'AGTLC et la physiopathologie de l'X-ALD restent obscures.

La pseudo-adrénoleucodystrophie néonatale (P-NALD) est une maladie peroxysomale beaucoup plus rare que l'X-ALD, caractérisée elle aussi par une accumulation plasmatique et tissulaire d'AGTLC. Elle se distingue de l'X-ALD par une déficience en acide docosahexaénoïque (DHA) nécessaire au bon fonctionnement du SNC. Cliniquement, elle est caractérisée par une neurodégénérescence précoce, une hypotonie et des désordres moteurs. La déficience en Acyl-CoA oxydase-1 (ACOX-1), qui catalyse la première étape de la bêta-oxydation peroxysomale, résulte d'anomalies génétiques localisées sur le chromosome 17 qui sont à l'origine de cette maladie.

Dans le contexte de l'X-ALD et la P-NALD, l'objectif de notre travail a consisté à mieux comprendre la physiopathologie de l'X-ALD et de la P-NALD, notamment les liens mécanistiques pouvant exister entre stress oxydant, mort cellulaire et expression des protéines majeures de la myéline (PLP, MBP) dans des oligodendrocytes en cherchant à préciser la part prise par les protéines peroxysomales ABCD1 et ACOX1.

Dans ce travail, nous avons d'abord caractérisé la lignée d'oligodendrocytes murins 158N. Par la suite, la capacité des AGTLC (C26:0, C24:0) à induire un stress oxydant et à activer la mort des oligodendrocytes a été établie sur les oligodendrocytes murins 158N sauvages ou déficients en *Abcd1* et *Acox1* obtenus par transfection à l'aide de siRNAs. Les résultats *in vitro* ont conduit à utiliser des plasmas de malades avec différentes formes d'X-ALD (forme inflammatoire cérébrale et démyélinisante (Childhood Cerebral ALD : CCALD); forme non inflammatoire cérébrale démyélinisante (Adolescent or Adult Cerebral ALD : ACALD); forme démyélinisante périphérique ou adréno-myélonéuropathie (AMN); maladie d'Addison affectant les glandes corticosurrénales). Sur ces échantillons plasmatiques, des marqueurs du stress oxydant ont été recherchés (7-hydroxycholestérols et HODEs) pour distinguer les différentes formes de l'X-ALD afin ultérieurement de pouvoir suivre l'évolution de cette maladie et d'adapter aux patients les traitements les mieux appropriés.

II Le Peroxysome

1 Généralités

Par définition « peroxysome » est un terme issu du latin (*per* : grande quantité) et du grec (*oxus* : pointu et *sôma* : corps). « Peroxysome » signifie donc corps de peroxyde. Il s'agit de particules présentes à l'intérieur du cytoplasme de toutes les cellules eucaryotes, à l'exception des érythrocytes. Le peroxysome a été décrit pour la première fois en 1954 par J. Rhodin (Rhodin, 1954). En 1966, la première fonction physiologique a été montrée par de Duve (de Duve & Baudhuin, 1966). La taille du peroxysome, le nombre, la composition protéique et le rôle biochimique dépendent du type d'organisme ou des cellules et des conditions environnementales (stress, besoin métabolique...) (Titorenko & Rachubinski 2001; Gunkel *et al.*, 1999).

2 Structure des peroxysomes

Les peroxysomes sont constitués d'une matrice protéique dense délimitée par une membrane simple (0,1 – 1µm de diamètre) de type bicouche lipidique qui les isole du cytosol. Cette structure renferme un corps cristallin appelé noyau cristalloïde ou nucléoïde. A la différence de la mitochondrie, ils ne possèdent pas d'acides nucléiques (Schrader & Fahimi, 2008). Entre espèces (animaux, plantes, levures.....), certaines caractéristiques des peroxysomes sont conservées, notamment certaines enzymes ou systèmes enzymatiques concernant les espèces réactives de l'oxygène (Michels *et al.*, 2005).

3 Biogenèse des peroxysomes

La biogenèse des peroxysomes se subdivise en 3 parties : (1) la formation de la membrane peroxysomale, (2) l'import des enzymes peroxysomales matricielles et (3) la prolifération. Une famille de protéines est en particulier impliquée dans ces processus, appelée les peroxines, codées par des gènes Pex (Girzalsky *et al.*, 2010); 32 peroxines différentes sont connues, conservées de la levure à l'Homme (Platta & Erdmann, 2007).

Les premières observations en microscopie électronique montraient une proximité des peroxysomes et du réticulum endoplasmique (RE), avec parfois une continuité entre les deux structures. Ceci a laissé supposer que les peroxysomes étaient issus du bourgeonnement du RE (Novikoff & shin, 1964; Titorenko & Rachubinski, 1998; Mullen *et al.*, 2001). Hoepfner et ses collègues ont transformé des levures mutantes en Pex3 et Pex19 avec deux plasmides contenant les gènes codant pour Pex3p

et Pex19p (gènes de la biogenèse du peroxysome (Eckert & Erdmann, 2003; Purdue & Lazarow, 2001)) fusionnés avec un gène rapporteur : le YFP (yellow fluorescent protein). L'utilisation de la microscopie à fluorescence en temps réel a permis de montrer que Pex3 et Pex19 se concentrent à la périphérie du RE et recrutent par la suite Pex19p afin de produire par bourgeonnement une structure capable d'importer d'autres protéines membranaires peroxysomales et donnent lieu à un pré-peroxysome (Hoepfner *et al.* 2005). Cette structure pré-peroxysome intègre par la suite les protéines membranaires peroxysomales qui sont dirigées vers le peroxysome grâce à des signaux d'adressage (mPTS) (Figure 1).

Par ailleurs, Lazarow et Fukui proposèrent le modèle de croissance et division, dans lequel les peroxysomes bourgeonnent à partir de peroxysomes pré-existants. Des peroxysomes « primitifs » seraient ainsi la cible de nouvelles protéines peroxysomales synthétisées lors de la croissance cellulaire. Ces organites augmentent alors de taille par importation de protéines et se multiplient par division. Il semblerait qu'après cette fission, l'organite mature perde sa capacité à incorporer de nouvelles protéines (Lazarow & Fujiki, 1985; Purdue & Lazarow, 2001; Van der Klei & Veenhuis, 2002; Lazarow, 2003). Dans cette hypothèse, le réticulum endoplasmique est supposé fournir les phospholipides nécessaires à la formation des nouveaux peroxysomes *via* des vésicules spécialisées (Lazarow, 2003) (Figure 2).

Deux revues (Hoepfner *et al.*, 2005; Lazarow, 2003) montrent que les deux théories de la biogenèse des peroxysomes sont concevables. Il reste à élucider si les deux mécanismes de biogenèse ont lieu en même temps.

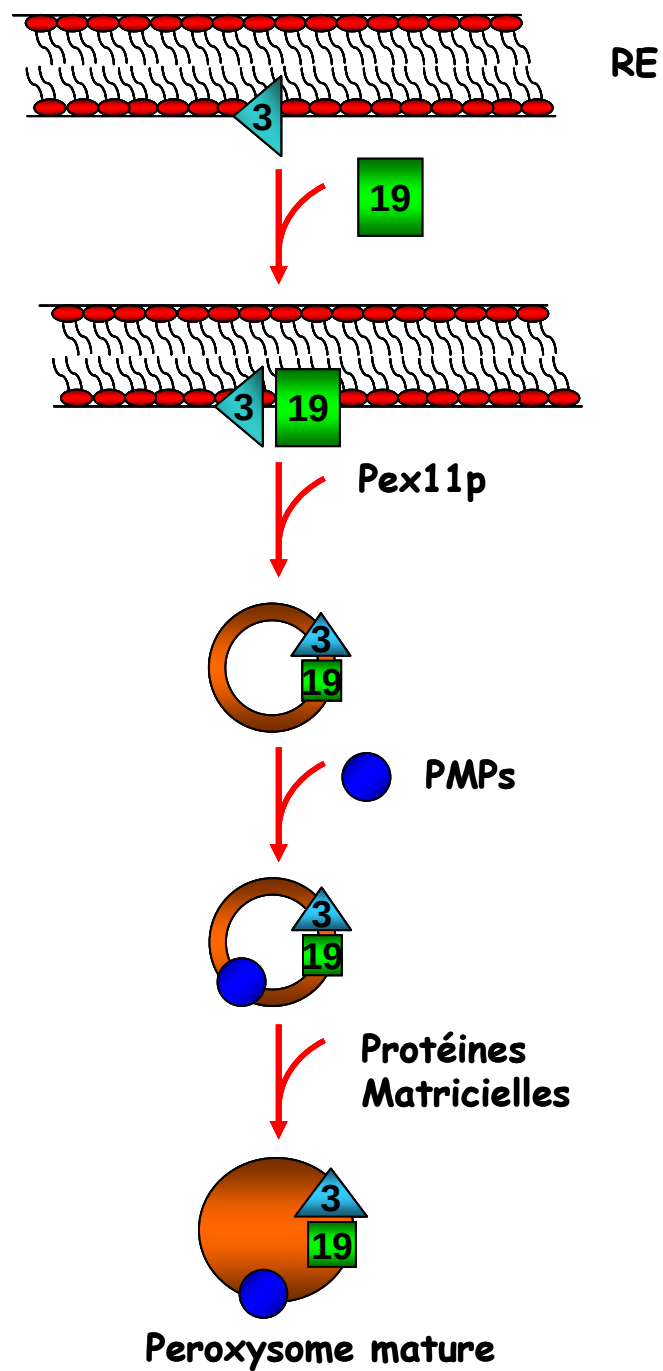


Figure 1 : Voie de maturation du peroxisome dépendante du RE ([Kuneau, 2005](#))

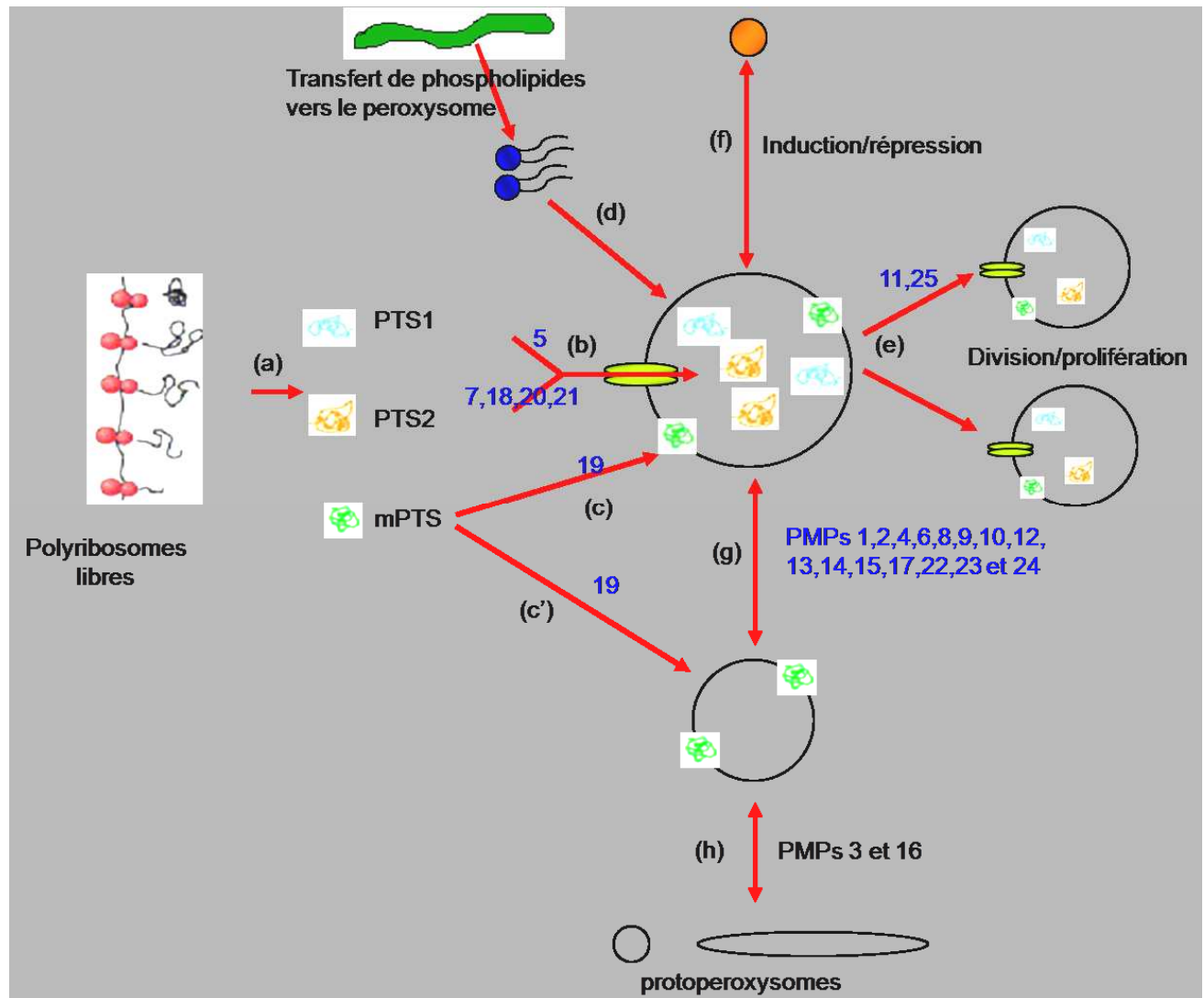


Figure 2 : Voie de maturation du peroxysome par division et fission ([Lazarow, 2003](#))

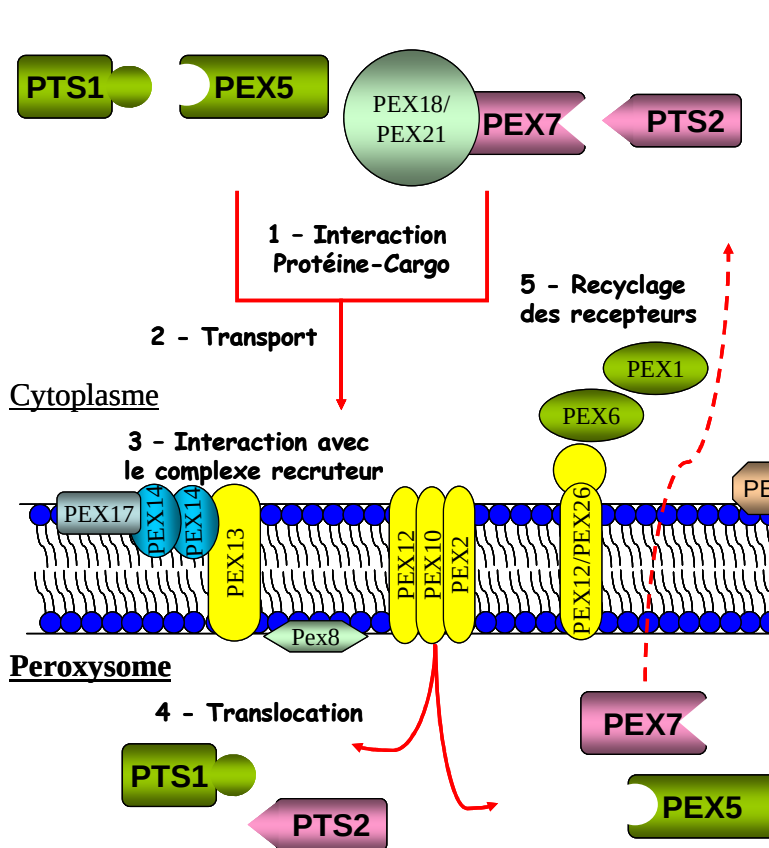
3.1 Adressage des protéines vers le peroxysome

Les peroxysomes sont dépourvus d'ADN (Kamiryo *et al.*, 1982) et ne contiennent aucun système indépendant de synthèse protéique; c'est pourquoi, toutes les protéines destinées aux peroxysomes sont codées par l'ADN nucléaire et synthétisées dans le cytosol par les polysomes libres. Ces protéines sont ensuite adressées vers ces organites après leur traduction. Certaines protéines destinées aux peroxysomes peuvent être assemblées en oligomères préalablement à leur importation et leur transport ne nécessite pas la modification de leur structure quaternaire (Van der Klei & Veenhuis, 1997).

Trois séquences permettant l'adressage des protéines peroxysomales ont été identifiées. Deux d'entre elles, PTS1 (carboxy-terminal) et PTS2 (amino-terminal) identifient la protéine peroxysomale matricielle; la troisième PEX19BS (site de liaison de PEX19) identifie la protéine peroxysomale membranaire. Selon le type de PTS les protéines sont transférées au peroxysome par l'intermédiaire de Pex5 (récepteur PTS1), de Pex7 (récepteur PTS2) ou de Pex19 (récepteur de protéine de membrane) (Schlüter *et al.*, 2007).

Les protéines destinées à la matrice et à la membrane sont pour la plupart intégrées directement au peroxysome à partir du cytosol grâce au signal PTS1. Une partie de ces protéines serait dirigée vers le peroxysome indirectement à travers le RE par PTS2 (Titorenko & Rachubinski, 2001). Le système d'importation des protéines membranaires est donc distinct de celui des protéines matricielles (Platta & Erdmann, 2007) (Figure 3). Les complexes récepteur-protéine vont s'ancrer à des protéines de la membrane peroxysomale, ce qui induit une translocation à l'intérieur du peroxysome. La protéine est alors libérée dans la matrice et le récepteur cytosolique recyclé (Hettema *et al.*, 1999; Brown & Baker, 2003; Schlüter *et al.*, 2007).

A- Importation des protéines matricielles



B- Insertion des protéines membranaires

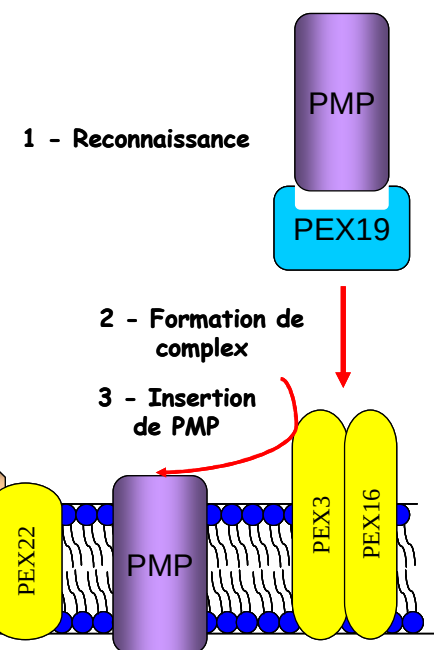


Figure 3 : Adressage des protéines peroxysomales matricielles ou cytosolique du cytoplasme vers le peroxysome (Michels et al., 2005)

3.2 Prolifération peroxysomale

Les peroxysomes sont dynamiques (modification de la taille et de la forme) et possèdent la capacité de proliférer en réponse à une stimulation intra ou extracellulaire (Lazarow, 2003). Il existe trois mécanismes qui peuvent réguler le dynamisme des peroxysomes :

- (1) promotion de la division par des mécanismes qui impliquent Pex11 et/ou des « protéines dynamine-like » (Schrader *et al.*, 1998; Koch *et al.*, 2003). Ces mécanismes sont induits généralement par des lipides, *via* l'activation de PPAR α chez les cellules humaines par exemple (Gurvitz & Rottensteiner, 2006).
- (2) inhibition de la division *via* la complexation entre ACOX et Pex16p chez les levures *Yarrowia lipolytica* (Guo *et al.*, 2003).
- (3) contrôle métabolique du dynamisme peroxysomale (Chang *et al.*, 1999).

4 Rôles des peroxysomes

Les peroxysomes possèdent environ 50 activités enzymatiques différentes d'où leurs rôles métaboliques essentiels dans le développement harmonieux des organismes (Wanders & Waterham, 2006a), ces rôles pouvant changer d'un organisme à un autre (homme, plantes, levures, bactéries...) (Tableau 1).

<i>Rôles</i>	<i>Levures</i>	<i>Fungi</i>	<i>plantes</i>	<i>Mammifères (Homme)</i>
<i>Métabolisme des peroxydes (Catalase, SOD), Métabolisme de ROS/RNS</i>	Oui	Oui	Oui	Oui
<i>Biosynthèse des lipides (éthers de phospholipides/plasmalogène; acides biliaires, cholestérol, élongation des acides gras)</i>	Non	Non	Non	Oui
<i>Béta-oxydation (AGTLC.....)</i>	Oui	Oui	Oui	Oui
<i>Alpha-oxydation (acide phytanique)</i>	Non	Non	Non	Oui
<i>Régulation du rapport acyl-CoA/CoA</i>	Oui	Oui	Oui	Oui
<i>Métabolisme des acides aminés (polyamines..)</i>	Oui	Oui	Oui	Oui
<i>Catabolisme des purines</i>	Non	Non	Oui	Oui
<i>Métabolisme du nicotinate et nicotinamide</i>	?	?	?	Oui
<i>Métabolisme du rétinol</i>	?	?	?	Oui
<i>Biosynthèse des antibiotiques</i>	Non	Oui	Non	Non
<i>Synthèse de glycérol</i>	?	?	Oui	?
<i>Métabolisme de glyoxylate et dicarboxylate</i>	Oui	Oui	Oui	Non

Tableau 1 : Les fonctions métaboliques des peroxysomes (Schrader & Fahimi, 2008).

4.1 Fonctions peroxysomales en relation avec le métabolisme des lipides

4.1.1 Béta-oxydation peroxysomale

La β -oxydation est la voie de dégradation principale et universelle des acides gras chez les mammifères, les levures, les bactéries ou encore les plantes. Elle a lieu dans les mitochondries et les peroxysomes (en fonction du nombre de carbones des acides gras) chez les eucaryotes supérieurs et seulement dans les peroxysomes chez les plantes et les levures. Chez les eucaryotes, la β -oxydation peroxysomale des acides gras à très longue chaîne (AGTLC) est incomplète, la phase terminale de ce processus est assurée par la mitochondrie. Le mécanisme est identique dans ces deux organites et implique une série de quatre réactions successives qui sont :

- (1) déshydrogénation
- (2) hydratation
- (3) déshydrogénation
- (4) clivage thiolique

A la fin de chaque cycle de β -oxydation, les acides gras sont raccourcis de deux atomes de carbones qui sont libérés sous la forme d'Acétyl-CoA.

Plusieurs types de substrats sont bêta-oxydés dans le peroxysome :

- a) AGTLC ($C \geq 22$ carbones), notamment l'acide hexacosanoïque ou C26:0 : ces acides gras ont des origines exogènes (sources alimentaires) ou endogènes (élongation à partir d'autres acides gras (voie majeure chez les mammifères))
- b) Acide pristanique « 2,6,10,14-tetramethylpentadecanoic acid » : cet acide gras branché a deux origines : (1) exogène (alimentaire); (2) produit de l' α -oxydation de l'acide phytanique
- c) Les acides di- et tri-hydroxycholestéanoïques (DHCA et THCA) : ce sont des intermédiaires dans la synthèse des acides biliaires
- d) L'acide tétracosahexaénoïque (C24:6 ω -3) est bêta-oxydé dans le peroxysome afin de produire l'acide docosahexaénoïque : DHA ou C22:6 ω -3
- e) L'acide dicarboxylique

La β -oxydation des différents substrats dans les peroxysomes est présentée dans la Figure 4. L'acide pristanique exogène ou endogène subit 3 cycles de β -oxydation pour donner lieu à 3 produits (propionyl-CoA (2 $\times$), Acetyl-CoA et 4,8-dimethylnonanoyl-CoA) qui seront transportés dans la mitochondrie pour une oxydation complète (CO_2 et H_2O) (Figure 4 A-B). Les nombres de cycles de la β -oxydation d'AGTLC (notamment C24:0 et C26:0) sont indéterminés (Figure 4 C). Les intermédiaires des acides biliaires (DHCA et THCA) sont confrontés à un seul cycle de β -oxydation peroxysomale pour donner lieu à 2 produits finaux : choloyl-CoA et chenodeoxycholoyl-CoA respectivement (Figure 4 D). Ces 2 produits sont par la suite transportés dans le cytosol pour terminer la synthèse d'acide biliaire. Certaines étapes de la biosynthèse d'éther de phospholipides ont lieu uniquement dans les peroxysomes (Figure 4 E). Ces substrats doivent être activés avant leur entrée dans le peroxysome pour être β -oxydés via l'intervention d'enzymes appelées "Very Long Chain acyl-CoA Synthetases" ou VLCS (Steinberg *et al.*, 1999; Watkins & Seifert, 2000; Jia *et al.*, 2004), et interagissent avec les transporteurs ABC (ATP Binding Cassette) afin de permettre l'entrée des AGTLC dans le peroxysome (Makkar *et al.*, 2006).

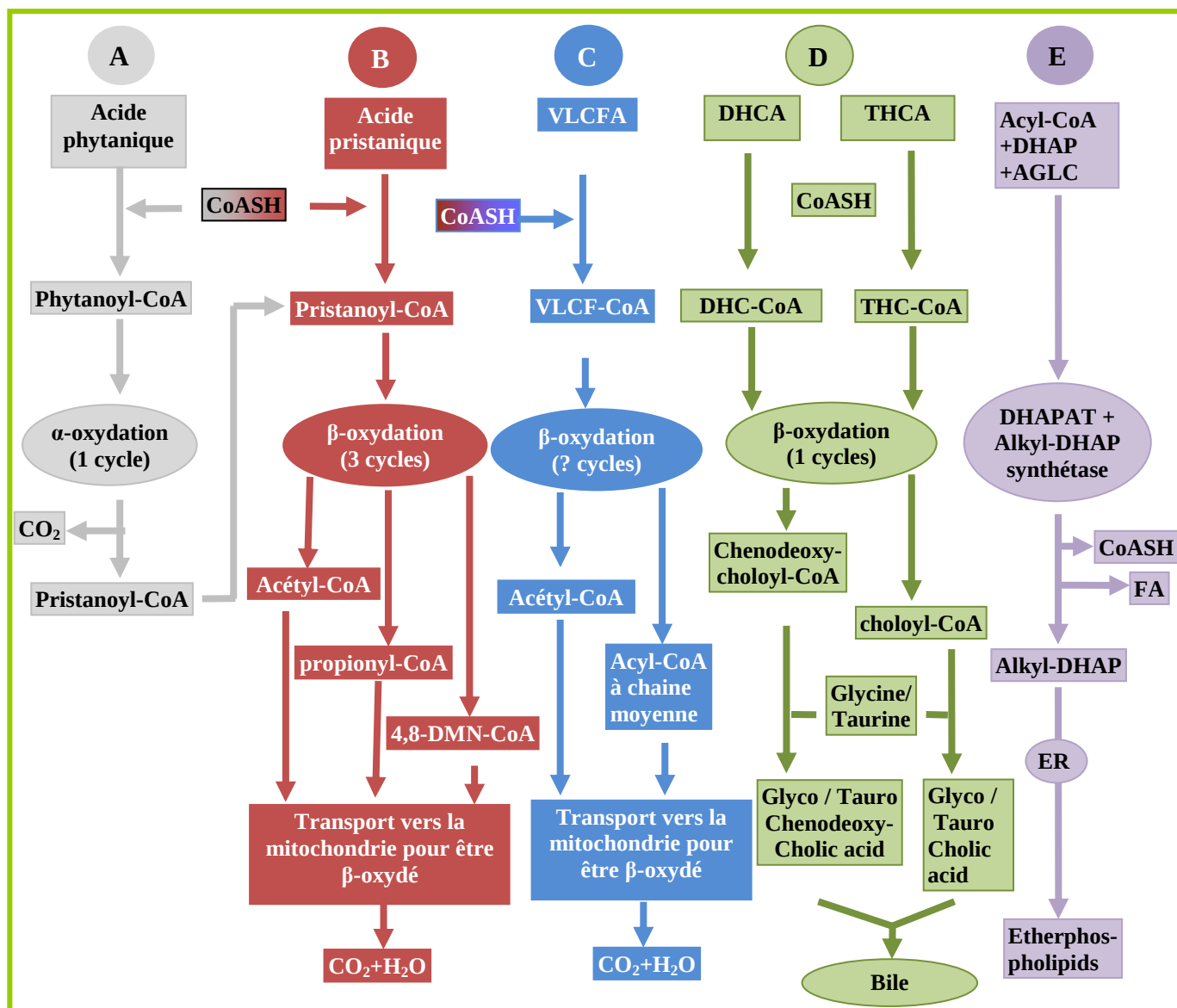


Figure 4 : Métabolisme des différents substrats de β -oxydation peroxysomale (Wanders et al., 2010)

Les AGTLC doivent d'abord être convertis en dérivés CoA (par l'AGTLC-CoA Synthétase) dans le cytosol, puis transportés dans les peroxysomes pour y être β -oxydés (Watkins, 1997) (Figure 6). Il est possible que les protéines ALDs importent les AGTLCs ou leurs dérivés CoA dans les peroxysomes (Aubourg, 2007). Les ALDs sont des « hémi-transporteurs » peroxysomaux de type ABC (Visser *et al.*, 2007). Ces hémi-transporteurs ont la capacité de s'homodimériser ou de s'hétérodimériser avec un autre transporteur de la famille ABCD (Smith *et al.*, 1999; Tanaka *et al.*, 2002; Guimarães *et al.*, 2004). L'homo ou l'hétérodimérisation entre les différents transporteurs ABCD serait à l'origine des spécificités de substrats et donc du type d'acides gras transportés.

Un cycle de β -oxydation peroxysomale fait intervenir 3 enzymes différentes (Figure 5). L'Acyl-CoA oxydase est la première de ces enzymes. Elle est considérée comme étant l'enzyme régulant le flux "d'entrée" des Acyl-CoA dans la voie de dégradation. Elle catalyse la réaction qui transforme l'Acyl-CoA en 2-trans-énoyl-CoA. Chez l'Homme, 2 Acyl-CoA oxydases ont été identifiées dans le peroxysome : la palmitoyl-CoA oxydase pour les AGTLC (ACOX1) et la pristanoyl-CoA oxydase (ACOX2) qui ne se retrouve que dans le foie et est spécifique des précurseurs des acides biliaires et des acides gras branchés (Baumgart *et al.*, 1996). Deux isoformes de l'ACOX1, issues d'un épissage alternatif, sont également présentes : ACOX1a et ACOX1b. La spécificité de substrats de l'ACOX1a concernerait les AG à chaîne moyenne et longue chaîne alors que l'ACOX1b prendrait en charge les AGTLC (Oaxaca-Castillo *et al.*, 2007). Les deux étapes suivantes de la β -oxydation des AG sont catalysées par une seule enzyme dite bifonctionnelle ou multifonctionnelle : (PBE : "Peroxisomal Bifunctional Enzyme"). Celle-ci possède à la fois une activité énoyl-CoA hydratase et une activité 3-hydroxyacyl-CoA déshydrogénase. La première activité permet l'hydratation du 2-trans-énoyl-CoA en D-3-hydroxyacyl-CoA, puis la seconde réaction est une réaction d'oxydo-réduction permettant la conversion du D-3-hydroxyacyl-CoA en 3-cétoacyl-CoA. Chez l'Homme, deux protéines bifonctionnelles distinctes sont présentes : la L-PBE et la D-PBE. Elles ont une petite séquence homologue mais sont structurellement différentes. Chacune des isoformes deshydrogène les 2 énantiomères L et D du 3-hydroxyacyl-CoA. La dernière étape de la β -oxydation peroxysomale consiste à cliver le 3-cétoacyl-CoA pour libérer une molécule d'Acétyl-CoA et un acide gras raccourci de deux atomes de carbone. Cette étape est catalysée par les thiolases peroxysomales. Chez l'Homme, 2 enzymes ont des activités thiolases : la pTh1 et la SCPx essentielle à l'oxydation de l'acide pristanique, de l'acide hydrodésoxycholique (HDCA) et de l'acide tri-hydroxycholestéanoïque (THCA). Ces 4 étapes se répètent jusqu'à obtention d'un Acyl-CoA à chaîne moyenne (Hashimoto *et al.*, 2001) (Figure 6).

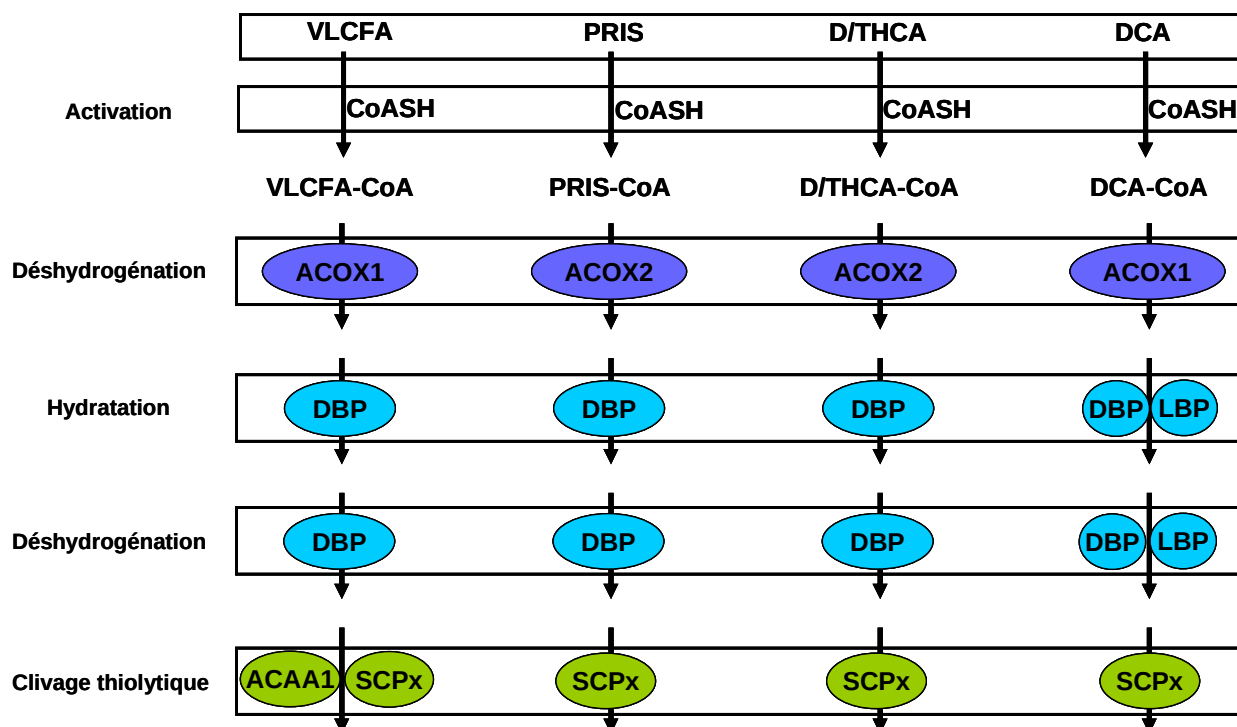


Figure 5 : Enzymologie de la β -oxydation peroxysomale : changement d'isoformes enzymatiques selon le type de substrats (Wanders & Waterham, 2006a).

Les Acyl-CoA sont ensuite converties en ester de carnitine par la CAT (Carnitine Acétyl Transférase) ou par la COT (Carnitine Octanoyl Transférase), ce qui leur permet d'être exportés du peroxysome vers la mitochondrie. Les Acyl-CoA peuvent également être hydrolysées par une Acyl-CoA thioestérase et être également expulsées par un mécanisme qu'il reste à élucider (Wanders & Waterham, 2006a). Cette Acétyl-CoA aura plusieurs destinées possibles, notamment sa condensation à l'acide oxaloacétique pour entrer dans le cycle énergétique qu'est le cycle de Krebs (mitochondrial) (Figure 6).

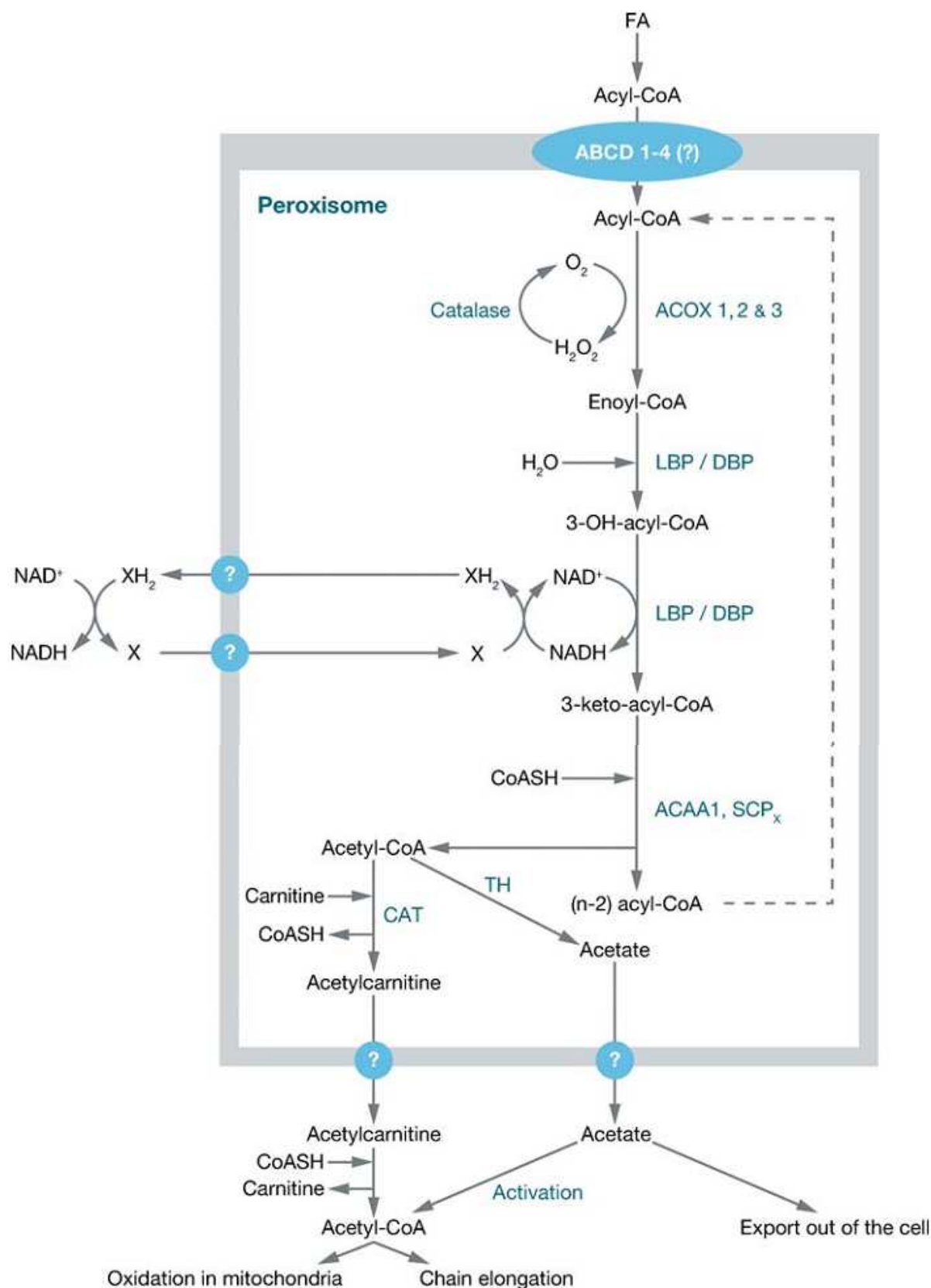


Figure 6 : β -oxydation peroxysomale : activation des AG dans le cytoplasme (a), β -oxydation dans le peroxysome (b), l'acétyl-CoA est transformé en acétyl-carnitine qui est transporté vers la mitochondrie pour être β -oxydé (Wanders & Waterham, 2006a).

4.1.2 Alpha-oxydation peroxysomale

Les acides gras qui ont un groupement méthyle sur le carbone numéro 3 (ex : acide phytanique) ne peuvent pas être dégradés par la voie de β -oxydation. En effet, le groupe méthyle en position 3 bloque la bêta-oxydation. Ces acides gras sont pris en charge par une autre voie d'oxydation exclusivement peroxysomale : l' α -oxydation (Figure 7). L' α -oxydation implique une décarboxylation oxydative d'acide gras méthylé sur le carbone 3 afin de produire un acide gras (n-1) dont le groupe méthyle est sur le carbone 2 (Wanders & Waterham, 2006a ; Wanders & Waterham, 2006b). L'activation du substrat (forme CoA-ester) a lieu soit dans le cytoplasme grâce à « Long-Chain Acyl-CoA synthetase » qui se situe du côté cytosolique du peroxysome (Watkins *et al.*, 1996 ; Miyazawa *et al.*, 1985), soit dans le peroxysome grâce à « Very Long-Chain Acyl-CoA synthetase » (protéine périphérique peroxysomale contenant un PTS2) (Steinberg *et al.*, 1999). L' α -oxydation nécessite l'intervention de 3 enzymes différentes : (1) phytanoyl-CoA 2-hydroxylase dont le rôle est de convertir le phytanoyl-CoA en 2-Hydroxyphytanoyl-CoA; (2) 2-Hydroxyphytanoyl-CoA lyase dont le rôle est de transformer 2-Hydroxyphytanoyl-CoA en pristanal et formyl-CoA; (3) Pristanal-dehydrogenase dont le rôle est de transformer le pristanal en acide pristanique. L'acide pristanique ainsi obtenu sera activé et métabolisé par la voie de β -oxydation peroxysomale (Wanders & Waterham HR, 2006a; Wanders & Waterham HR, 2006b).

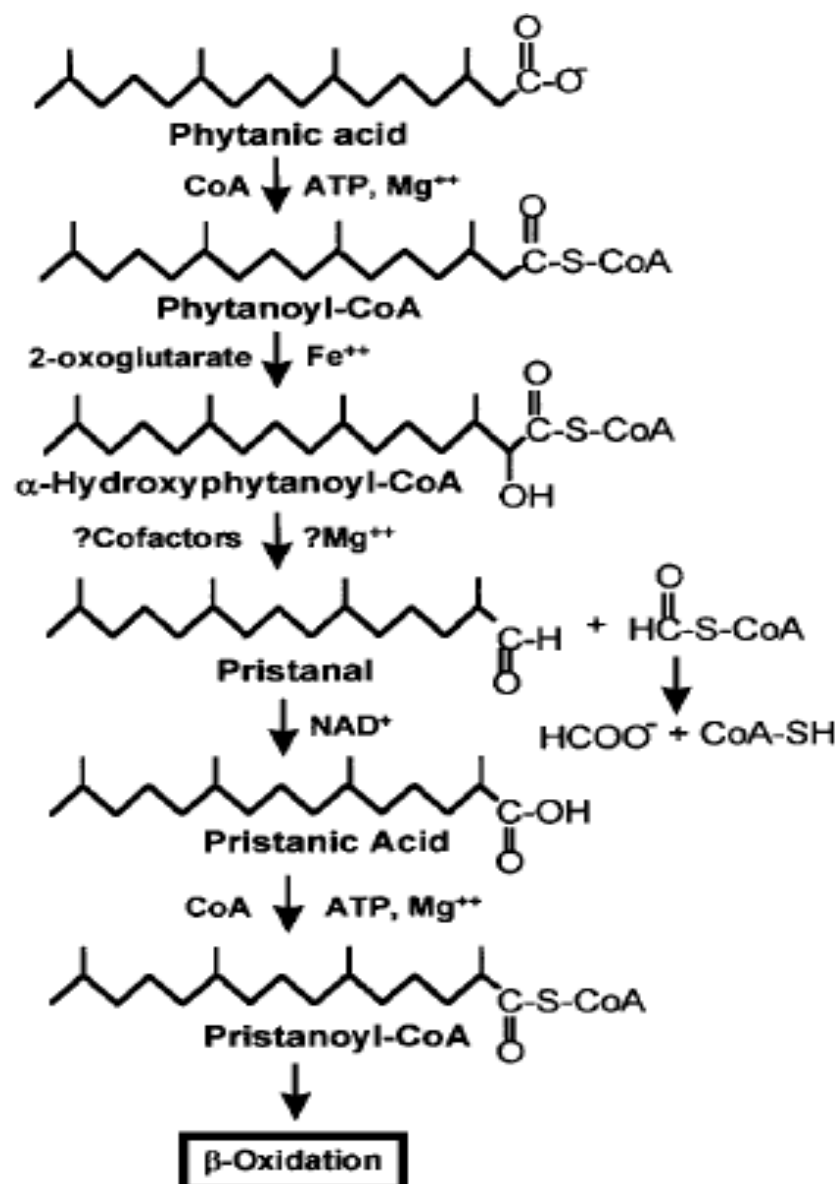


Figure 7 : Voie d' α -oxydation de l'acide phytanique et différentes enzymes impliquées (Steinberg et al., 1999)

4.1.3 Synthèse d'éthers de lipides : les plasmalogènes

La synthèse d'éthers des phospholipides (plasmalogènes) est l'un des rôles métaboliques majeurs du peroxyosome. La biosynthèse de plasmalogène a lieu dans le peroxyosome (les deux premières étapes) puis dans le RE. Dans le peroxyosome, la première étape consiste à estérifier le dihydroxyacétone phosphate (DHAP) avec un acyl-coA à longue chaîne grâce à l'enzyme dihydroxyacétone phosphate acyltransférase (DHAP-AT). La deuxième étape transforme l'acyl-DHAP en alkyl-DHAP grâce à l'enzyme alkyl-dihydroxyacétone phosphate synthase (ADHAP-S) (Brites *et al.*, 2004). Les DHAP-AT et ADHAP-S sont exclusivement peroxyosomales (Singh *et al.*, 1993; Gitshan *et al.*, 1989; Hardeman & Van den Bosch, 1989). Les plasmalogènes constituent une classe particulière de glycérophospholipides membranaires particulièrement abondants dans la substance blanche au niveau du cerveau, des reins et des testicules (la forme plasményl éthanolamine), alors que dans le cœur et les muscles squelettiques, la forme plasményl choline prédomine (Brites *et al.*, 2004; Brites *et al.*, 2009). Les macrophages et les neutrophiles contiennent, en plus des plasmalogènes, des quantités importantes d'éther de phospholipides saturés de plamanyl-choline utilisée pour la synthèse du facteur d'activation plaquettaire (Platelet-Activating Factor ou PAF) (Wanders & Waterham, 2006a). La myéline est riche en éthanolamine plasmalogènes (PE-plasmalogen) (Figure 8). Les fonctions des plasmalogènes seraient liées à la réactivité chimique particulière de leur fonction éther vinylique (Gorgas *et al.*, 2006). Ils semblent jouer des rôles dans la dynamique membranaire, la signalisation cellulaire, le métabolisme et le transport du cholestérol, la lutte contre les oxydants et le métabolisme des acides gras polyinsaturés (AGPI) (Nagan & Zoeller, 2001; Zoeller *et al.*, 1988; Gaposchkin & Zoeller, 1999; Zoeller *et al.*, 1999; Maeba & Ueta, 2003a; Maeba R & Ueta N, 2003b; Kuczynski & Reo, 2006). Les plasmalogènes pourraient aussi intervenir dans la migration des cellules neuronales dans l'adrenoleucodystrophie liée à l'X (X-ALD) (Brites *et al.*, 2009). L'importance des plasmalogènes a été révélée par les différentes maladies métaboliques où la biosynthèse de plasmalogènes est déficiente (syndrome de Zellweger, maladie d'Alzheimer, ceroid-lipofuscinosis neuronal...) (Schrakamp *et al.*, 1985; Han *et al.*, 2001; Kohlschutter *et al.*, 1993; Granier *et al.*, 2000). Néanmoins, 2 maladies sont provoquées directement par la déficience en DHAP-AT et ADHAP-S à savoir la chondrodysplasie rhizomélique ponctuée de type 2 et 3 (RCDP2 et RCDP3) (Wanders & Waterham, 2006b). La concentration de plasmalogène augmente rapidement au cours de la myélinisation, l'éthanolamine et les glycérophospholipides de la myéline correspondent à 70% de plasmalogènes (Reddy & Horrocks, 1982).

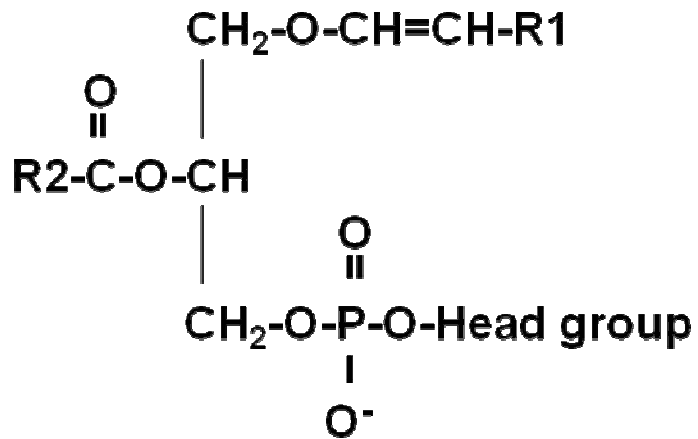


Figure 8 : Structure d'un plasmalogène

R1 = C16:0, C18:0 ou C18:1 ; R2 = PUFA ; Head group : éthanolamine ou choline dans les plasmalogènes, Choline dans le PAF (Gorgas et al., 2006).

4.2 Autres fonctions métaboliques

Les peroxysomes jouent d'autres rôles métaboliques en intervenant dans la synthèse de l'acide docosahéxaénoïque (DHA), les acides biliaires et des leucotriènes.

4.2.1 Synthèse d'acide docosahéxaénoïque (DHA)

L'acide docosahéxaénoïque (DHA) est un constituant majeur d'AGPI de la membrane des cellules neuronales et rétiniennes. Il est nécessaire pour un bon développement de la rétine et du système nerveux central (SNC) (Guesnet & Alessandri, 2010). Le déficit en DHA perturbe la composition lipidique de la membrane et donc les fonctions des astrocytes au niveau du SNC (Champeil-Potokar *et al.*, 2004). Le DHA est synthétisé dans l'organisme à partir des précurseurs essentiels (acide α -linolénique C18:3n-3) apportés par l'alimentation (origine végétale) (Alessandri *et al.*, 2004). La formation de DHA fait intervenir une succession de désaturations et d'élongations (Figure 9), qui se déroulent principalement dans le foie, le muscle ou même le tissu adipeux (Alessandri *et al.*, 2009). Le DHA est synthétisé à partir de l'acide α -linoléique par 2 étapes : la conversion de C18:3n-3 en C20:5n-3 (acide eicosapentaénoïque) puis en C22:5n-3 (acide docosapentaénoïque) et enfin C24:5n-3 dans le RE. La deuxième étape consiste en une β -oxydation peroxysomale d'un seul cycle de C24:6n-3 en C22:6n-3 (DHA) (Ferdinandusse *et al.*, 2001). Cette étape de β -oxydation peroxysomale nécessite l'intervention d'ACOX1, DBP, 3-Ketoacyl-CoA thiolase et SCPx. La chute de la teneur en DHA dans les membranes du SNC s'accompagne d'importantes perturbations fonctionnelles affectant la vision et les capacités d'apprentissage (Alessandri *et al.*, 2004). Dans certaines maladies neurodégénératives (syndrome de Zellweger...), on constate une absence quasi-totale de DHA (Ferdinandusse *et al.*, 2001).

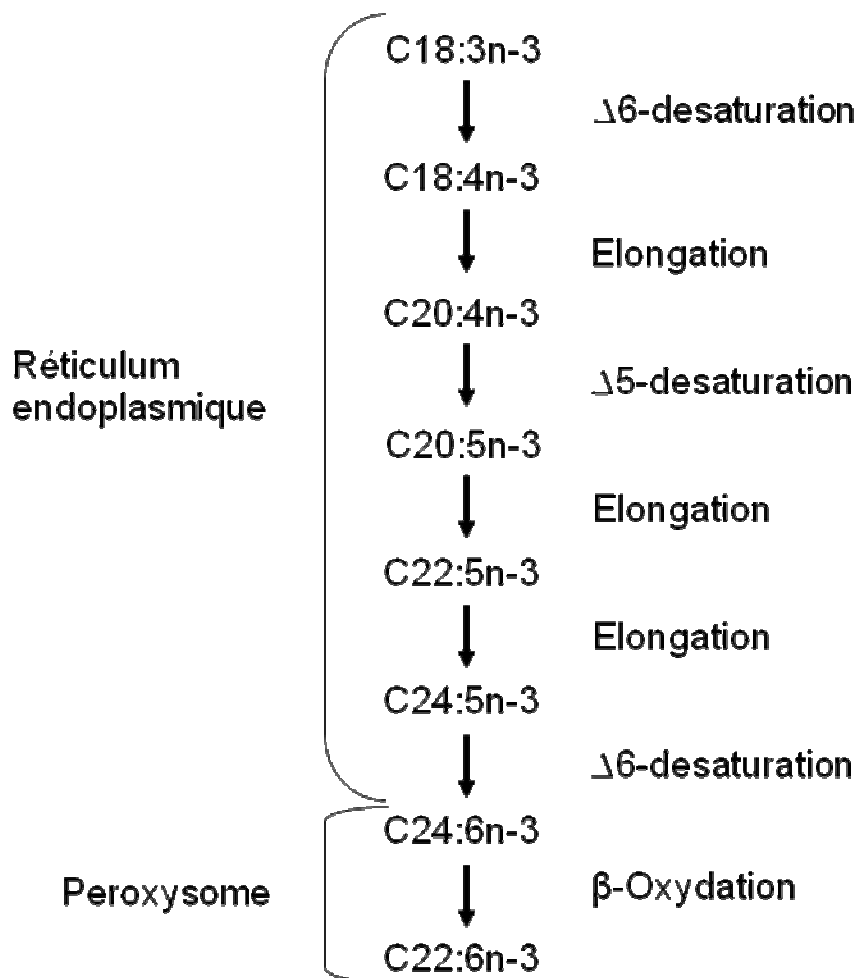


Figure 9 : Synthèse de DHA : DHA est synthétisé à partir de l'acide α -linoléique par deux étapes dans le RE puis dans le peroxyosome ([Ferdinandusse et al., 2001](#)).

4.2.2 Synthèse des acides biliaires

Le cholestérol est converti en acide biliaire par des voies multiples qui impliquent différentes enzymes hépatiques. La synthèse d'acide biliaire joue un rôle important dans l'homéostasie du cholestérol (Russel, 2003). La β -oxydation peroxysomale est nécessaire pour la transformation de l'acide biliaire intermédiaire C27 en acide biliaire mature C24 (Ferdinandusse & Houten, 2006). Chez les patients atteints du syndrome de Zellweger, une accumulation de cet intermédiaire a été identifiée (Hanson *et al.*, 1979). Les intermédiaires (DHCA et THCA) sont métabolisés dans le peroxysome (un seul cycle de β -oxydation). Dans la dernière étape de synthèse, les produits de β -oxydation peroxysomale sont conjugués avec la taurine ou la glycine. Après la conjugaison avec ces 2 acides aminés, ces produits sont exportés dans le cytoplasme *via* des transporteurs non encore identifiés et sont ensuite stockés dans la vésicule biliaire (Ferdinandusse & Houten, 2006).

4.2.3 Métabolisme des leucotriènes

Les leucotriènes (LTs) sont des médiateurs lipidiques obtenus après oxydation de l'acide arachidonique par la 5-lipoxygénase. C'est une classe des lipides de la famille des écosanoïdes (Hammarstrom, 1983; Lewis & Austen, 1984; Samuelsson *et al.*, 1987; Sala *et al.*, 2010). Il existe 2 classes de LTs : (1) les leucotriènes A₄ et B₄ (LTA₄ et LTB₄) qui jouent un rôle chimiotactique pour les leucocytes (Ford-Hutchinson, 1985) ; (2) et les cystéinyl leucotriènes C₄, D₄, E₄ (LTC₄, LTD₄, LTE₄) qui jouent un rôle important dans l'augmentation de la perméabilité vasculaire et la contraction des fibres musculaires lisses (Murphy, 1979; Hammarstrom, 1983; Lewis & Austen, 1984; Samuelsson *et al.*, 1987). En fonction du rôle des LTs dans diverses situations physiologiques, leur inactivation et dégradation sont majeures (Keppler *et al.*, 1989; Ford-Hutchinson, 1989).

Le foie représente l'organe principal pour la captation, l'inactivation, et l'élimination biliaire des LTs et de leurs métabolites. L'inactivation des LTs est atténuée par ω -oxydation et β -oxydation peroxysomale à partir de la partie ω -terminale de LTB₄, LTE₄, et N-acetyl-LTE₄ (Keppler *et al.*, 1992). Les LTC₄ et le LTD₄ sont instables et sont convertis immédiatement en LTE₄. Le N-acétyl-LTE₄ est métabolisé uniquement dans le peroxysome alors que le LTB₄ est métabolisé à la fois dans le peroxysome et dans la mitochondrie (Jedlitschky *et al.*, 1991). Dans certaines maladies peroxysomales (syndrome de Zellweger...), le taux de LTs est important et notamment le LTB₄ qui est une des substances chimiotactiques les plus puissantes (Mayatepek *et al.*, 1993; Johansson *et al.*, 2010). Le LTE₄ est capable d'activer PPAR γ et provoque la génération de la prostaglandine D2 (Paruchuri *et al.*, 2008). Le LTB₄ est un agoniste endogène de PPAR α (Narala *et al.*, 2010).

4.3 Fonctions de détoxication (catalase – oxydase)

Le métabolisme des espèces réactives de l'oxygène ou ERO (synthèse et dégradation) est l'un des rôles métaboliques majeurs du peroxysome (Tableau 2). De Duve fut le premier en 1966 à isoler le peroxysome et à découvrir qu'il contient à la fois les oxydases qui génèrent le peroxyde d'hydrogène et la catalase qui le dégrade (Schrader & Fahimi, 2004).

Enzymes de production des ERO	Substrat	Produits
<i>D-amino oxydase</i>	D-amino acide	H ₂ O ₂
<i>Urate oxydase</i>	Acide urique	H ₂ O ₂
<i>Xanthine oxydase</i>	Xanthine	H ₂ O ₂
<i>Acyl-CoA oxydase</i>	Acide gras	H ₂ O ₂ ; O ₂ ⁻
<i>NO synthase</i>	L-arginine	NO
Enzymes de dégradations des ERO		
<i>Catalase</i>	H ₂ O ₂	H ₂ O + ½ O ₂
<i>Cu/Zn SOD</i>	O ₂ ⁻	H ₂ O ₂
<i>Epoxyde hydrolase</i>	Epoxydes	
<i>Glutathion peroxydase</i>	H ₂ O ₂	H ₂ O + ½ O ₂

Tableau 2 : principales enzymes peroxysomales impliquées dans la dégradation ou la synthèse des ERO (Angermuller et al., 2009; Schrader & Fahimi, 2004; Schrader & Fahimi, 2006).

Le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) est produit par un certain nombre d'oxydases peroxysomales qui ont des substrats variés (Tableau 2). La β-oxydation peroxysomale est la voie de production majeure d'H₂O₂ (Schrader & Fahimi, 2004). L'origine peroxysomale de H₂O₂ constitue 35% de la totalité du H₂O₂ produit dans le foie de rat (Boveris et al., 1972). Les différentes réactions de production ou de dégradation des ERO dans le peroxysome sont présentées dans la Figure 10. Le peroxyde d'hydrogène est décomposé par la catalase et la glutathion-peroxydase (GPx) ou converti en radicaux hydroxyles (OH[•]). Ces radicaux hydroxyles peuvent endommager la membrane peroxisomale par peroxydation des acides gras insaturés. Les hydroperoxydes (R-OOH) formés dans ce processus peuvent être décomposés par la catalase et la glutathion-peroxydase. Certaines oxydases peroxysomales produisent un autre type d'ERO, les anions superoxydes (O₂⁻). Ces anions superoxydes peuvent être éliminés par le superoxyde dismutase de manganèse (MnSOD) ou de

cuivre-zinc (CuZnSOD). La NO synthase (NOS) catalyse la production de monoxyde d'azote (NO) via l'oxydation de la L-arginine (L-Arg). Le NO ainsi formé est capable de réagir avec les anions superoxydes pour former un oxydant puissant, les peroxynitrites (ONOO^-) (Schrader & Fahimi, 2004; Schrader & Fahimi, 2006). Une surproduction de la NO synthase inducible (iNOS) peut provoquer une diminution de l'expression de la catalase et favoriser la formation des peroxynitrites (Stolz *et al.*, 2002). H_2O_2 et NO peuvent traverser la membrane peroxysomale et jouer un rôle dans la signalisation cellulaire. Peroxiredoxin 1 et PMP20 sont impliqués dans la dégradation de H_2O_2 . Mpv17 et M-LP sont impliqués dans le règlement du métabolisme peroxisomal d'ERO (Schrader & Fahimi, 2006).

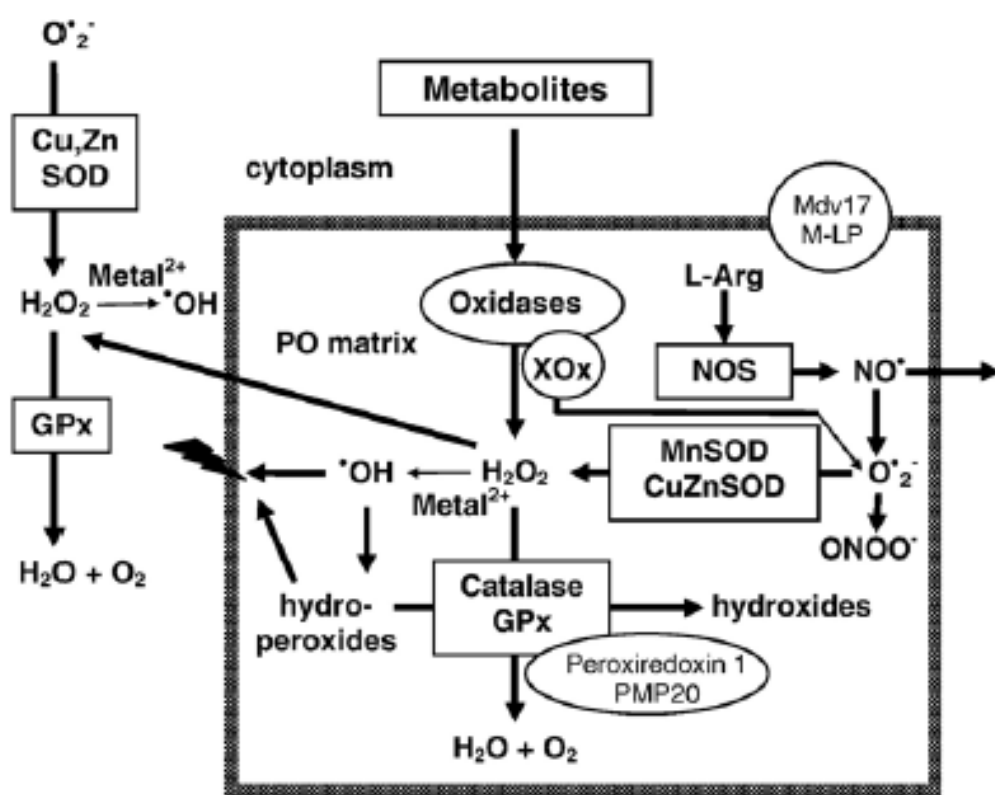


Figure 10 : Enzymes peroxysomales impliquées dans l'homéostasie des ERO (Schrader & Fahimi, 2006).

Puisque le peroxysome est un organe dynamique, une augmentation de la quantité d'oxygène peut provoquer une augmentation modérée de la densité et du volume des peroxysomes ainsi qu'une activité enzymatique plus importante pour les enzymes impliquées dans l'élimination d'ERO. Des cellules ovariennes de hamster CHO exposées à un environnement de 99 % d'oxygène montrent un doublement du volume des peroxysomes et une augmentation (x 4) de l'expression des enzymes anti-oxydantes (catalase, glutathion peroxydase et Cu/Mn SODs) (Van der Valk *et al.*, 1985).

4.4 Peroxysome et système nerveux central

Dans les maladies peroxysomales liées à la biogenèse ou à des mutations de protéine peroxysomale, plusieurs organes sont plus ou moins impliqués (foie, rein, moelle osseuse, yeux,...). Le SNC est aussi souvent très affecté ([Tableau 3](#)), ce qui met en évidence l'importance de cette organelle pour le bon fonctionnement du SNC ([Baes & Aubourg, 2009](#); [Powers & Moser, 1998](#)).

Maladies	Gènes impliqués	Fonction de la protéine
Maladies de biogenèse de peroxysome		
Syndrome de Zellweger	12 PEX (pas PEX7)	Importation de protéines peroxysomales avec un PTS1 ou un PTS2
RCD type 1	PEX7	Importation des protéines peroxysomales un PTS2
Synthèse d'éthers des lipides (plasmalogènes)		
RCDP type II	GNPAT	Synthèse d'éthers de lipide
RCDP type III	AGPS	Synthèse d'éthers de lipide
Maladies de la β-oxydation peroxysomale		
X-ALD	ABCD1	Transport d'acyl-CoA
Déficiences en ACOX	ACOX1	β -oxydation d'AGTLCs saturés
Déficiences en racémase	AMACR	β -oxydation d'AGTLCs branchés
Déficiences en MFP2/D-BP	HSD17b4	β -oxydation d'AGTLCs saturés et branchés
Maladies de l'alpha-oxydation peroxysomale		
maladie de Refsum	PHYH/PAHX	Dégradation d'acide phytanique

Tableau 3 : Maladies peroxysomales avec des pathologies au niveau du SNC ([Baes & Aubourg, 2009](#)).

4.4.1 Rôle du peroxysome dans le système nerveux central et incidence sur la myélinisation

Les peroxysomes sont présents dans toutes les cellules du SNC (gliales ou neurones). Des différences d'abondance des peroxysomes ont été révélées entre les différentes régions cérébrales et les différents types cellulaires du SNC. Les astrocytes sont les plus riches en peroxysomes ([Ahlemeyer et al., 2007](#)). Dans le cerveau de souris, l'abondance des peroxysomes diminue de moitié au cours du développement post-natal ([Ahlemeyer et al., 2007](#)).

Le métabolisme peroxysomal est essentiel pour un développement normal du cerveau chez la souris et chez l'Homme ([Hulshagen et al., 2008](#)). Afin d'étudier le rôle joué par le peroxysome dans la migration neuronale, des modèles animaux déficients en peroxysomes ont été élaborés : souris $\text{Pex5}^{-/-}$ ([Baes et al., 1997](#)) et souris $\text{Pex2}^{-/-}$ ([Faust & Hatten, 1997](#)).

Chez les souris $Pex5^{-/-}$, l'analyse du néocortex a indiqué que la migration et la maturation neuronale sont altérées et que la mort apoptotique des neurones est importante (Baes *et al.*, 1997). Dans le SNC des souris nouveau-nées $Pex2^{-/-}$, il y a une stratification désordonnée dans le cortex cérébral et une densité accrue de cellules dans la matière blanche fondamentale, indiquant une anomalie de migration neuronale (Faust & Hatten, 1997). Les études sur le modèle de souris mimant la maladie de Zellweger ($Pex2^{-/-}$) démontrent que les défauts dans la migration neuronale, la prolifération neuronale, la différenciation et survie neuronale au niveau du SNC peuvent contribuer à des malformations au cours du développement (Faust *et al.*, 2005). Par l'utilisation des souris $Pex5^{-/-}$ et après une restauration sélective de l'expression de $Pex5^{-/-}$ dans le SNC et dans un autre tissu extraneuronal, Janssen et ses collaborateurs (Janssen *et al.*, 2003) ont montré que le métabolisme peroxysomal dans le cerveau, mais aussi dans des tissus extraneuraux (foie), peut affecter le processus de migration neuronale dans le néocortex du souris. Ces observations ont été confortées par Krysko et collaborateurs (Krysko *et al.*, 2007). L'accumulation des AGTLC et la déplétion en plasmalogène et en DHA provoquent une perturbation de la migration neuronale aussi observée dans les maladies peroxysomales (Janssen *et al.*, 2003).

Parmi les différents types cellulaires du cerveau, l'oligodendrocyte a la plus grande capacité à détoxifier les ERO (Hirrlinger *et al.*, 2002). Les peroxysomes sont abondants dans les oligodendrocytes au cours de la myélinisation (Adamo *et al.*, 1986). Afin de déterminer le rôle joué par les peroxysomes dans les oligodendrocytes, des souris $CNPase-Pex5$ KO ont été réalisées (Kassman *et al.*, 2007). La $CNPase$ est une enzyme exprimée dans les oligodendrocytes immatures et matures. Ces souris sont caractérisées par une inactivation sélective des peroxysomes dans les oligodendrocytes. Elles montrent une accumulation d'AGTLCs et une diminution de la synthèse de plasmalogène (80%) dans la myéline purifiée. Les taux d'acides gras accumulés sont équivalents aux taux observés dans les lysats du cerveau des souris déficientes en $Abcd1$ (x4) (Kobayashi *et al.*, 1997), ce qui indique que les peroxysomes oligodendrocytaires sont largement responsables de la dégradation des AGTLCs dans le cerveau. A l'âge de 4 mois, ces souris présentent des anomalies comportementales et de troubles neurologiques. Une démyélinisation progressive au niveau du SNC est observée tardivement (à partir de 6 mois) chez ces souris au niveau du corps calleux, alors que des signes de perturbation de transport axonal (gonflement axonal) ont été identifiés précocement. Ce phénomène n'est pas accompagné par une mort cellulaire des oligodendrocytes. L'incapacité des oligodendrocytes déficients en $Pex5$ à maintenir l'intégrité axonale, même avant une démyélinisation visible, indique une fonction critique des peroxysomes des oligodendrocytes comme un support de l'intégrité axonale (Kassman *et al.*, 2007). Chez ces souris, un phénomène de gliose a été observé au niveau du SNC *via* l'activation des macrophages et des astrocytes avant même la démyélinisation et

la perte des axones. A partir de 4 mois, ces souris présentent une augmentation importante des facteurs pro-inflammatoires et chemo-attractants des lymphocytes (MIP1- α ; MCP-1; TNF- α ; IL-10...). L'expression de ces facteurs pro-inflammatoires est suivi par une infiltration de monocytes, des lymphocytes B et T (notamment CD8+). Cette étude a montré l'importance des peroxysomes des oligodendrocytes dans la neuroprotection des axones et dans le maintien d'un environnement non-inflammatoire au niveau du SNC (Kassman *et al.*, 2007).

Un autre modèle Nestin-Pex5 a été élaboré. Dans ce modèle, l'inactivation du peroxysome a lieu dans les astrocytes, les neurones et les oligodendrocytes (Hulshagen *et al.*, 2008). L'initiation de neurodégénération de ces souris est plus précoce, la progression est plus rapide. Ces souris meurent au bout du 6 mois (Hulshagen *et al.*, 2008) alors que les souris *CNPase-Pex5* meurent au bout de 12 mois (Kassman *et al.*, 2007). Ces observations indiquent l'importance des peroxysomes des autres cellules gliales dans la formation et la stabilité de la myéline autour des axons (Hulshagen *et al.*, 2008). Dans ces deux modèles, les peroxysomes fonctionnels sont absents au cours de la différenciation et dans la période active de myélinisation (10-20 jours post-natals) (Baes & Aubourg, 2009). L'absence du peroxysome dans les oligodendrocytes ne les empêche pas de différencier. Chez les souris *CNPase-Pex5*, la formation et la maintenance de la myéline est normale jusqu'à l'âge de deux mois ce qui indique que les peroxysomes ne sont pas pré-requis pour la myélinisation. Ceci peut être expliqué par le fait que les autres cellules du SNC ont des peroxysomes intacts (Baes & Aubourg, 2009). Par contre, une fois la myélinisation terminée, le métabolisme du peroxysome oligodendrocytaire semble crucial pour préserver les axones et assurer le maintien de l'intégrité de la myéline (Baes & Aubourg, 2009). L'absence de peroxysomes fonctionnels dans les neurones des souris *NEX-Pex5* et les astrocytes dans les souris *GFAP-Pex5* ne provoque pas une dégénérescence axonale ou comportementale chez les souris avant l'âge de 20 mois (tardivement) (Bottelbergs *et al.*, 2010). Ceci indique que les fonctions des peroxysomes astrocytaires et neuronaux sont mineures par rapport à ceux des oligodendrocytes pour le maintien des axones et de la myéline (Baes & Aubourg, 2009; Bottelbergs *et al.*, 2010).

4.4.2 Peroxysome et médiateurs lipidiques d'inflammation dans le système nerveux central

Le peroxysome assure la dégradation de certains éicosanoïdes (leucotriènes) (Diczfalusy, 1994) qui sont des médiateurs lipidiques importants de l'inflammation. Ces médiateurs jouent le rôle de chemo-attractants des lymphocytes (Funk, 2001). Ces éicosanoïdes s'accumulent dans le cas de dysfonctionnement primaire ou secondaire du peroxysome. L'accumulation des leucotriènes a été confirmée dans les hépatocytes de patients souffrant du syndrome de Zellweger (Mayatepek & Tiepelmann, 1996), ou encore dans le liquide céphalorachidien de patients atteints d'X-ALD d'une façon indépendante de la phase de la maladie (Mayatepek & Tiepelmann, 2003).

Par ailleurs, la myéline est composée de 70% de lipides dont la moitié sont des phospholipides. Ces phospholipides peuvent être dégradés par la phospholipase A₂ qui libère l'acide arachidonique et des lysophospholipides (substances démyélinisantes). Ensuite, le métabolisme de l'acide arachidonique donne des éicosanoïdes (médiateurs d'inflammation). Dans un cerveau intact, ces produits sont directement éliminés et ne dépassent pas un certain seuil (Farooqui *et al.*, 2007).

Il est possible que la perturbation du métabolisme lipidique dans les oligodendrocytes de maladies peroxysomales puisse diminuer le catabolisme des éicosanoïdes, ce qui provoque leur accumulation dans le SNC (Kassmann & Nave, 2008). Kassmann et Nave ont proposé un modèle qui pourrait expliquer l'implication des peroxysomes oligodendrocytaires dans la démyélinisation inflammatoire (Figure 11). A partir d'un certain seuil, les médiateurs lipidiques d'inflammation s'accumuleraient dans le SNC, activeraient la microglie, et provoqueraient une infiltration de leucocytes dans le SNC, ce qui conduirait à une démyélinisation inflammatoire du SNC. Ces attaques inflammatoires du SNC pourraient perturber le métabolisme lipidique des oligodendrocytes, et ainsi amplifier la démyélinisation (Kassmann & Nave, 2008).

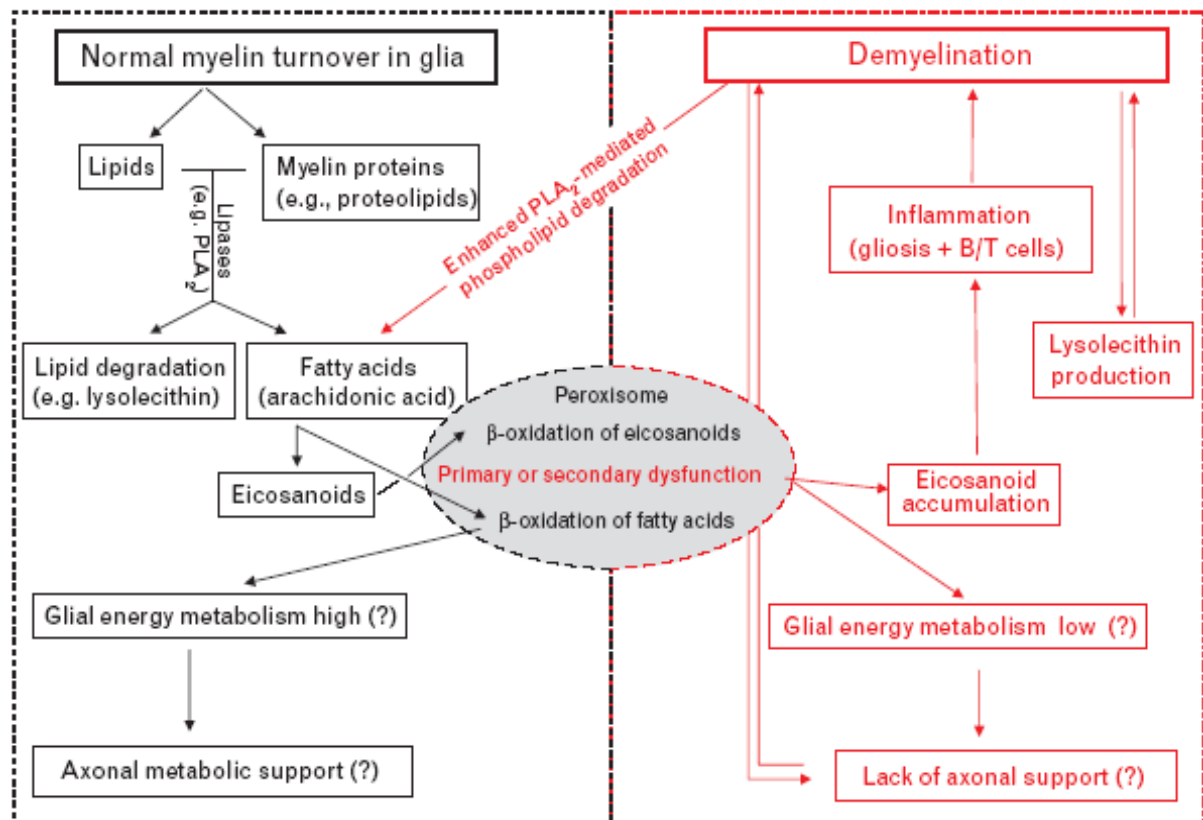


Figure 11 : Modèle hypothétique du rôle des peroxysomes oligodendrocytaires dans la myélinisation, incluant la β -oxydation et la dégradation des lipides bioactifs (Kassman & Nave, 2008).

5 Interaction du peroxysome avec d'autres organelles

La communication et les interactions inter-organelles sont nécessaires. Les peroxysomes interagissent avec plusieurs organelles essentiellement avec la mitochondrie et le réticulum endoplasmique, mais aussi avec les organelles de stockage de lipides (ladiposomes...) (Goodman *et al.*, 2008) ou avec les autophagosomes et les lysosomes (Sakai *et al.*, 2006).

5.1 Interaction peroxysome - mitochondrie

La mitochondrie et le peroxysome sont deux organelles essentielles pour les cellules des mammifères. Bien que des différences évidentes existent entre ces deux organelles, ceux-ci montrent des similitudes morphologiques et fonctionnelles (métabolisme des AG, ERO..). Ces organelles fortement dynamiques partagent certains composants de leurs machines de division. Les mitochondries et les peroxysomes sont des organelles métaboliquement liées (β -oxydation des acides gras) qui coopèrent et communiquent (Schrader & Yoon, 2007). Dans la voie de la β -oxydation, l'ester de l'acylcarnitine transporte les métabolites de la β -oxydation peroxysomale du peroxysome vers la mitochondrie. L'ATP synthétisé dans la mitochondrie est transporté dans le peroxysome pour générer l'acyl-CoA à chaîne moyenne (Schrader & Yoon, 2007). Plus récemment, une voie vésiculaire de transport des mitochondries aux peroxysomes a été identifiée. Les vésicules dérivées de la mitochondrie (MDVs pour « Mitochondria-derived vesicles ») contiennent une protéine qui a un domaine RING et qui est considérée comme une protéine mitochondriale d'ancrage (MAPL pour mitochondria-anchored protein ligase). Ces vésicules peuvent fusionner avec les peroxysomes (Neuspiel *et al.*, 2008). Les MDVs peuvent être produites par les mitochondries suite à une surexpression de MAPL, mais leur biogenèse est indépendante de MAPL ou de la DRP1 (« Dynamin-related Protein 1 ») qui est un facteur de fission commun entre la mitochondrie et le peroxysome. Ces nouvelles vésicules pourraient être impliquées dans le transport de protéines, de lipides ou de métabolites des mitochondries vers le peroxysome (Thoms *et al.*, 2009). Schumann et Subramani ont proposé un modèle récapitulant les différentes voies d'échanges des métabolites, protéines ou lipides entre la mitochondrie et le peroxysome (Schumann & Subramani, 2008) (Figure 12).

PPAR α est un activateur des facteurs de transcription impliqués dans l'expression des certaines enzymes de la β -oxydation peroxysomale et mitochondriale et dans la prolifération peroxysomale. Certains ligands pharmacologiques de PPAR α induisent la prolifération des peroxysomes et de la mitochondrie chez les rongeurs (Thoms *et al.*, 2009). Certains facteurs de fission sont partagés entre

les mitochondries et les peroxysomes. DRP1 (Dnm1 chez la levure) et Fis1 sont des facteurs moléculaires qui règlent la fission des deux organelles. Ils sont localisés dans les mitochondries et les peroxysomes. L'adressage de Fis1 aux membranes peroxysomales ou mitochondriales semble suivre des mécanismes indépendants, mais il pourrait y avoir une concurrence entre les mitochondries et les peroxysomes pour DRP1 et Fis1 (Thoms *et al.*, 2009).

Chez les souris déficientes en Pex5, l'absence d'un peroxysome fonctionnel est associé à une formation des mitochondries avec des altérations ultrastructurales et fonctionnelles sévères (Baumgart *et al.*, 2001).

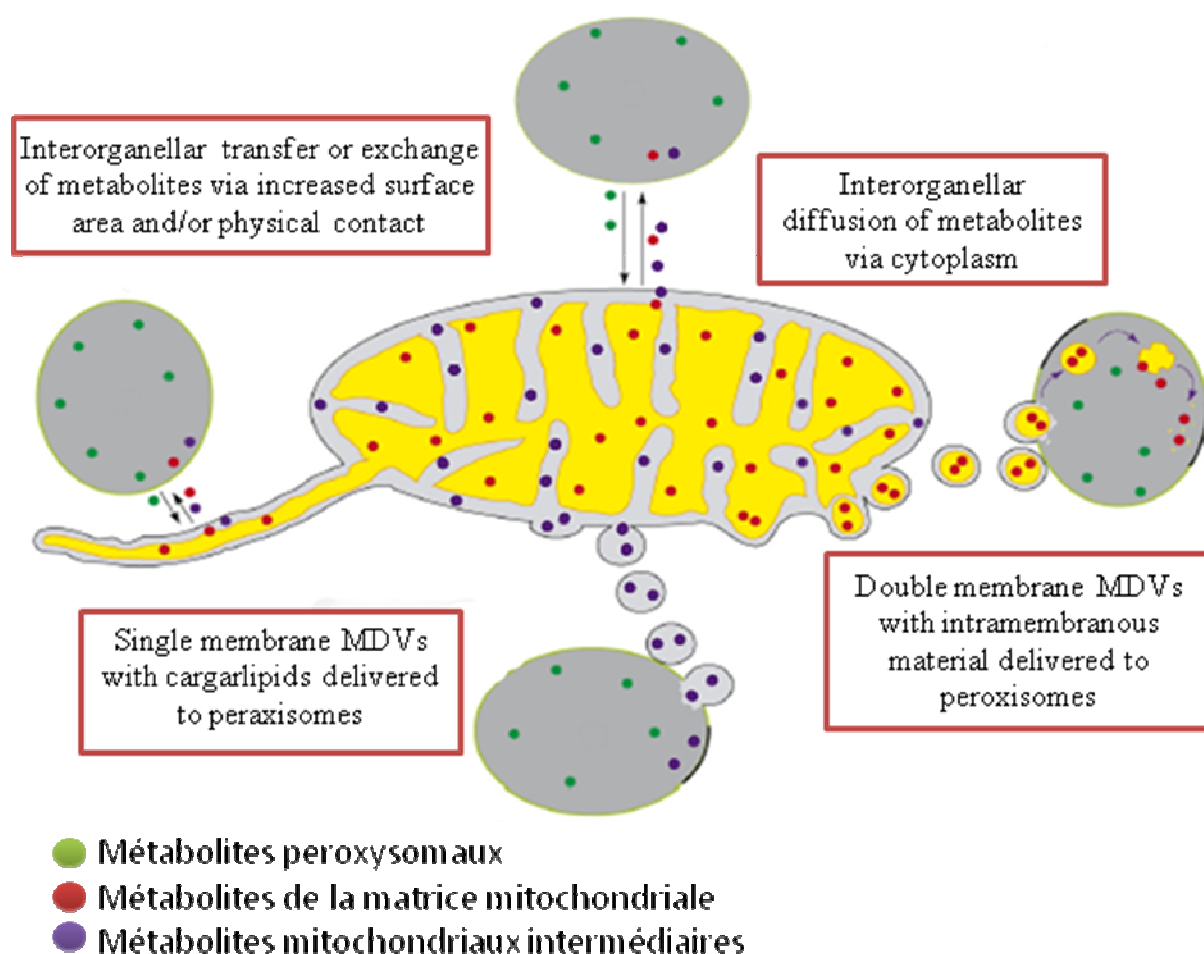


Figure 12 : Echange entre peroxysome et mitochondrie (Schumann & Subramani, 2008).

Le transfert des métabolites ou des cofacteurs entre les compartiments peut se produire par diffusion ou par des transporteurs sans exiger le contact physique ou par des mécanismes qui impliquent le transport par des vésicules. Des métabolites peuvent être échangés entre ces compartiments par la diffusion ou par des détachements de vésicules mitochondriales.

5.2 Interaction peroxysome – réticulum endoplasmique

Certaines études suggèrent que le réticulum endoplasmique (RE) contribue à la formation des peroxysomes, en particulier en donnant les lipides nécessaires à la formation de la membrane peroxysomale. De ce fait, certains classent les peroxysomes comme une organelle issue du RE (Novikoff & Shin, 1964; Titorenko & Rachubinski, 1998; Mullen *et al.*, 2001; Hoepfner *et al.*, 2005).

Chez les levures, certaines peroxines comme Pex2, Pex3, Pex16 atteignent le peroxysome après passage par le RE. Les peroxysomes dérivent du RE *via* un mécanisme qui est dépendant de Pex19 (Hoepfner *et al.*, 2005). Chez l'homme, Pex16 atteint aussi le peroxysome *via* le RE (Kim *et al.*, 2006). Dans les hépatocytes dépourvus de peroxysomes, une prolifération de RE a été observée ainsi qu'une surexpression de cytochrome P450 (enzyme CYP4A1) (Dirkx *et al.*, 2005).

III Maladies peroxysomales

Les maladies peroxysomales constituent une famille de maladies héréditaires rares mais sévères. On distingue deux groupes de maladies peroxysomales ([Wanders & Waterham, 2006b](#)) :

- Les maladies liées à la biogenèse du peroxysome (syndrome de Zellweger, RCDP1...).
- Les maladies liées à une mono ou multi-déficiences de protéines peroxysomales, parmi lesquelles figurent l’X-ALD et la P-NALD.

1 L’adrénoleucodystrophie liée au chromosome X (X-ALD)

Le premier cas de patient atteint d’X-ALD a été décrit en 1910 par Haberland et Spieler ([Moser, 1997](#)). Ce n’est qu’en 1970 que Blaw donna le nom d’Adrenoleucodystrophie à cette maladie : Adréno pour glande surrénale, leuco pour la substance blanche du système nerveux qui est atteint lors de la maladie et dystrophie signifiant croissance ou développement anormal ([Moser, 1997](#)).

1.1 Origine génétique de l’X-ALD et transporteurs ABCDs

L’X-ALD (OMIM 300100) ([Berger & Gärtner, 2006](#)), la plus fréquente des maladies peroxysomales (1/17000), est une maladie génétique rare à transmission autosomique récessive. Elle touche essentiellement les enfants de sexe masculin. L’X-ALD a pour origine une ou plusieurs mutations du gène *ABCD1*, localisé sur le chromosome X au niveau du locus q28. Ce gène code pour un hémitransporteur ABC (ATP-binding cassette) de la sous famille D localisé au niveau de la membrane peroxysomale, l’ALDP (Adrenoleukodystrophy Protein) ([Mosser et al., 1993](#)). *ABCD1* est un gène de 19,9 Kb qui contient 10 exons et code pour l’ALDP comprenant 745 acides aminés et dont le poids moléculaire est de 75 KDa. L’ALDP contient six domaines transmembranaires. La partie NH₂ terminale qui fixe un ATP est intra-peroxysomale. A ce jour, 1096 mutations du gène codant pour l’ALDP ont été identifiées conduisant dans la plupart des cas à une absence de cette protéine (www.X-ALD.nl). Actuellement, aucune relation génotype-phénotype n’a été mise en évidence chez les malades atteints d’X-ALD ([Smith et al., 1999](#)).

La famille de transporteurs ABCD est constituée de 4 hémi-transporteurs dont 3 (*ABCD1*, *ABCD2*, *ABCD3*) sont peroxysomaux ([Kemp & Wanders, 2007](#)) et dont le quatrième a été localisé dans le réticulum endoplasmique ([kashiwayama et al., 2009](#)).

- *ABCD2* code pour une protéine nommée Adrenoleucodystrophy related Protein (ALDRP) présentant 66% d’identité avec l’ALDP.

- ABCD3 code pour une protéine de 70 kDa nommée PMP70 présentant 49% d'homologie avec ABCD1.

Ces hémi-transporteurs sont synthétisés dans le cytosol puis transportés dans le peroxysome *via* la protéine PEX19 (Halbach *et al.*, 2005). Un transporteur ABCD est constitué de deux hémi-transporteurs : ALDP (ABCD1) peut s'homodimériser ou s'hétérodimériser en s'associant soit avec ALDRP (ABCD2) ou PMP70 (ABCD3) pour constituer un transporteur fonctionnel (Berger & Gärtner, 2006). Au niveau du système nerveux central, ALDP est surtout exprimée par les oligodendrocytes, les astrocytes et les cellules endothéliales; elle est faiblement exprimée par les neurones (Ferrer *et al.*, 2010).

1.2 Fonctions biochimiques du transporteur ALDP

L'ALDP est un hémi-transporteur potentiel des AGTLC (C>22) - activés sous forme d'AGTLC-CoA – du cytosol à l'intérieur du peroxysome (Kemp & Wanders, 2010; Van roermund *et al.*, 2008; Ofman *et al.*, 2010). La déficience en ALDP conduit à une diminution de la β -oxydation peroxysomale des AGTLC et à une synthèse accrue de ces derniers (Kemp *et al.*, 2005) avec pour conséquence une accumulation plasmatique et tissulaire des AGTLC saturés (acide lignocérique (C24:0); acide cérotique (C26:0)) et mono-insaturés (C26:1) en particulier dans la substance blanche du cerveau, les testicules et le cortex surrénalien (Berger & Gärtner, 2006). Cette accumulation d'AGTLC conduit à une augmentation du rapport C26:0/C22:0 qui constitue aussi un critère de caractérisation de l'X-ALD. Les AGTLC s'accumulent sous forme d'esters de cholestérol, s'intègrent dans les phospholipides ou les gangliosides. Au niveau du SNC, les AGTLC s'accumulent dans la myéline, notamment en interagissant avec la Protéolipide Protéine (PLP), mais aussi en s'intégrant dans les phosphatidylcholines et lysophosphatidylcholines du cerveau (Igarashi *et al.*, 1976; Kemp & Wanders, 2010; Ferrer *et al.*, 2010; Singh & Pujol, 2010).

Dans l'organisme, ces AGTLC ont deux origines 1) source alimentaire (source mineure), 2) élongation des AG à moyenne chaîne dans l'organisme (source majeure) (Kemp & Wanders, 2010). Kemp *et al.* ont montré que l'élongation d'AGTLC dans les fibroblastes des patients atteints d'X-ALD est augmentée (Kemp *et al.*, 2005). Les C24:0 et C26:0 sont synthétisés par une réaction d'élongation à deux étapes : la première consiste à synthétiser des C18:0-C22:0 grâce à l'élongase ELOVL6 (Elongation of Very-Long Chain Fatty Acids) ; la seconde consiste à synthétiser les C24:0 et C26:0 à partir des produits de la première étape grâce à l'élongase ELOV1 (Ofman *et al.*, 2010).

1.3 Formes cliniques de l'X-ALD

L'X-ALD est une pathologie neuro-métabolique inflammatoire. L'X-ALD provoque une dégénérescence progressive du SNC ou du SNP. Au niveau clinique, une grande variabilité phénotypique a été observée. Il existe 2 phénotypes cliniques principaux : 1) la forme cérébrale infantile (35% de cas) ou CCALD, caractérisée par une démyélinisation inflammatoire progressive du système nerveux central qui se manifeste entre 4 et 8 ans ; 2) l'adrénomyélonéuropathie (AMN), démyélinisation périphérique non inflammatoire, qui se manifeste à l'âge adulte par une paralysie de degré variable mais évolue vers une paraplégie spastique et mauvais des membres inférieurs représentant environ 45% des cas. 70% des patients atteints de l'X-ALD développe une insuffisance adrénocorticale précoce même avant l'apparition des premiers symptômes neurologiques. Certains parmi ces patients ne développent jamais des signes neurologiques, juste une atteinte des glandes corticosurrénales, connus sous le nom de maladie d'Addison (atteinte des glandes corticosurrénales) constituant 10-20% des cas (Berger *et al.*, 2010). Néanmoins, d'autres formes moins fréquentes existent (Berger & Gartner, 2006; Aubourg, 2007) (Tableau 4).

Formes cliniques d'adrénoleucodystrophies liées au chromosome X	
Chez l'homme	- Formes cérébrales démyélinisantes inflammatoires (CCALD ; 5-12 ans) - Formes cérébrales démyélinisantes non inflammatoires (ACALD ; 10-15 ans) - Adrénomyélonéuropathie (AMN ; 20-60 ans) - Adrénomyélonéuropathie compliquée d'une atteinte cérébrale démyélinisante inflammatoire (AMN ; 20-45 ans) - Insuffisance surrénale périphérique (maladie d'Addison ; 5-40 ans) - Insuffisance gonadotrope (testiculaire) : > 20 ans
Chez la femme	- Adrénomyélonéuropathie (AMN)

Tableau 4 : Différentes formes cliniques d'X-ALD.

L'absence d'une relation génotype-phénotype apparente suggère l'intervention de différents gènes modificateurs et/ou de facteurs environnementaux ou épigénétiques dans l'évolution clinique de la maladie (Dubois-Dalcq *et al.*, 1999; Moser *et al.*, 2004). Parmi les facteurs pouvant contribuer au déclenchement de l'X-ALD figurent des infections virales, qui peuvent initier l'inflammation dans le SNC, d'autres transporteurs ABCDs (Berger & Gartner, 2006), le niveau de plasmalogène (Brites *et al.*, 2009) et les traumatismes crâniens (Raymond *et al.*, 2010).

1.4 Caractérisation des lésions d'X-ALD

La forme la plus sévère de l'X-ALD est la forme infantile qui se caractérise par un phénomène de démyélinisation inflammatoire. La myéline, synthétisée par les oligodendrocytes, est un complexe lipoprotéique composé de 70% de lipides et 30% de protéines. La myéline sert à protéger les axones et à les isoler électriquement, permettant ainsi la bonne conduction de l'influx nerveux. Dans le processus inflammatoire, au niveau des lésions, on observe une augmentation de l'expression de cytokines inflammatoires (notamment de $\text{TNF}\alpha$ et $\text{IL-1}\beta$), de NO synthase inducible (iNOS) et une accumulation d'espèces réactives de l'oxygène (ERO) et de monoxyde d'azote (NO) (Powers *et al.*, 1992; Vargas *et al.*, 2004). L'accumulation d'AGTLC dans le cerveau de patients atteints d'X-ALD provoque aussi l'accumulation de certains médiateurs d'inflammation comme les leucotriènes (Khan *et al.*, 2010). Ces différents événements peuvent contribuer à la déstabilisation de la gaine de myéline (Hudspeth & Raymond, 2007).

Singh et Pujol (Sing & Pujol, 2010) ont proposé un scénario faisant intervenir trois événements majeurs permettant d'expliquer l'évolution des lésions de l'X-ALD (Figure 13). Dans ce scénario, le stress oxydant conduirait à l'initiation de réactions inflammatoires aboutissant à la démyélinisation. Ainsi, l'excès d'AGTLC et la diminution du taux de plasmalogènes provoqueraient la rupture de l'équilibre RedOx et par conséquent l'augmentation du stress oxydant (1^{ère} événement), ce qui provoquerait une inflammation (2^{ème} événement) avec l'intervention de facteurs environnementaux, génétiques ou épigénétiques. Ultérieurement, les cytokines et les médiateurs d'inflammation provoqueraient une perte généralisée de fonctions peroxisomales (3^{ème} événement), créant un cercle vicieux ayant pour conséquence la mort cellulaire et l'initiation de la démyélinisation inflammatoire du SNC (Sing & Pujol, 2010).

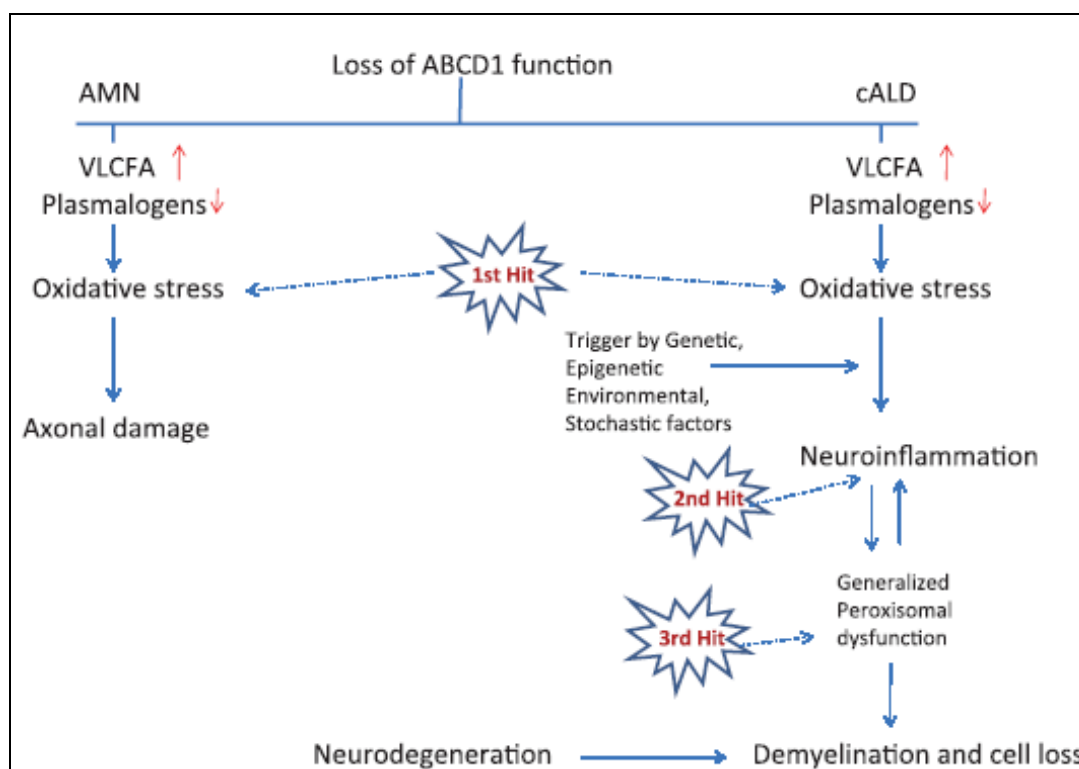


Figure 13 : Hypothèse sur la physiopathologie de l’X-ALD impliquant le stress oxydant comme facteur déclenchant (Sing & Pujol, 2010).

1.5 Diagnostique de l’X-ALD

Les observations cliniques, les techniques d’imagerie (IRM) et les analyses biochimiques permettent de diagnostiquer l’X-ALD. Les premiers signes cliniques sont des troubles du comportement, une perte des capacités intellectuelles, une diminution de la vision et de l’ouïe... L’imagerie cérébrale permet d’identifier d’éventuelles lésions au niveau de la substance blanche. Le dosage des AGTLC (C24:0, C26:0) et leur pourcentage par rapport au C22:0 dans le plasma constituent la technique de référence pour diagnostiquer l’X-ALD (Valianpour *et al.*, 2003). L’analyse biochimique permet d’identifier 100% des garçons ou hommes atteints d’X-ALD et 80-95% des femmes porteuses de l’anomalie génétique. Les analyses de biologie moléculaire permettent d’identifier les mutations du gène *ABCD1* (Boehm *et al.*, 1999; Lachtermacher *et al.*, 2000). Le dépistage prénatal sont proposés aux femmes enceintes porteuses hétérozygotes ou dont le père est atteint par l’une des formes de l’X-ALD (Berger & Gärtner, 2006; Aubourg, 2007). Le dépistage néonatal de l’adrénoleucodystrophie liée au chromosome X (X-ALD) a jusqu’à présent été limité en raison de la manque de mise en œuvre d’une méthodologie de référence standardisée. Récemment, une nouvelle technique développée au « Kennedy Krieger Institute » consiste à doser le C26:0 incorporé dans les lysophosphatidylcholines à partir de dépôts de sang séché par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en mode MS/MS (Hubbard *et al.*, 2009). Cette technique pourrait fournir la

base pour le dépistage des nouveau-nés atteints d'X-ALD dans des laboratoires très spécialisés (Hubbard *et al.*, 2009).

1.6 Traitement de l'X-ALD

Le traitement de l'X-ALD commence par la prise en charge psychologique et médicale du patient et de ses proches. Plusieurs approches pour traiter l'X-ALD ont été proposées. Des traitements stéroïdiens ont été utilisés pour corriger l'insuffisance surrénale chez les patients atteints de la maladie d'Addison (Ferrer *et al.*, 2010). Un régime alimentaire dépourvu en AGTLC avec administration de l'huile de Lorenzo (un mélange d'acide oléique et d'acide érucique) permet de normaliser le taux plasmatique d'AGTLC en inhibant la synthèse endogène de ces acides gras. L'administration précoce de l'huile de Lorenzo ne fait que retarder l'apparition des signes neurologiques de la maladie (Moser *et al.*, 2005). La greffe allogénique de moelle osseuse (transplantation des cellules souches hématopoïétiques) est le seul traitement qui permet de stabiliser ou de faire régresser les lésions cérébrales de démyélinisation à condition que la greffe soit effectuée au tout début de la maladie (Peters *et al.*, 2004; Shapiro *et al.*, 2000). Plus récemment, Cartier *et al.* ont testé avec succès une technique de thérapie génique consistant à introduire le gène défectueux dans un rétrovirus de type VIH pour le faire exprimer par les cellules souches du malade quand elles sont réintroduites dans son organisme. Cette technique a permis un arrêt total de la progression de démyélinisation cérébrale chez les deux patients traités (Cartier *et al.*, 2009). D'autres approches pharmacologiques envisagent de stimuler l'expression d'*ABCD2*, qui présente une redondance fonctionnelle avec *ABCD1* (Berger *et al.*, 2010).

2 La Pseudo-adrénoleucodystrophie néonatale P-NALD

La pseudo-adrénoleucodystrophie néonatale (P-NALD) (OMIM264470), est une maladie génétique, neurodégénérative, provoquée par la suppression/mutations d'*ACOX1*. La déficience en *ACOX1* résulte soit 1) d'une large délétion qui provoque l'absence de l'enzyme, 2) soit de mutations ponctuelles conduisant à l'absence de l'enzyme ou à la synthèse d'une enzyme non fonctionnelle (Ferdinandusse *et al.*, 2007). Les patients P-NALD sont caractérisés par une neurodégénérescence précoce du SNC, une hypotonie et des désordres moteurs importants (Wanders *et al.*, 2010). Ils présentent aussi une régression de développement du SNC et décèdent vers l'âge de 5 ans (Wanders *et al.*, 2010; Ferdinandusse *et al.*, 2010). Récemment, deux cas des personnes âgées présentant des déficiences en *ACOX1* ont été identifiés. Ces patients présentent une accumulation plasmatique

d'AGTLC mais un taux de DHA (C22:6 ω 3) normal avec des symptômes neurologiques atténués par rapport à la P-NALD (Ferdinandusse *et al.*, 2010). L'imagerie cérébrale par résonance magnétique a montré une atrophie profonde du tronc cérébral et le cervelet, et une atrophie cérébrale modeste. la conduction nerveuse est normale (Ferdinandusse *et al.*, 2010).

L'*ACOX1* est un gène qui code pour l'enzyme contrôlant la première étape limitante de la β -oxydation des AGTLC (Fournier *et al.*, 1994). Chez l'Homme, le gène *ACOX1* est localisé sur le chromosome 17 (17q25), il est constitué de 15 exons et 14 introns avec deux exons 3 nommés exon 3a et 3b. L'épissage alternatif de pré-ARNm donne lieu à deux ARNm matures et par conséquent à deux isoformes d'*ACOX1* : *ACOX1a* et *ACOX1b*. Chaque ARNm code pour une protéine de 72 kDa (660 acides aminés), qui contient au niveau C-terminal un signal d'adressage peroxysomal : «S/K/L» (Varanasi *et al.*, 1994). L'activité *ACOX1* provoque la production d'énoyl-CoA et le peroxyde d'hydrogène (Wanders *et al.*, 2010). Au niveau biochimique, la déficience en *ACOX1* résulte en une accumulation d'AGTLC saturés et en une déficience en acide docosahexaénoïque (DHA), mais n'a pas d'effet sur le métabolisme des acides gras branchés et des acides biliaires (Oaxaca-Castillo *et al.*, 2007; Kemp & Wanders, 2007). Les souris *Acox1*^{-/-} présentent aussi une accumulation d'AGTLC dans le sérum dès l'âge de 2 à 4 mois (Fan *et al.*, 1996a). Chez la souris, l'absence du gène *Acox1* conduit au développement d'une stéatose microvasculaire au niveau hépatique et à une accumulation du peroxyde d'hydrogène, ainsi qu'à une prolifération peroxisomale massive dans les hépatocytes (Vluggens *et al.*, 2010).

Dans des conditions physiologiques normales, l'expression du gène de l'*ACOX1* peut être régulée par des proliférateurs de peroxysomes (PPARs : peroxisome proliferator activated receptors) en particulier des PPAR α (Wahli *et al.*, 1995); mais aussi, par des hormones comme la prolactine (PRL) et l'hormone de croissance (GH). La GH et la PRL sont des activateurs potentiels de STAT5 et exercent une variété d'effets sur l'expression des gènes adipocytaires (Coulter *et al.*, 2006).

IV Mort cellulaire

Perpétuellement, au niveau des tissus, les cellules se multiplient, se divisent ou meurent ([Amon & Tyers, 2009](#)).

La mort cellulaire est un processus fondamental, elle participe au maintien de l'homéostasie cellulaire et tissulaire, au développement et à la différenciation cellulaire. Par ailleurs, la mort cellulaire intervient dans de nombreuses maladies (maladies neurodégénératives, maladies auto-immunes, maladies virales, cancers...) ([Thompson, 1995](#); [Geng & Libby, 1995](#)). La capacité de moduler la vie et la mort d'une cellule représente un immense potentiel thérapeutique.

Trois principaux types de mort cellulaire ([Figure 14](#)) sont décrits, reposant sur des critères morphologiques et biochimiques ([Boya & Kroemer, 2008](#)):

-  Type 1 : l'apoptose
-  Type 2 : l'autophagie
-  Type 3 : la nécrose/oncose

Plusieurs autres types de mort cellulaire dérivant de ces trois principaux types sont recensés :

-  La catastrophe mitotique : est une forme aberrante de mitose associée à des changements morphologiques typiques mais biochimiquement variables ([Vakifahmetoglu et al., 2008](#); [Kroemer et al., 2008](#)).
-  L'anoïkis : correspond à de l'apoptose associée à une perte d'attachement des cellules à la matrice extracellulaire ([Gilmore, 2005](#); [Kroemer et al., 2008](#)).
-  L'excitotoxicité : il s'agit d'une forme de mort cellulaire survenant dans les neurones provoquée par le glutamate, qui conduit à l'ouverture de canaux calcique (la N-méthyl-D-aspartate), suivie par une surcharge de calcium cytosolique et l'activation des voies de signalisation conduisant à la mort cellulaire ([Orrenius et al., 2003](#); [Kroemer et al., 2008](#)).
-  La paraptose : ce terme a été introduit pour décrire une forme de mort cellulaire programmée, morphologiquement et biochimiquement distincte de l'apoptose. Dans plusieurs types de cellules, la paraptose est déclenchée par l'expression du récepteur du facteur de croissance insulín-like I, et elle est associée à une vacuolisation cytoplasmique prononcée et à un gonflement mitochondrial, sans les autres marques morphologiques distinctives de l'apoptose ([Sperandio et al., 2000](#); [Kroemer et al., 2008](#)).

- 🚧 La pyroptose : cette mort a d'abord été décrite dans les macrophages infectés par *Salmonella typhimurium* ; elle implique l'activation de la caspase-1 (mais pas de la caspase-3), une protéase qui est surtout connu comme enzyme de conversion de l'interleukine-1 β (IL-1 β) (Fink & Cookson, 2005; Kroemer *et al.*, 2008).
- 🚧 La pyronécrose : cette mort cellulaire est une forme de nécrose des macrophages infectés par *Salmonella flexneri* à concentration élevée. Elle est associée à la libération de HMGB-1 (High-mobility group protein (Willingham *et al.*, 2007; Kroemer *et al.*, 2008).
- 🚧 L'entose : initialement décrite comme une forme de « cannibalisme cellulaire » dans les lymphoblastes de patients atteints de la maladie de Huntington. Il s'agit d'un processus au cours duquel une cellule va s'engouffrer dans une cellule voisine vivante et provoquer sa mort (Mormone *et al.*, 2006; Kroemer *et al.*, 2008).
- 🚧 La dégénérescence Wallérienne : il ne s'agit pas d'une mort à proprement parler, mais plutôt d'une forme de catabolisme cellulaire au sein du système nerveux. Au cours de phénomène, une partie d'un neurone ou de l'axone va dégénérer, sans que cela n'affecte le reste du corps cellulaire (Raff *et al.*, 2002; Kroemer *et al.*, 2008).

La classification de la mort cellulaire est établie à partir des apparences morphologiques, des critères enzymologiques, des aspects fonctionnels et des caractéristiques immunologiques (Lizard *et al.*, 1995; Melino, 2001; Kroemer *et al.*, 2009). La mort cellulaire est réversible jusqu'à un point de non retour qui est considéré comme étant la chute de potentiel transmembranaire mitochondriale ($\Delta\Psi_m$) (Green & Kroemer, 1998). Plusieurs autres propositions ont été faites pour définir cette irréversibilité: activation massive des caspases (Cohen, 1997) ou externalisation des phosphatidylsérines (Green & Kroemer, 2004).

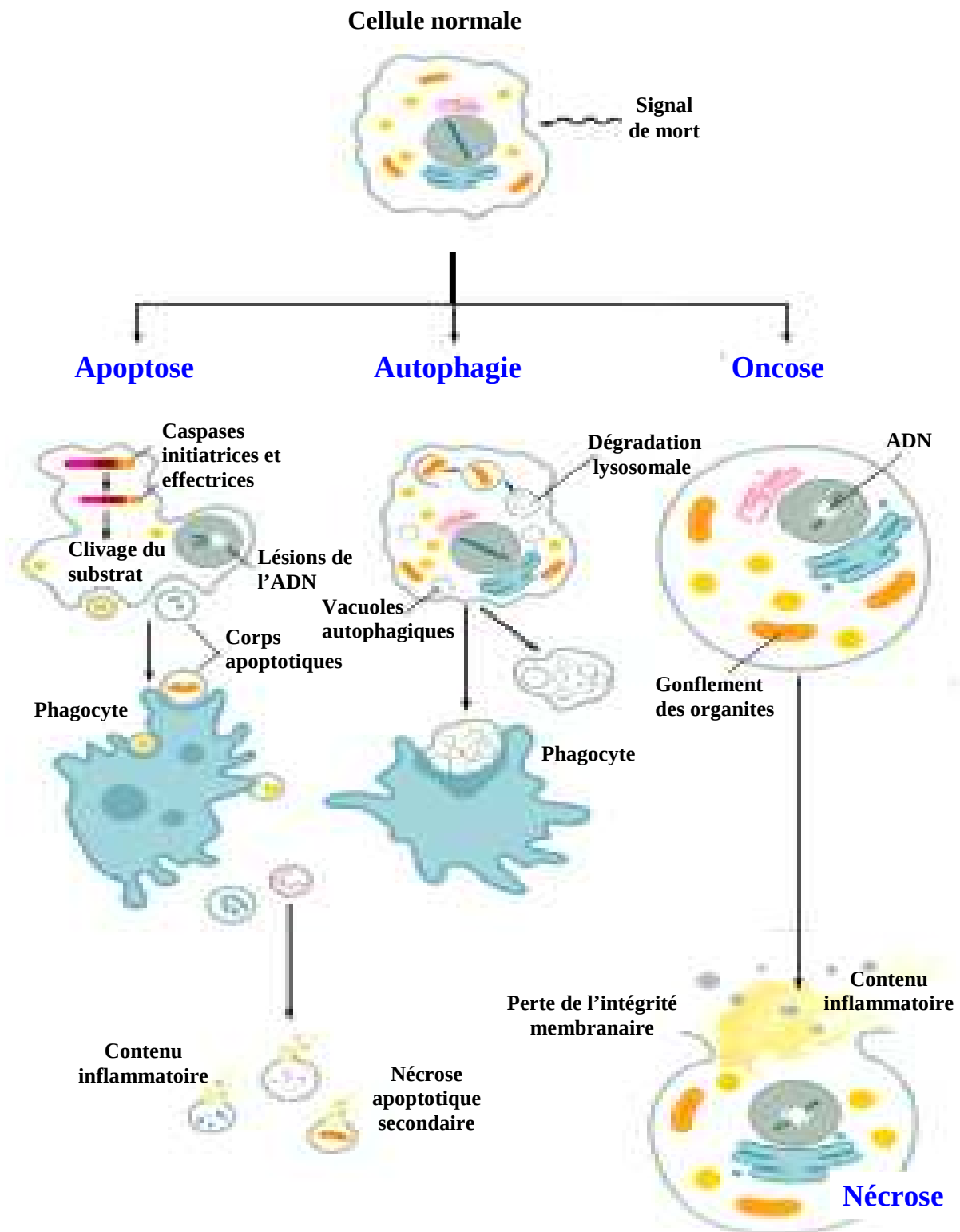


Figure 14 : Différentes voies conduisant à la mort cellulaire (Fink & Cookson, 2005).

1 Apoptose

Le terme apoptose, d'origine grecque, désigne la chute des feuilles d'un arbre en automne. Il a été proposé par Kerr et al. en 1972 pour décrire la mort programmée dans l'organisme qui survient dans certains organes au cours de l'ontogenèse. L'apoptose est un mécanisme de mort intervenant dans plusieurs processus physiologiques (embryogenèse, développement normal des organes,...) et pathologiques. Ce mécanisme peut être activé (SIDA, maladie d'Alzheimer...) ou inhibé (Cancers...) (Meier *et al.*, 2000). L'apoptose se caractérise par des aspects morphologiques spécifiques la distinguant des autres types de mort : nécrose/oncose, autophagie... . La mort cellulaire par apoptose est rapide et n'entraîne en général ni lésion, ni inflammation, contrairement à la nécrose (Figure 14).

Morphologiquement, l'apoptose se définit par la diminution du volume cellulaire, le maintien de l'intégrité membranaire, la condensation de la chromatine, la fragmentation nucléaire (Figure 15). Les organelles cytoplasmiques sont peu ou pas modifiées structuralement au cours de l'apoptose (Kroemer *et al.*, 2009). La condensation nucléaire est accompagnée d'une dégradation spécifique de l'ADN en nucléotides de 50 à 300 kb résultant de l'excision des boucles d'ADN et de leurs oligomères (Lagarkova *et al.*, 1995), suivie ou non d'une multiples fragmentation internucléosomale de 180-200 pb, donnant un profil électrophorétique caractéristique « en échelle » sur gel d'agarose (Wyllie *et al.*, 1980).

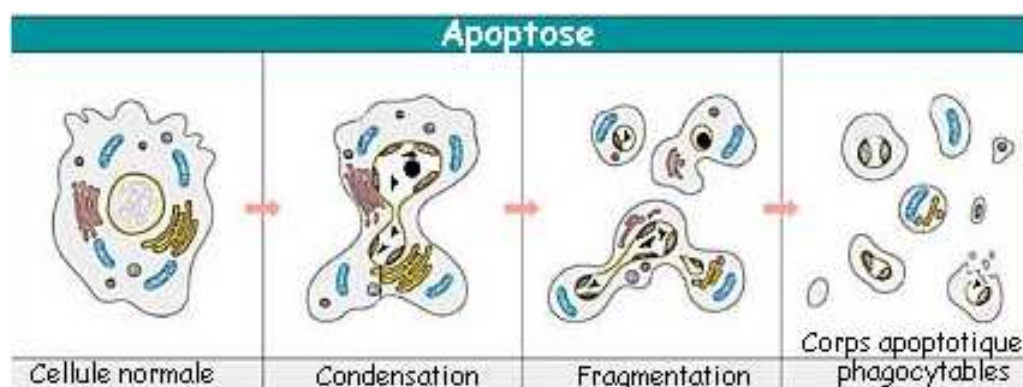


Figure 15 : Chronologie et morphologie de l'apoptose

Plusieurs sous-types d'apoptose sont décrits. Ils présentent des caractéristiques morphologiques identiques mais des diversités biochimiques et fonctionnelles importantes. Ces diversités sont associées à l'activation de plusieurs voies extrinsèques avec implication ou non de la mitochondrie (voies des récepteurs à domaines de mort) ou intrinsèques (voie mitochondriale) (Kroemer *et al.*, 2009). La voie des récepteurs à domaines de mort inclue la superfamille du TNF (tumor necrosis

factor) qui conduit à l'activation des caspases. Les voies initiées par un stress cellulaire (xénobiotiques, agents physiques, radiations....), le stress de réticulum endoplasmique et la protéine P53 conduisent à l'activation de la voie intrinsèque.

La voie des récepteurs à domaine de mort fait intervenir des récepteurs de la membrane cytoplasmique qui, après fixation à leurs ligands spécifiques, déclenchent rapidement les mécanismes moléculaires conduisant à l'apoptose (Kitanaka & Kuchino, 1999).

Des nombreuses voies apoptotiques (telles que celles déclenchées par des xénobiotiques) convergent vers la mitochondrie et entraînent, suite à la chute du potentiel mitochondrial transmembranaire ($\Delta\Psi_m$), la perméabilité des membranes mitochondriales, qui est à l'origine de la libération de protéines pro-apoptotiques de l'espace intermembranaire mitochondriale vers le cytosol (Cytochrome c, AIF, Smac /Diablo, Omi/HtrA2, endonucléase G) (Ferri & Kroemer, 2001). La voie mitochondriale est une voie complexe qui permet d'induire l'apoptose cellulaire de façon dépendante ou indépendante des caspases (Figure 16). La mitochondrie est impliquée à la fois dans l'apoptose et dans la nécrose en fonction de la sévérité des dommages infligés à cette organelle (Beal, 2000).

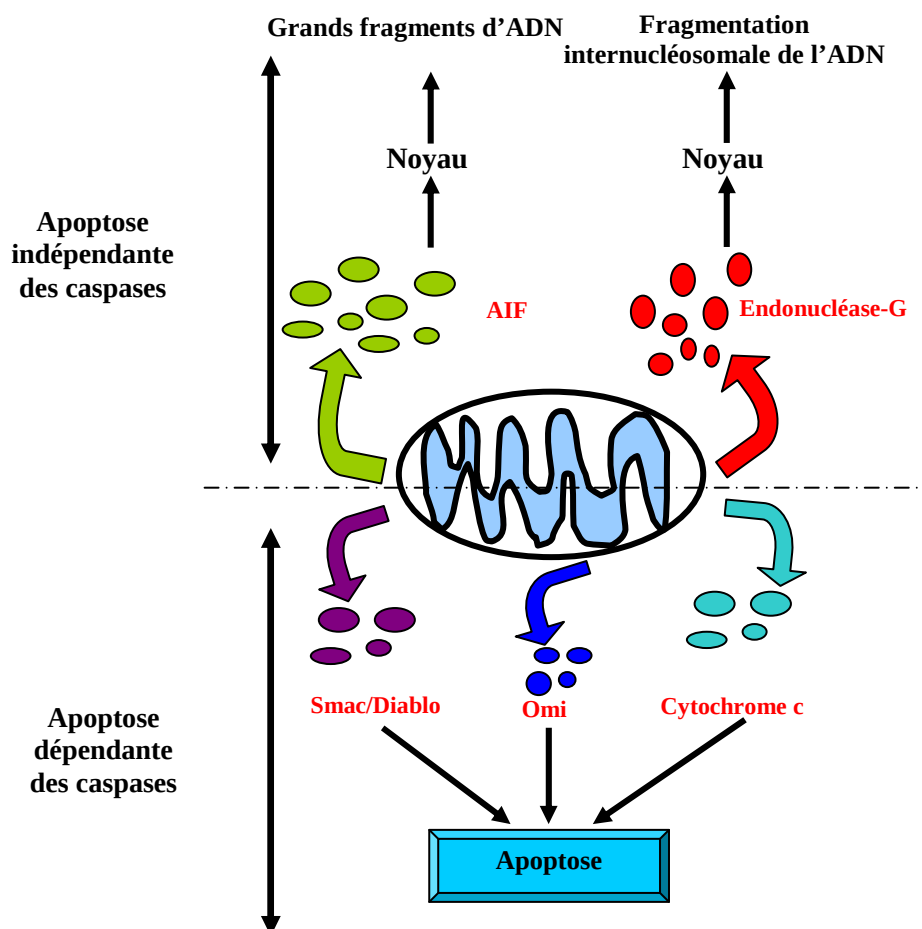


Figure 16 : Molécules relarguées par la mitochondrie au cours de la mort cellulaire par apoptose. (AIF : Apoptosis Inducing Factor; Smac/Diablo : Second Mitochondria-derived Activator of Caspase/ Direct IAP-Binding protein with Low pI) (synthétisée à partir de : [Liu et al., 1996](#); [Susin et al., 1999](#); [Chai et al., 2000](#); [Faccio et al., 2000](#); [Parrish et al., 2001](#))

2 Nécrose/Oncose

L'oncose, dérivée du mot « onkos » qui signifie « gonflement », est définie comme une voie pré-létale menant à la mort cellulaire accompagnée par un gonflement de la cellule et des organites, et à une augmentation de la perméabilité de la membrane cytoplasmique sans condensation de la chromatine ([Figure 14 et Figure 17](#)). La nécrose est aussi associée à une réaction inflammatoire se développant dans le tissu adjacent en réponse à la libération de débris cellulaires activant les macrophages ([Fink & Cookson, 2005](#)) ([Figure 14 et Figure 17](#)). La nécrose a été considérée comme une mort cellulaire non contrôlée, mais des voies de transduction de signaux pourraient être impliquées (Fas/CD95, TLR3, TLR4....) ([Kroemer et al., 2009](#)). Les phénomènes de nécrose/oncose conduisent à une déplétion des réserves énergétiques de la cellule et à un arrêt des pompes ioniques dans la membrane cytoplasmique. La nécrose/oncose peut résulter de l'action d'agents toxiques qui

interfèrent avec la production d'ATP ou de processus qui provoquent une consommation non-contrôlée des énergies cellulaires (Majno & Joris, 1995).

Plusieurs organelles cellulaires sont impliquées dans la mort cellulaire par nécrose/oncose : la mitochondrie (chute de $\Delta\Psi_m$, production d'ERO...); le lysosome (perméabilisation de la membrane lysosomale...); le réticulum endoplasmique (relargage de calcium dans le cytosol...). Au niveau biochimique, la nécrose/oncose est associée à une activation des protéases (autres que les caspases : calpaïnes, cathepsines...), à une dégradation des lipides *via* l'activation des phospholipases, des lipoxygénases et/ou des sphingomyélinases (Kroemer *et al.*, 2009).

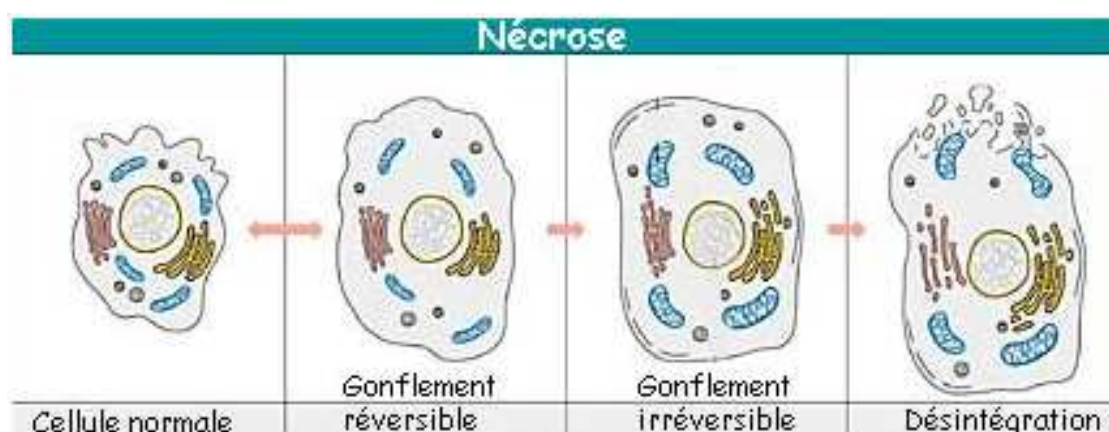


Figure 17 : Chronologie et morphologie de la nécrose

3 Autophagie

L'autophagie est un processus d'auto-dégradation, essentiel pour la survie, la différenciation, le développement et l'homéostasie tissulaire (Kourtis & Tavernarakis, 2009; Levine & Kroemer, 2009). C'est un processus catabolique intralysosomal majeur conservé au cours de l'évolution, pendant lequel les composants cytoplasmiques sont séquestrés de manière non sélective dans des structures formées d'une double membrane (autophagosome) de 300-900 nm de diamètre (Klionsky & Emr, 2000).

L'autophagie joue un rôle dans le renouvellement des protéines, des ARNs, et d'autres macromolécules cytoplasmiques (Munafo & Colombo, 2001). Elle est observée dans certaines pathologies neurodégénératives comme la maladie de Parkinson et la maladie Alzheimer (Stefanis *et al.*, 2001).

Actuellement, trois types d'autophagie ont été décrits : la micro-autophagie, la macro-autophagie et l'autophagie chaperone (Figure 18). Des différences mécanistiques dans les fonctions physiologiques et dans le transport vers le lysosome existent entre ces trois types (Vicencio *et al.*, 2008).

Dans le SNC, le maintien d'un niveau basal d'autophagie est nécessaire pour le bon fonctionnement neuronal. La dérégulation de la macro-autophagie provoque un dysfonctionnement synaptique, un stress cellulaire et la mort des neurones (Chu *et al.*, 2009).

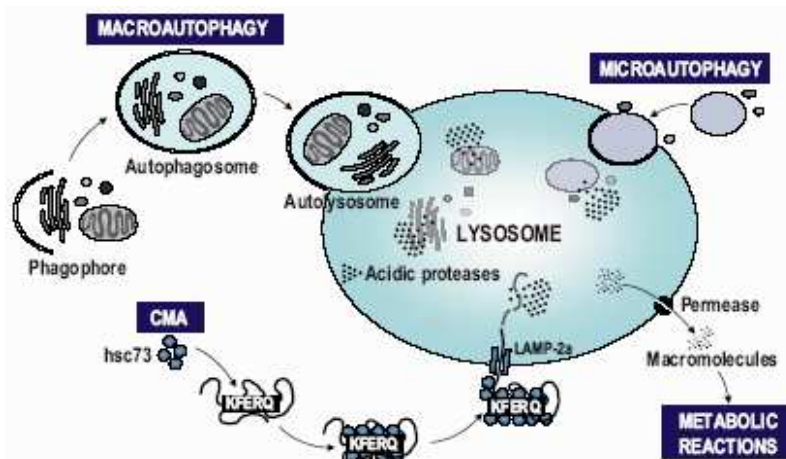


Figure 18 : Différentes formes et mécanismes d'autophagie (Vicencio *et al.*, 2008).

Chez l'Homme, la macro-autophagie débute par la séquestration du matériel cytoplasmique pour former l'autophagosome (Klionsky & Emr, 2000). Ensuite l'autophagosome, qui est composé d'une double membrane provenant d'un repliement du réticulum endoplasmique lisse, fusionne avec les lysosomes pour former une vacuole d'autophagie dans laquelle la dégradation finale du matériel séquestré intervient grâce aux protéases lysosomales (Figure 18) (Bursch, 2001; Vicencio *et al.*, 2008; Kroemer *et al.*, 2009). Dans la micro-autophagie, la membrane lysosomale s'invagine pour séquestrer, au sein des lysosomes, du cytoplasme ou des organites ; au contact des enzymes lysosomales, ces structures séquestrées sont dégradées (Ohsumi, 2001). L'autophagie chaperone est décrite uniquement chez les mammifères, elle est impliquée dans la dégradation des protéines mal repliées ou oxydées (Yamashima & Oikawa, 2009). L'autophagie est définie morphologiquement (microscopie électronique à transmission) par l'absence de condensation de la chromatine associée à une vacuolisation massive du cytoplasme (Kroemer *et al.*, 2009). Chez les mammifères, le processus d'autophagie fait intervenir de nombreuses protéines cellulaires, aussi bien lors de l'étape de séquestration (GTPases (*Guanosine Triphosphate phosphatase*), protéines de la famille Tor (*Target of rapamycin*), P70S6 kinases, protéine phosphatase 2A (PP2A)...) que lors de la formation des autophagosomes (PI3-kinases). Le processus d'autophagie est coordonné par une famille de protéine en particulier : les Atg (Autophagy related proteins) qui contrôlent tout les aspects de la biogenèse des autophagosomes (Figure 6) (Cheng & Lane, 2010). L'Atg8 ou LC3 est une protéine cytoplasmique exprimée sous deux formes LC3-1 (cytosolique) et LC3-II. La forme LC3-II s'intègre dans la membrane autophagosome/autolysosome et le taux de LC3-II est corrélé avec la formation

d'autophagosome qui est un signe d'autophagie. La LC3-II est la première protéine de mammifère identifiée comme protéine associée spécifiquement à la membrane de l'autophagosome (Kabeya *et al.*, 2000). Dans des cellules graisseuses de la drosophile, la surexpression d'Atg1 provoque la mort cellulaire par autophagie avec l'activation de caspases (Scott *et al.*, 2007).

Récemment, la fonction d'autophagie dans la régulation du stockage des lipides a été révélée via un mécanisme appelé macro-lipophagie (Singh *et al.*, 2009a). Dans des conditions de restrictions alimentaire, les gouttelettes lipidiques sont prises en charge par des vacuoles autophagiques ; l'inhibition de l'autophagie dans des hépatocytes en culture ou dans le foie de souris augmente le stockage des triglycérides sous forme de gouttelettes lipidiques (Singh *et al.*, 2009a). Ce phénomène révèle de nouvelles fonctions de l'autophagie dans le métabolisme lipidique, ce qui peut avoir des implications importantes dans les maladies associées à des anomalies de stockage de lipides (Singh *et al.*, 2009a; Singh, 2010).

4 Lysosome et mort cellulaire

Le lysosome est une organelle cellulaire avec une simple membrane qui le sépare du cytoplasme. Les lysosomes ont été découverts en 1949 par de Duve qui les a nommé « suicide bags » (Turk & Turk, 2009). Les lysosomes contiennent plus que 80 hydrolases acides qui jouent un rôle dans la dégradation des protéines, des acides nucléiques, des lipides, des polysaccharides... (Yamashima & Oikawa, 2009). Les lysosomes ont été considérés pendant longtemps comme des organelles de dégradation, mais il est maintenant admis qu'ils jouent des rôles actifs dans plusieurs processus biologiques et en particulier dans la mort cellulaire (Dell'Angelica *et al.*, 2000).

Suite à différents types de stress ou sous l'influence d'inducteurs de mort cellulaire (TNF- α , radicaux oxygénés, certains types de lipides (oxystérols, lysophosphatidylcholine...) ...), la perméabilité de la membrane lysosomale est perturbée (Nilsson *et al.*, 2006; Kurz *et al.*, 2006). La déstabilisation de la membrane lysosomale provoque le relargage de protéases dans le cytoplasme (Repnik & Turk, 2010). Ce phénomène a été décrit dans des cellules normales et tumorales issues de différents organes comme les cellules promonocytaires leucémiques humaines U937 (Prunet *et al.*, 2005), des cellules humaines de tumeurs coliques (Roussi *et al.*, 2007), des cellules épithéliales humaines de rétine ARPE-19 (Malvitte *et al.*, 2008) et des neurones de primates (Yamashima, 2000; Yamashima, 2004; Windelborn & Lipton, 2008). Les enzymes lysosomales constituent une large variété de famille des protéase (cathepsines, nucléases, glycosidases, sulfatases et lipases) qui peuvent dégrader des molécules essentielles pour la cellule et activer d'autres hydrolases comme les caspases et la

DNAase II (Tardy *et al.*, 2006). La relargage des protéases lysosomales, en particulier les cathepsines provoque la mort cellulaire *via* des voies de signalisation aboutissant ou non à l'activation de caspases (Guicciardi *et al.*, 2004). Ces protéases peuvent modifier la perméabilité mitochondriale et provoquer le relargage de molécules mitochondriales contribuant à la mort cellulaire (Cytochrome c, AIF, Endo-G, ...) (Tang *et al.*, 2008). Le facteur qui détermine le type de mort cellulaire dépendant du lysosome est fonction du degré de perméabilisation de ce dernier : une forte perméabilisation aboutirait à une mort par nécrose, alors qu'une plus faible perméabilisation conduirait soit à l'apoptose, soit à l'autophagie ou à une mort cellulaire indépendante des caspases (Guicciardi *et al.*, 2004; Tang *et al.*, 2008) (Figure 19).

Dans des conditions de stress, le lysosome synthétise des radicaux $^{\circ}\text{OH}$, ce qui peut provoquer la rupture de la membrane lysosomale (Terman *et al.*, 2006). Le 4-hydroxy-2-nonenal (4-HNE) est un produit de la peroxydation lipidique, qui réagit avec des protéines lysosomales et peut provoquer leur carbonylation. L'accumulation de ces protéines modifiées par le 4-HNE peut provoquer la rupture de la membrane lysosomale (Marques *et al.*, 2004; Sayre *et al.*, 2006). L'exposition des neurones au 4-HNE favorise leur mort *via* la rupture de la membrane lysosomale (Hwang *et al.*, 2008; Castino *et al.*, 2007). Pour faire face au stress cellulaire, les lipases lysosomales pourraient aussi dégrader les lipides afin de fournir l'énergie nécessaire au métabolisme (Czaja & Cuervo, 2009).

L'activation des voies métaboliques lysosomales est déjà connue comme un processus précoce dans la maladie d'Alzheimer, où une augmentation importante du taux de cathepsine B et D ainsi que du nombre de lysosomes a été décrite dans les neurones altérés (Yamashima & Oikawa, 2009). L'implication du lysosome est aussi établie dans différents types de maladies neurodégénératives, telles que la leucodystrophie métachromatique, la maladie de Krabbe, et la maladie de Niemann Pick de type B et C (Yamashima & Oikawa, 2009).

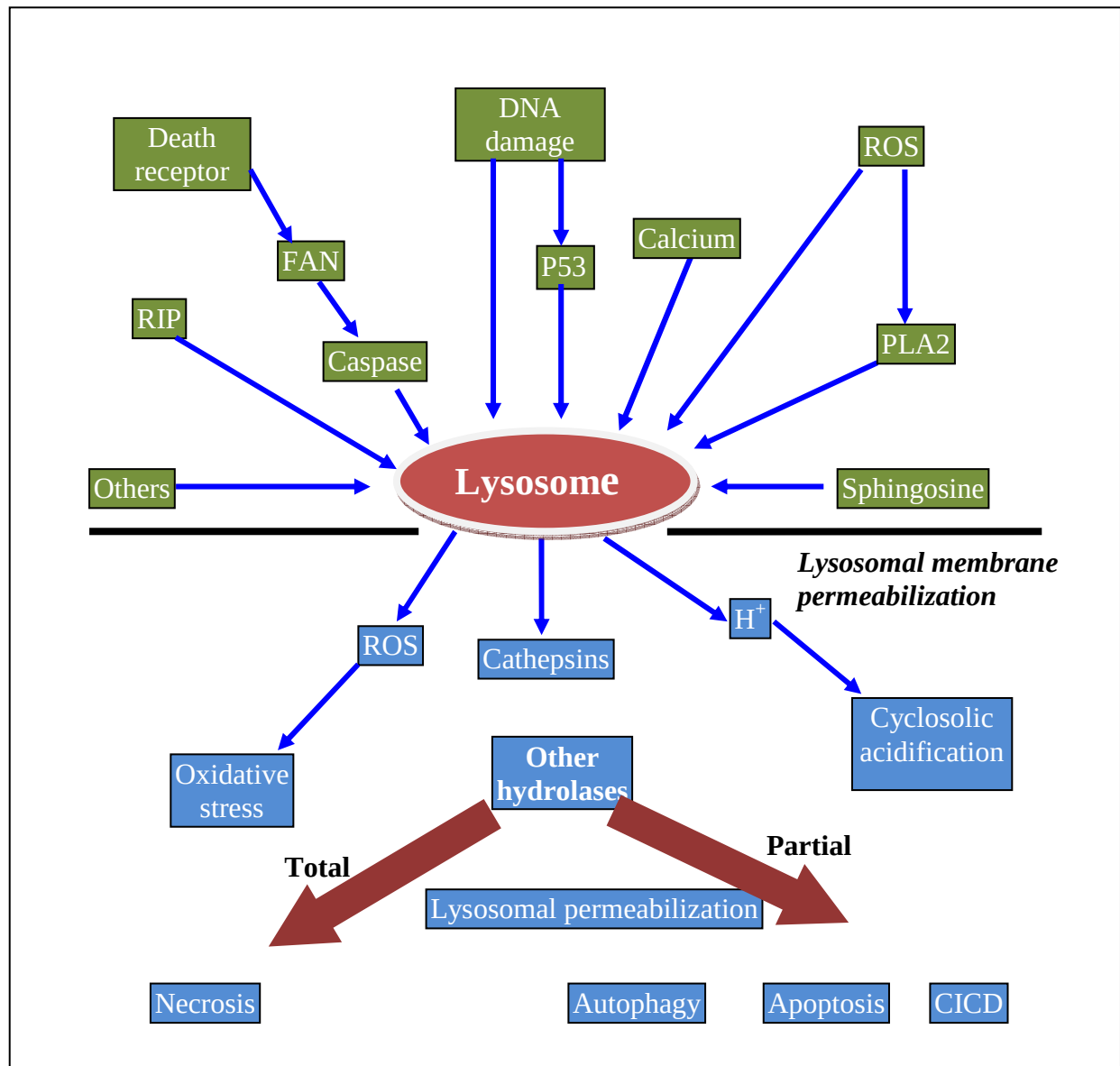


Figure 19 : Régulation de la perméabilité lysosomale et impact sur l'activation de différentes formes de mort cellulaire (Tang et al., 2008).

5 X-ALD et mort cellulaire

Bien que l'accumulation des AGTLC dans les tissus et le plasma constitue le marqueur biochimique de référence de l'X-ALD, les rôles des AGTLC dans la physiopathologie de cette maladie sont encore peu connus (Kemp & Wanders, 2010).

Au niveau structural, il a été montré que le C26:0 peut provoquer des modifications de la membrane cellulaire et par conséquent affecter la stabilité et les fonctions de cette membrane (Ho *et al.*, 1995; Knazek *et al.*, 1983). Ainsi, le C26:0 est toxique sur les cellules adrénocorticales humaines en provoquant une diminution de leur sensibilité vis-à-vis de l'hormone adrénocorticotropique (ACTH) (Whitcomb *et al.*, 1988). Par ailleurs, chez les patients atteints d'X-ALD, la microviscosité de la membrane érythrocytaire est augmentée (Knazek *et al.*, 1983).

Heins *et al.* ont montré qu'à partir de 20 µM les AGTLC (C22:0, C24:0 et C26:0) sont cytotoxiques pour les cellules neuronales de rats en culture primaire mixte (oligodendrocytes, astrocytes et neurones) (Hein *et al.*, 2008). Ces AGTL provoquent des altérations dans le fonctionnement de la mitochondrie, et des modifications du taux intracellulaire de calcium aboutissant à la mort cellulaire. Les oligodendrocytes sont les cellules les plus sensibles aux AGTLC (Hein *et al.*, 2008). Parallèlement, Fourcade *et al.* ont décrit *in vitro* et *in vivo* que l'excès d'AGTLC (100 µM) peut provoquer le déclenchement d'un stress oxydant, une déplétion en GSH, une diminution du potentiel transmembranaire mitochondriale et l'activation du système enzymatique anti-oxydant (glutathion peroxydase (Gpx), catalase, superoxyde dismutase cytosolique (Cu/Zn SOD) et mitochondriale (Mn SOD)) (Fourcade *et al.*, 2008). La rupture de la balance RedOx provoque l'oxydation de macromolécules, telles que les lipides (peroxydation), les protéines (carbonylation) et l'ADN (Fourcade *et al.*, 2008). Il a été observé que les fibroblastes humains déficients en *ABCD1* sont plus sensibles au stress oxydant que les fibroblastes non déficients, ce qui indique que l'absence d'*ABCD1* peut altérer l'équilibre RedOx (Fourcade *et al.*, 2008). Des nouvelles études montrent que la cytotoxicité des AGTLC dans le SNC est due à leur capacité à former des complexes avec certains phospholipides et notamment avec la lysophosphatidilcholine (LysoPC) (le C26:0 incorporé dans les lysoPC est d'ailleurs utilisé comme biomarqueur de l'X-ALD) (Eichler *et al.*, 2008 ; Hubbard *et al.*, 2009). L'injection de lysoPC-C24:0 dans le cortex pariétal du cerveau d'une souris provoque l'activation et la mort des cellules microgliales, cette mort étant fonction de la longueur de chaîne des AG (Eichler *et al.*, 2008). L'extinction des gènes *Abcd1* et *Abcd2* et l'accumulation de C26:0 provoquent l'activation de 5-lipoxygénase (5-LOX) dans les astrocytes en culture primaire (Khan *et al.*, 2010). Dans toutes les zones du cerveau de patients atteints d'X-ALD, la 5-LOX est activée et les

taux de leucotriène LTB₄ (médiateurs lipidiques d'inflammation) sont augmentés ([Khan *et al.*, 2010](#)). Sur des cultures primaires d'hépatocytes murins ainsi que sur des cellules d'hépatome HepG2, il a été montré que l'oléate et le plamitate induisent une lipotoxicité *via* la synthèse de TNF- α dont la synthèse est augmentée suite à la déstabilisation des lysosomes ([Feldstein *et al.*, 2004](#)).

V Stress oxydant

Le stress oxydant est défini comme un déséquilibre prononcé entre anti-oxydants et pro-oxydants en faveur de ces derniers et de leurs effets potentiellement néfastes ; il peut survenir au niveau d'une cellule ou d'un organisme (Barouki, 2006). Le déséquilibre peut provenir d'une production accrue d'espèces réactives de l'oxygène (ERO) ou de l'azote (ERN), d'un dysfonctionnement des défenses anti-oxydantes ou des deux à la fois.

1 Espèces réactives de l'oxygène (ERO) et de l'azote (ERN)

Les ERO/ERN sont des molécules contenant de l'oxygène (radicalaire : $O_2^{\cdot -}$; $^{\cdot}OH$; $RO^{\cdot}$... ou non radicalaire H_2O_2 , 1O_2) ou de l'azote ($^{\cdot}NO$; $ONOO^{\cdot}$) mais dont la réactivité est bien supérieure à celle de la molécule d' O_2 (Circu & Aw, 2010). Les ERO/ERN sont produits par des réactions du métabolisme cellulaire normal dans différents compartiments cellulaires (métabolisme des lipides, respiration cellulaire,...) ou encore, par des agents externes physiques (radiation, UV,...), chimiques (xénobiotiques,...) ou mécaniques.

Ces molécules jouent un double rôle :

- 1) à faibles concentrations, elles jouent un rôle physiologique bénéfique dans la signalisation cellulaire, l'induction de réponse mitogénique et la défense contre des agents infectieux.
- 2) à concentrations élevées, ces molécules peuvent provoquer des dommages aux macromolécules bioactives (lipides, protéines, ADN) conduisant ainsi à diverses maladies (Valko *et al.*, 2007).

Le maintien de l'homéostasie RedOx par le contrôle du statut oxydatif de l'organisme est nécessaire au bon fonctionnement des organismes vivants (Droge, 2002).

L'oxygène est un gaz indispensable à la vie mais il peut être toxique par lui-même et par la formation d'espèces réactives de l'oxygène (ERO) qui ont de nombreux effets délétères. Lors de sa réduction, le di-oxygène peut conduire à différents types d'ERO qui sont l'anion superoxyde ($O_2^{\cdot -}$) et son acide conjugué (le radical hydroperoxyde $HO_2^{\cdot}$), le radical hydroxyle $^{\cdot}OH$ et le peroxyde d'hydrogène H_2O_2 .

Une molécule d'oxygène (O_2) peut donc gagner un électron pour donner lieu à un anion superoxyde ($O_2^{\cdot -}$) instable et peu réactif ou gagner de l'énergie pour donner lieu à un oxygène singulet (1O_2) fortement réactif (l'oxygène singulet s'additionne directement sur les doubles liaisons des acides gras polyinsaturés pour donner des hydroperoxydes : $ROOH$). L' $O_2^{\cdot -}$ constitue un précurseur qui peut donner lieu à d'autres molécules, telles que des radicaux alkoxydes $RO^{\cdot}$ et peroxydes $ROO^{\cdot}$, plus

stables et plus réactives. L' $O_2^{\cdot-}$ peut aussi gagner 2 atomes d'hydrogène et deux électrons lors d'une réaction enzymatique pour former l' H_2O_2 qui a une durée de vie plus longue et qui diffuse librement dans l'organisme. En présence de métaux, la réactivité de l' H_2O_2 est augmentée. En présence de Cu^{2+} ou de Fe^{2+} , l' H_2O_2 peut se décomposer selon la réaction de Fenton en $HO^{\cdot}$ et $OH^{\cdot}$. Les groupements hydroxyls ($OH^{\cdot}$) et les $ROO^{\cdot}$ sont extrêmement réactifs et peuvent réagir avec la plupart de molécules bioactives (Figure 20).

Grâce à l'activité de la NO synthase (NOS), par une réaction équimoléculaire, l'arginine donne de la citrulline et du monoxyde d'azote ($^{\circ}NO$) qui peut réagir avec $O_2^{\cdot-}$ pour donner lieu à un composé très toxique, le peroxynitrite $ONOO^-$ (Simonian & Coyle, 1996). En plus de la formation de peroxynitrite, $O_2^{\cdot-}$ peut contribuer à la formation d'autres ERN également très réactives (Figure 20).

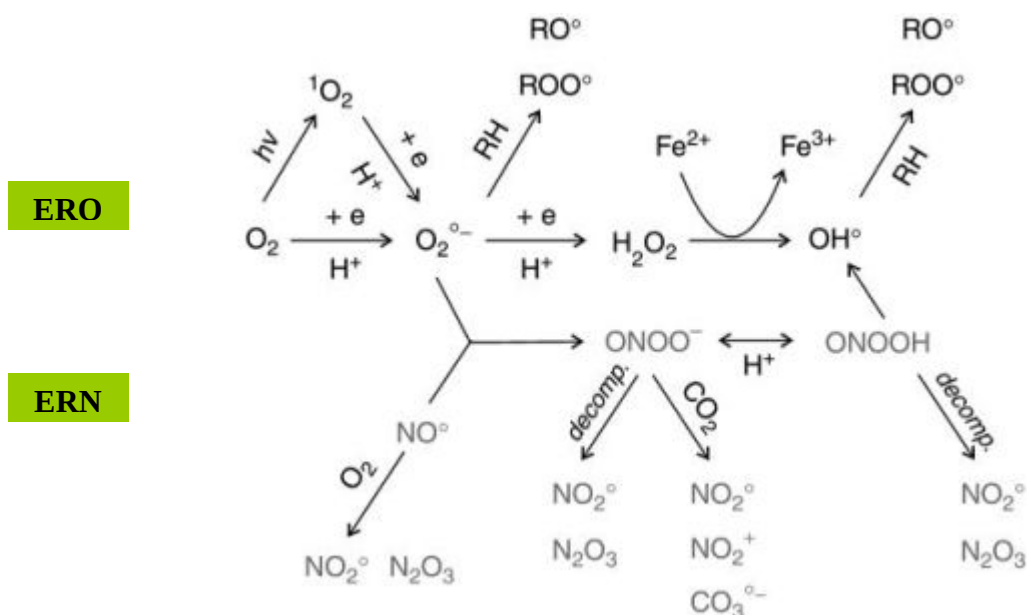


Figure 20 : Formation des différentes ERO et ERN

2 Origines cellulaires des ERO et ERN

Dans la cellule, les ERO ont différentes origines (Figure 21). La mitochondrie est la source majeure des ERO cellulaires (respiration mitochondriale). Des réactions enzymatiques sont aussi capables de produire des anions superoxydes (NADPH oxydases, Xanthine oxydase) (Valko *et al.*, 2007). Dans des conditions physiologiques, le peroxysome produit H_2O_2 (Valko *et al.*, 2004). Les neutrophiles produisent les anions superoxydes *via* la NADPH oxydase pour accomplir la bactéricidie (Valko *et al.*, 2007). Les mono-oxygénases du réticulum endoplasmique (Cytochrome P450) contribuent à la production de H_2O_2 et d' $O_2^{\cdot-}$ (Zangar *et al.*, 2004). Le $^{\circ}NO$ est un radical abondant qui joue un rôle biologique important dans la signalisation oxydative de plusieurs processus physiologiques

(neurotransmission, régulation de la pression artérielle via son action sur les cellules musculaires lisses, régulation de l'immunité...) (Bergendi *et al.*, 1999). $^{\circ}\text{NO}$ est stable dans un milieu pauvre en oxygène et diffuse facilement à travers les membranes biologiques (Chiueh, 1999). Au niveau du SNC, le $^{\circ}\text{NO}$ est un neurotransmetteur qui agit aussi sur la plasticité synaptique (Gao, 2010).

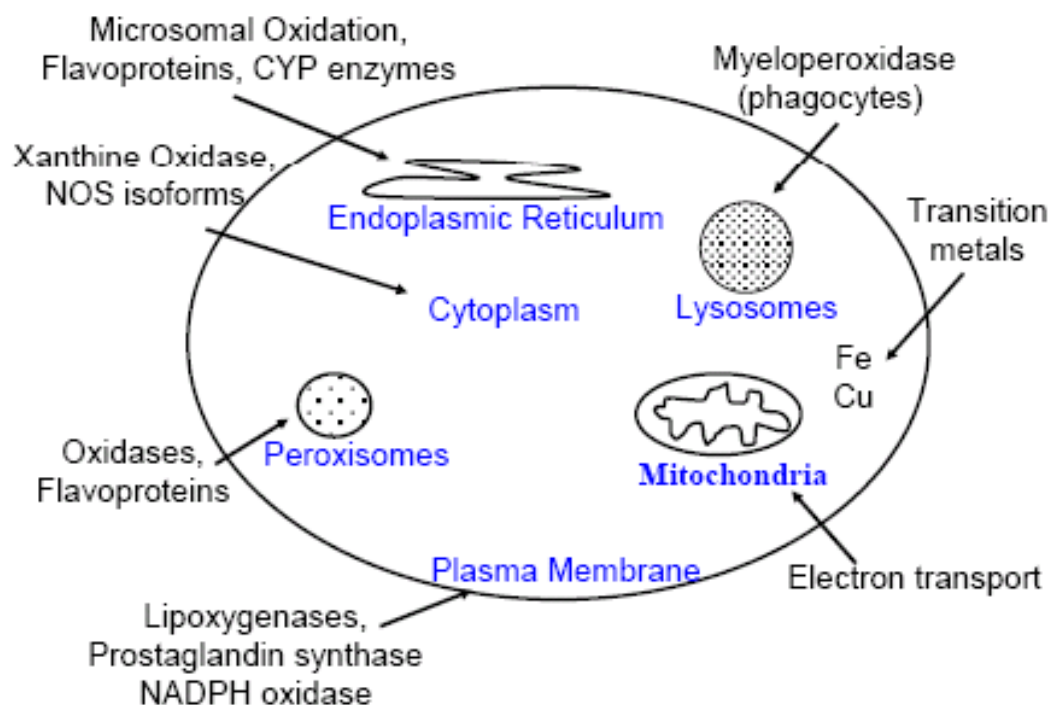


Figure 21 : Origine cellulaire du stress oxydant

3 Défenses anti-oxydantes

Les anti-oxydants constituent une vaste famille de molécules capables d'inhiber la production, de limiter la propagation ou de détruire les ERO (Sies, 1997).

Les organismes disposent des plusieurs mécanismes anti-oxydatifs pour lutter contre les radicaux et leurs effets biologiques délétères.

Les mécanismes de défense anti-radicalaire sont regroupés en trois catégories (Valko *et al.*, 2006) :

- 1) des enzymes (Catalase, SODs, glutathion peroxydases)
- 2) de petites molécules capables de piéger des radicaux libres (Vitamine E, Vitamine C, acide urique, glutathion réduit (GSH), caroténoides....)
- 3) des protéines (albumine, transferrine...)

Les molécules anti-oxydantes agissent à différents niveaux dans la cellule (Figure 22).

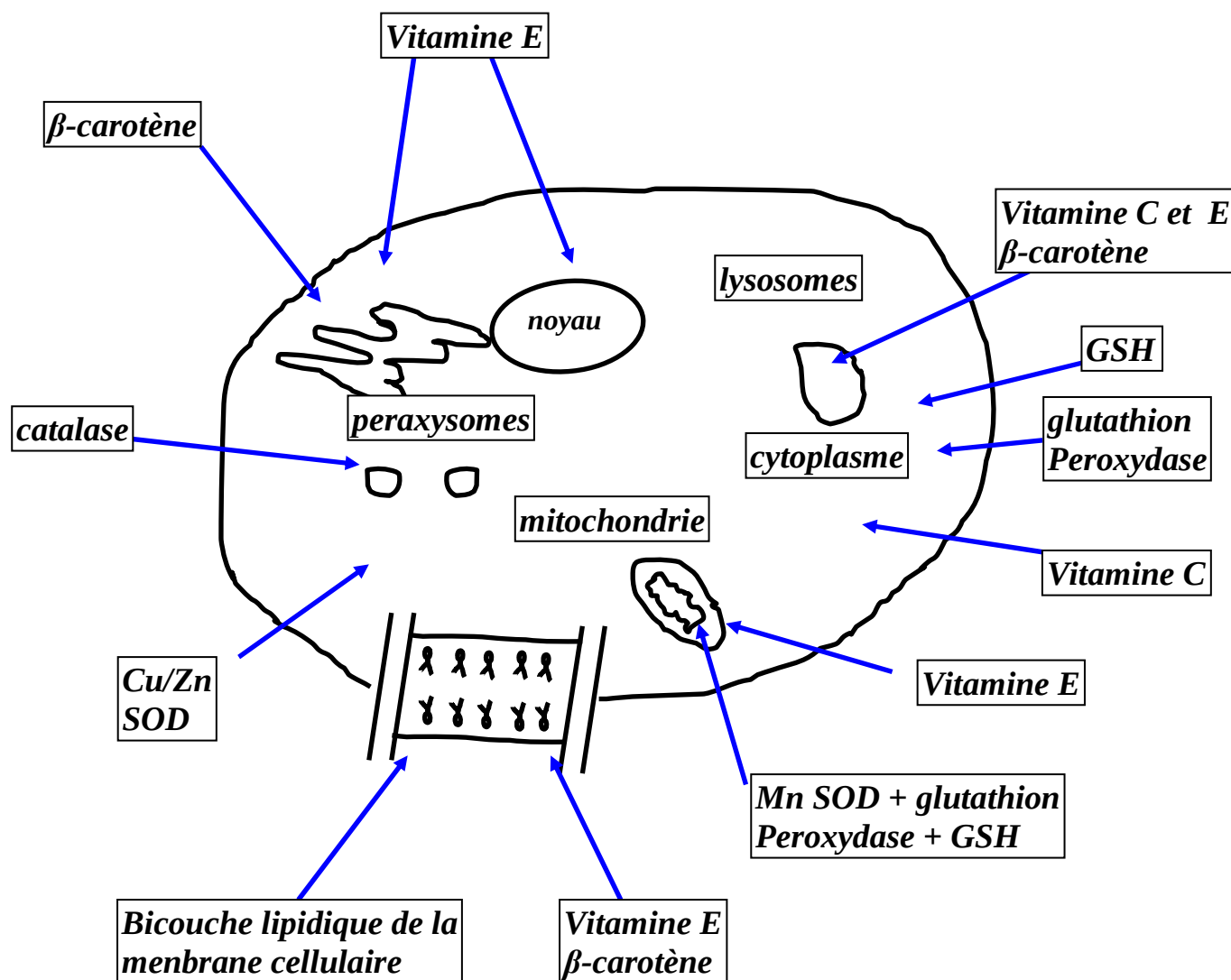


Figure 22 : Niveaux d'action et localisation des différents effecteurs anti-oxydants

3.1 Systèmes enzymatiques

Les systèmes enzymatiques de défense anti-oxydante sont constitués de plusieurs enzymes comme les superoxydes dismutases (SODs), la catalase ou encore la glutathion peroxydase (GPx) (Valko *et al.*, 2007) (Figure 23).

- Superoxydes dismutases :

Les SODs sont des métalloenzymes qui catalysent la transformation des anions superoxydes en peroxyde d'hydrogène (Choi, 1993). Chez les mammifères, trois isoformes de SOD ont actuellement été identifiées :

- 1) SOD1 ou Cu/Zn-SOD est un homodimère cytosolique prédominant dans la plupart des types cellulaires. SOD1 représente 70 à 80% de l'activité totale de SODs. Les ions Cu^{2+}

sont nécessaires à son activité catalytique alors que les ions Zn^{2+} stabilisent la molécule (Choi, 1993).

- 2) La SOD2 ou Mn-SOD est mitochondriale (Choi, 1993).
- 3) La SOD3 sécrétée dans l'espace extracellulaire est un homotétramère qui se lie à des constituants de la matrice extracellulaire comme le collagène, les protéoglycanes et l'héparane sulfate (Fukui & Zhu, 2010). En collaboration avec la glutathion peroxydase, la SOD3 constitue la première ligne de défense contre les agents pro-oxydants (Rahman *et al.*, 2006).

- Catalase et glutathion peroxydase

Le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) produit par SODs est métabolisé en H_2O et O_2 par la catalase et/ou les glutathion peroxydases (GPx) (Rahman *et al.*, 2006). Ces enzymes sont présentes dans pratiquement tous les tissus. Dans le SNC, le niveau de catalase est bien inférieur à celui de SOD et de GPx (Choi, 1993).

La catalase est une enzyme peroxysomale de 240 kDa, elle est formée par quatre sous-unités, chaque sous-unité contient un groupe ferriprotoporphyrine dans son site actif avec un atome de fer à l'état Fe^{3+} (Vlasits *et al.*, 2010).

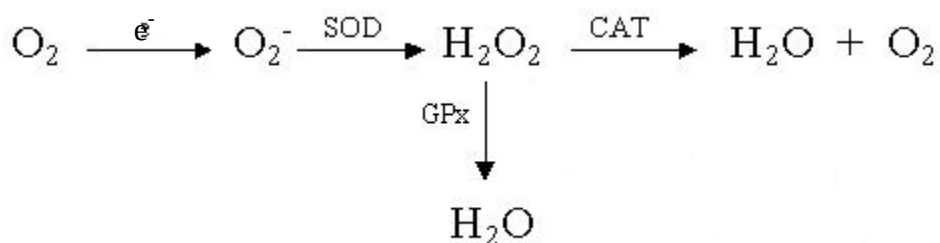


Figure 23 : Enzymes anti-oxydantes

La glutathion peroxydase est séléno-dépendante (GPx), elle présente une masse molaire d'environ 85 kDa, elle est formée par quatre sous-unités contenant chacune un atome de sélénium sous sa forme sélénocystéine qui constitue le site actif de l'enzyme (Kinnula *et al.*, 1995). Chez l'Homme, il existe 4 isoformes de glutathion peroxydase séléno-dépendante. Cette enzyme, qui se localise dans la mitochondrie et dans le cytosol, décompose les hydroperoxydes organiques et le peroxyde d'hydrogène (Zachara, 1992). Cette enzyme possède une grande affinité pour le glutathion réduit (GSH) qui est utilisé comme donneur d'hydrogène (Figure 24). L'efficacité de la GPx est liée à un

flux constant de GSH ; elle est couplée à l'oxydation du glucose-6 phosphate en 6-phosphate gluconate, source de NADPH, qui est utilisé comme cofacteur par la glutathion réductase (GRase) pour régénérer le glutathion réduit (GSH) (Cheng *et al.*, 2003; Lei, 2002) (Figure 24).

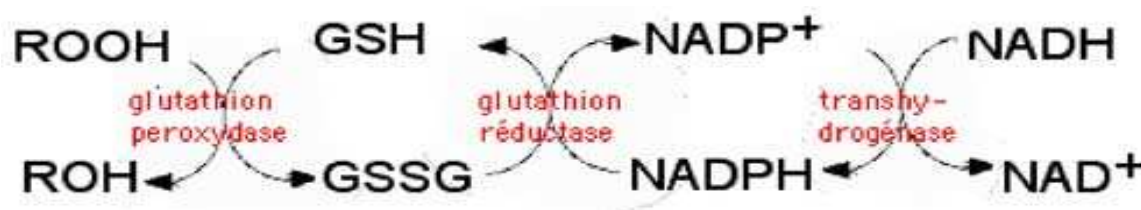


Figure 24 : Glutathion peroxydase et réductase

3.2 Systèmes non enzymatiques

Les effecteurs anti-oxydants non enzymatiques ont des sources exogènes (vitamine C, E, caroténoïdes...) ou endogènes (glutathion réduit, métallothionines,...).

La vitamine E peut réduire les radicaux hydroxyles et les produits de peroxydation des lipides polyinsaturés. La vitamine E oxydée est ensuite réduite par la vitamine C par une réaction rapide et non enzymatique. Plusieurs réactions enzymatiques peuvent réduire la vitamine C oxydée, certaines impliquant le glutathion réduit (GSH) (Forman *et al.*, 2009).

Le glutathion ou γ -glutamyl-cystéinyl-glycine est une molécule de faible poids moléculaire. C'est l'anti-oxydant le plus abondant (0,5-10 mM intracellulaire ; 10-100 μ M plasmatique) du système de défense anti-radicalaire (Forman *et al.*, 2009). Le GSH est synthétisé grâce à deux réactions enzymatiques ATP dépendantes (Figure 25). La synthèse de GSH est effectuée en deux étapes contrôlées par la glutamyl-cystéine synthétase (Glutamate-cystéine ligase ou CGL) et la glutathion synthétase (GSH synthase) (Forman *et al.*, 2009).

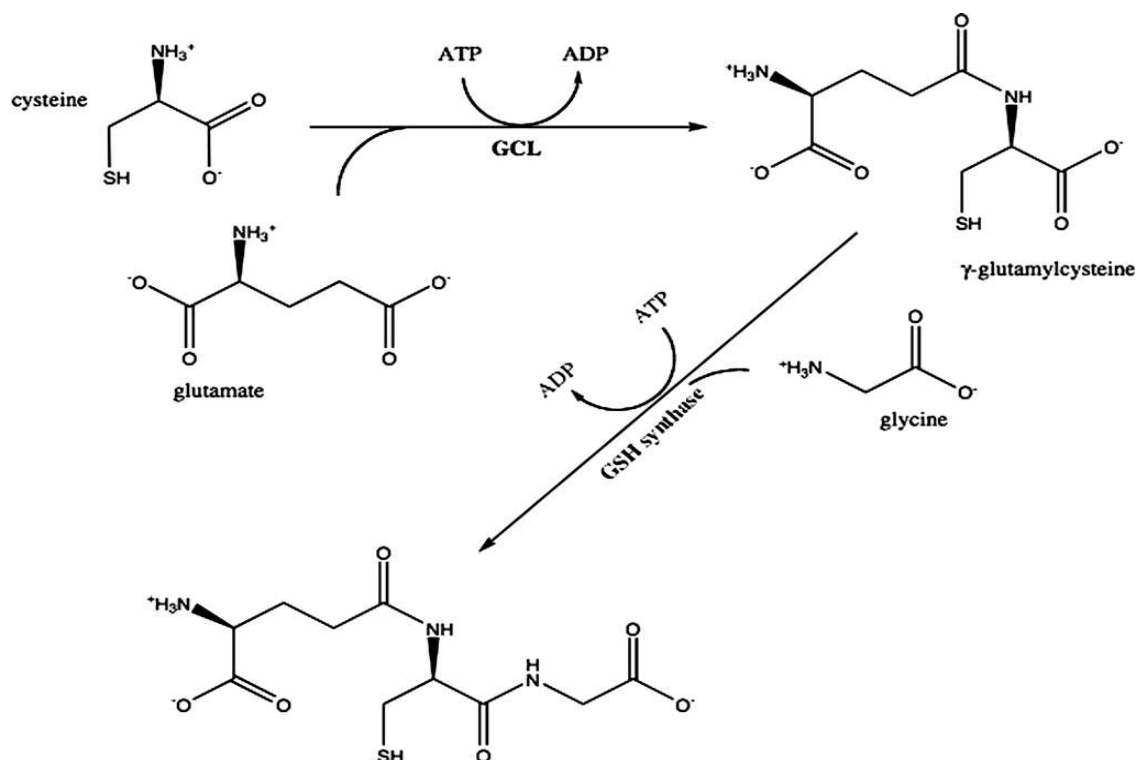


Figure 25 : Synthèse de glutathion (Forman et al., 2009)

Dans la cellule, le glutathion existe sous deux formes, l'une réduite (GSH) et l'autre oxydée (GSSH). La forme oxydée est beaucoup moins abondante que la forme réduite (1/100 en concentration) (Biswas & Rahman, 2009). Le GSH est un substrat des glutathions peroxydases sélénodépendantes (GPx). Les GPx utilisent le GSH comme source d'hydrogène, la réaction nécessite deux molécules GSH pour donner une molécule de GSSG (Forman et al., 2009). Le GSH peut chélater les ions Cu^+ et ainsi limiter leur participation à la génération de radicaux libres par la réaction de Fenton. Du fait de son abondance, le GSH est le thiol le plus important dans le contrôle de l'équilibre RedOx. Il est impliqué dans l'élimination de certains produits de la peroxydation lipidique, comme le 4-HNE (Forman et al., 2009). La déplétion de GSH intracellulaire est un marqueur de stress oxydant (Mytilineou et al., 2002). Dans le SNC, la déplétion en GSH provoque une cascade d'événements conduisant à la mort cellulaire. Un événement précoce de la déplétion en GSH est le relargage d'acide arachidonique dans une réaction dépendante de la phospholipase-A2. Cet acide arachidonique peut-être métabolisé par la lipoxigénase en produisant des ERO altérant les cellules déplétées en GSH (Mytilineou et al., 2002).

4 Effets du stress oxydant sur les molécules biologiques

Un déséquilibre de la balance RedOx (accumulation de ROS et/ou diminution de l'activité du système anti-oxydant) entraîne un stress oxydant. Le stress oxydant est capable d'attaquer les

macromolécules (lipides, protéines, glucides, ADN) en provoquant des changements structuraux et fonctionnels participant à l'évolution des pathologies (Curtin *et al.*, 2002; Valko *et al.*, 2006).

4.1 Effets des ERO/ERN sur les lipides

Les métaux (cuivre, fer...) sont utilisés comme des agents initiateurs de l'oxydation des lipides par l'intermédiaire de la réaction de Fenton. Le radical hydroxyle généré par la réaction de Fenton est essentiel pour la peroxydation lipidique. Le mécanisme, proposé par Bucher *et al.* implique la formation d'un complexe Fe (II) : Fe (III). Le taux maximal de la peroxydation lipidique est observé lorsque le rapport de Fe (II) : Fe (III) est de 1:1 (Bucher *et al.*, 1983). Le processus global de la peroxydation lipidique se compose de trois étapes: initiation, propagation et terminaison présentées dans la Figure 26. La peroxydation lipidique est une réaction en chaîne initiée par l'arrachement d'un atome d'hydrogène par HO[•] ou O₂⁻ à des esters d'acides gras insaturés isolés ou constituants des membranes lipidiques (Valko *et al.*, 2006). Le radical carboné du constituant lipidique tend alors à se déstabiliser par un réarrangement conduisant à un diène conjugué. Celui-ci réagit avec O₂ pour former un radical peroxy qui peut être réduit en hydroperoxyde (stable et peu réactif en absence de métal) ou pour arracher un atome d'hydrogène à un autre acide gras ce qui génère un nouveau radical lipidique. Les principaux produits générés par cette réaction sont le malonedialdéhyde (MDA) (Figure 26) et 4-hydroxy-2-nonenal (4-HNE) (Valko *et al.*, 2006). La peroxydation des lipides est un processus auto-catalytique qui est résilié par la recombinaison des radicaux ($R^{\bullet} + R^{\bullet} \rightarrow$ produit non-radicalaire) ou l'absence de substrat (Valko *et al.*, 2006).

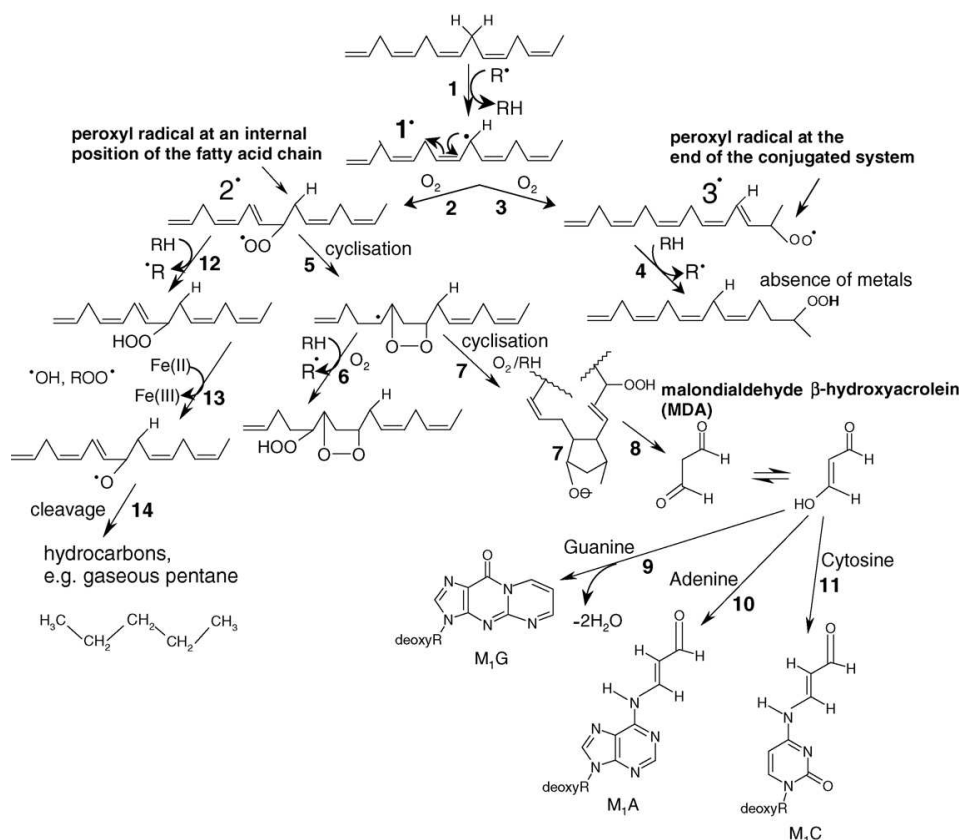


Figure 26 : Voies et produits de peroxydation lipidique (Valko et al., 2006).

Le MDA est mutagène dans les cellules bactériennes et/ou de mammifères et cancérigène chez le rat (Marnett, 1999). Le 4-HNE est faiblement mutagène mais il semble être le principal produit toxique de la peroxydation lipidique et joue un rôle dans la signalisation cellulaire (Chaudhary et al., 2010). Le MDA et le 4-HNE peuvent altérer la fluidité et les fonctions des membranes, dont la composition en AGI (Acides gras insaturés) module l'oxydabilité (Britton, 1996). La peroxydation lipidique provoque une perte de la fluidité membranaire et du potentiel membranaire, une inactivation de récepteurs et d'enzymes membranaires. Ces perturbations fonctionnelles peuvent aboutir à la mort des cellules (Esterbauer et al., 1991). La peroxydation lipidique est une source endogène de molécules pouvant former des adduits avec l'ADN (Blair, 2001).

Le MDA peut réagir avec les bases de l'ADN (Figure 26) (Valko et al., 2006; Cadet et al., 2010). En effet, les atomes de carbone des deux liaisons carbonyles du MDA sont électrophiles ; ils peuvent réagir avec les atomes nucléophiles de la guanine, de l'adénine et de la cytosine (Valko et al., 2006; Cadet et al., 2010). Le 4-HNE forme plusieurs types d'adduits. Le 1,N2-propano-2'-désoxyguanosine est l'adduit prépondérant de la réaction du 4-HNE avec l'ADN isolé ou cellulaire (Douki et al., 2004). Cet adduit est susceptible d'induire des transversions GC vers TA (Feng et al., 2003).

Le 4-HNE est toxique pour les oligodendrocytes et pour les axones. Sur des oligodendrocytes en culture, la cytotoxicité de 4-HNE est dépendante du temps et de la concentration. *In vivo*, après l'injection de 4-HNE dans le cerveau de souris, la réactivité contre la β -APP (marqueur de dommage de l'axone) est augmentée. Cela indique que la peroxydation lipidique et la production des 4-HNE dans le cerveau est toxique à la fois pour les oligodendrocytes et pour les neurones (McCracken *et al.*, 2000).

Les radicaux libres induisent l'oxydation du cholestérol. L'auto-oxydation du cholestérol a lieu préférentiellement sur le cycle B, formant les 7-hydroxycholestérols (α et β), le 7-cétocholestérol, les époxydes 5,6 (5α , 6α et 5β , 6β) et le cholestaniérol (Brown & Jessup, 2009). Le 7-cétocholestérol qui est le principal oxystérol issu de l'auto-oxydation du cholestérol semble être un bon marqueur du stress oxydant (Dyer *et al.*, 1997; Brown & Jessup, 2009) (Figure 27). Comme le cerveau est l'organe le plus riche en cholestérol, il n'est pas donc surprenant qu'il contienne beaucoup d'oxystérols quand il est le siège d'une rupture de l'équilibre RedOx.

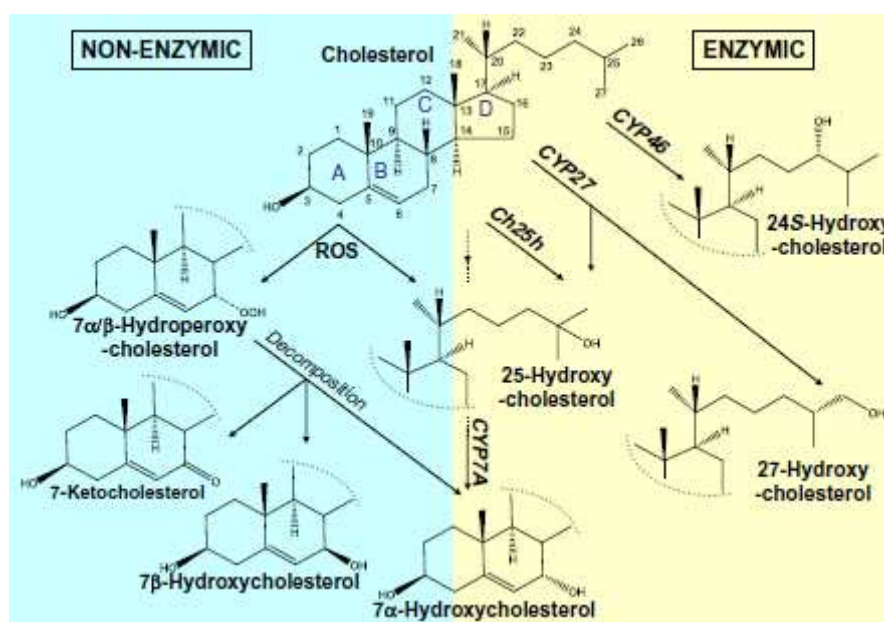


Figure 27 : Voies et produits d'oxydation du cholestérol enzymatiques et non enzymatiques (Brown & Jessup, 2009)

4.1.1 Oxystérols et dégénérescence neuronale

La myéline est un complexe contenant 70 % de lipides (Björkhem et Meaney, 2004 ; Taylor *et al.*, 2004). Elle est composée de cholestérol, de phospholipides et de glycosphingolipides dans un rapport molaire 4 : 4 : 2 (Björkhem et Meaney, 2004). Dans le SNC, la myéline est formée par extension des membranes des oligodendrocytes et permet la bonne conduction de l'influx nerveux.

Sa fonction est donc primordiale pour le développement et la fonctionnalité du SNC. Le cholestérol, qui est un lipide impliqué dans de nombreuses fonctions cellulaires, est aussi un régulateur majeur de l'organisation structurale lipidique et de voies de signalisation cellulaire. C'est également un précurseur de neurostéroïdes. Au niveau des cellules du SNC le cholestérol présent, qui résulte d'une synthèse endogène très finement régulée, assume donc des activités biologiques majeures. Lors de dysfonctionnement des cellules du SNC, son oxydation peut conduire à la formation de composés toxiques comme le 7-cétocholestérol (7KC) et le 7 β -hydroxycholestérol (7 β). Des patients avec une sclérose en plaque ont montré de fortes concentrations de 7KC dans leurs liquides céphalorachidiens (Diestel *et al.*, 2003). Le 7KC pourrait donc jouer un rôle majeur dans la démyélinisation observée dans les scléroses en plaque (Leoni *et al.*, 2005 ; Carter, 2007).

Dans la maladie d'Alzheimer, le peptide A β est un important composant des plaques amyloïdes. Le 24-hydroxycholestérol (24OH), produit par la 24-hydrolase (CYP46) à partir du cholestérol, peut se fixer sur le peptide A β et les patients atteints d'Alzheimer montrent le plus souvent des taux de 24OH diminuant avec l'avancée de la maladie (Kristofikova *et al.*, 2007). Il pourrait donc jouer un rôle crucial dans le développement de la pathologie. Le 27-hydroxycholestérol (27OH) est l'oxystérol majeur produit par réaction enzymatique (CYP27) au niveau périphérique. Dans la maladie d'Alzheimer, le 27OH passe la barrière hémato-méningée et s'accumule dans le SNC. Dasari *et al.* ont montré que ce composé était capable d'activer le clivage et la production du peptide A β dans des cellules épithéliales humaines de rétine (ARPE-19). Sur ces même cellules, le 27OH est également capable d'induire un stress du réticulum endoplasmique, une activation de la caspase 12 et un stress oxydatif (Dasari *et al.*, 2010). La dérégulation métabolique du cholestérol pourrait contribuer à la formation d'oxystérols et donc au développement de nombreuses maladies neurodégénératives inflammatoires.

Dans ce contexte, Weinhofer *et al.* ont montré en 2005, une augmentation du cholestérol plasmatique dans des souris X-ALD, et également une régulation du taux de C26:0 par le cholestérol (Weinhofer *et al.*, 2005).

Weinhofer *et al.* ont également décrit que le cholestérol régule l'expression du gène *ABCD2* (Weinhofer *et al.*, 2002). En effet, dans des cultures de fibroblastes humains, les auteurs ont décrit une induction de l'expression du gène *ABCD2* après déplétion des stérols *via* l'activation de SREBPs (Sterol regulatory Element Binding Proteins), facteur de transcription régulant le métabolisme du cholestérol. De plus, cette induction du gène *ABCD2*, réduit significativement les taux d'AGTLC dans des fibroblastes X-ALD. La protéine ABCD2 est un transporteur ABC montrant une forte homologie de séquence avec ABCD1. Depuis quelques années, ABCD2 est devenue une cible

thérapeutique potentielle puisque sa surexpression dans des souris *ABCD1* déficientes permet de restaurer les taux plasmatiques d'AGTLC (Pujol *et al.*, 2004).

Plus récemment, des travaux ont révélé une augmentation de marqueurs du stress oxydant (adduits glyoxal, methylglyoxal, 4-hydroxynonenal et malondialdéhyde se fixant sur les protéines lors de stress oxydants) dans des extraits de moelles épinières de souris *ABCD1*⁻ et dans des fibroblastes X-ALD comparés à des souris sauvages ou à des fibroblastes contrôles. Ces travaux ont également montré une diminution d'expression de protéines impliquées dans la détoxification des ERO (SOD1, SOD2, Gpx4) dans le cortex de souris *ABCD1*⁻ comparées aux souris sauvages (Fourcade *et al.*, 2008). Le C26:0 potentialise le stress oxydant observé sur des fibroblastes X-ALD comparés aux fibroblastes contrôles (Fourcade *et al.*, 2008).

D'après ces données, les mutations du gène *ABCD1*, responsable de l'X-ALD, pourraient conduire à la dérégulation du métabolisme du cholestérol et à la production de stress oxydants. Les ERO ainsi produites pourraient alors contribuer à oxyder le cholestérol intracellulaire et le cholestérol présent dans la gaine de la myéline et conduire à la formation d'oxystérols. Les 7-OH, composés toxiques, pourraient donc participer au développement de l'X-ALD. Dans ce contexte et pour évaluer cette hypothèse, nous avons cherché à préciser si les 7-OH (en particulier le 7KC et le 7β) pouvaient activer la mort d'oligodendrocytes.

4.1.2 Oxystérols et homéostasie du cholestérol

Le cholestérol est un dérivé cyclopentanoperhydrophénantrénique. Il est présent dans les tissus, dans les lipoprotéines plasmatiques sous forme libre ou combiné à un acide gras pour former un ester de cholestérol. Ces esters de cholestérol sont la forme de stockage et de transport du cholestérol. Le cholestérol a un rôle structural : il est présent dans les membranes cellulaires des animaux aux cotés des phospholipides, et en moindre quantité, dans la membrane des organites. Il possède également un rôle métabolique en étant le précurseur de la synthèse des acides biliaires (indispensables à la digestion des lipides) dans le foie, des hormones stéroïdiennes dans les organes stéroïdogènes (corticosurrénales, gonades et placenta), et de la vitamine D dans la peau. Son métabolisme a lieu dans l'intestin, le foie, les tissus périphériques puis il est transporté *via* les lipoprotéines. Le cholestérol est aussi un régulateur important de l'homéostasie lipidique et de la signalisation cellulaire. C'est également un composé majeur de la myéline. La dérégulation de son homéostasie peut aboutir à la surproduction d'oxystérols qui sont des dérivés du cholestérol. Ils contiennent un second atome d'oxygène au niveau des groupes carbonyle, hydroxyle ou époxyde. *In*

vivo, les oxystérols agissent comme des intermédiaires dans le catabolisme du cholestérol, comme régulateurs du métabolisme lipidique et comme des stérols toxiques ayant des effets pro-athérogènes (Massey *et al.*, 2006). Jusqu'à maintenant, les oxystérols ont été décrits comme ayant de nombreuses activités : apoptose, nécrose, inflammation, immunosuppression... (Guardiola *et al.*, 1996 ; Brown *et Jessup*, 1999 ; Schroeffer, 2000). Les oxystérols les plus souvent détectés *in vivo* sont le 7KC, le 7 α et le 7 β (Brown *et Jessup*, 1999). Les oxystérols proviennent de réactions chimiques diverses et d'oxydations enzymatiques. Mais les oxystérols peuvent également provenir de la nourriture, notamment les nourritures riches en cholestérol comme les œufs, les produits laitiers (beurre, fromages...), la viande rouge (bœuf, porc, veau), de foies, des reins et de poissons séchés. En effet, le cholestérol présent dans ces aliments peut être sujet à des radiations et à des hautes températures favorisant son oxydation en oxystérols. Certains oxystérols sont synthétisés par les tissus après réaction enzymatique grâce à la 27-hydroxylase (pour le 27OH), la 25-hydroxylase (pour le 25OH) ou la 24-hydroxylase (pour le 24OH) par exemple. La synthèse la plus néfaste pour l'organisme est sans doute la synthèse par auto-oxydation puisqu'elle n'est pas régulée et a lieu dans les lésions (zones démyélinisées) présentant de forts stress oxydants. En effet, les radicaux libres peuvent induire l'oxydation du cholestérol présent dans les LDLs (Low Density Lipoprotein). Cette auto-oxydation du cholestérol génère préférentiellement des dérivés oxydés en position 7, c'est-à-dire des 7-hydroxycholestérols : les 7-OH. Ces 7-OH sont composés de trois membres : le 7-cétocholestérol (7KC), le 7 α -hydroxycholestérol (7 α) et le 7 β -hydroxycholestérol (7 β).

Le 7KC et le 7 β ont largement été démontrés comme ayant des activités néfastes à fortes concentrations (Vejux *et al.*, 2008 ; Vejux *et Lizard*, 2009). Le 7KC induit, dans de nombreux types cellulaires, la mort par apoptose dépendante ou indépendante de la caspase 3 (Prunet *et al.*, 2005), une accumulation de lipides neutres et polaires (Vejux *et al.*, 2005), un stress du réticulum endoplasmique (Pedruzzi *et al.*, 2004), un fort stress oxydant (Biasi *et al.*, 2004 ; Larsson *et al.*, 2006). Les effets du 7 β sont identiques à ceux observés avec le 7KC aux mêmes concentrations (Li *et al.*, 2005). Le 7 α et le 27OH ont été testés sur les mêmes lignées cellulaires et il a été montré que ni l'un ni l'autre n'induisait la mort par apoptose, une surproduction d'espèces réactives de l'oxygène, ou une peroxydation lipidique (Miguet-Alfonsi *et al.*, 2002). Seule une publication a rapporté des effets néfastes du 27OH *in vitro* (Dasari *et al.*, 2010).

Le 7KC et le 7 β sont les oxystérols les plus fréquemment retrouvés au niveau des lésions, qu'elles soient athéromateuses ou au niveau du SNC dans les zones démyélinisées de maladies neurodégénératives. Ces deux oxystérols sont extrêmement toxiques ; leur surproduction pourrait donc contribuer au développement des pathologies neurodégénératives démyélinisantes et même les

potentialiser. Le 27OH s'accumule dans le SNC (Björkhem *et al.*, 2006a ; Björkhem, 2006b), dans les cas de rupture de la barrière hémato-encéphalique. Cet oxystérol, contrairement au 7KC et au 7 β , n'a jamais été décrit comme possédant des activités toxiques *in vivo* (apoptotiques, pro-oxydantes ou inflammatoire), alors qu'il est fortement retrouvé au niveau des lésions du SNC.

Le 7KC a été montré comme s'accumulant, dans la membrane plasmique, au niveau des microdomaines lipidiques (Royer *et al.*, 2009). En revanche, aucun travail n'a montré le même phénomène pour le 27OH et le 7 β .

4.2 Effets des ERO/ERN sur les protéines

Les protéines sont des constituants cellulaires structuraux et fonctionnels de la cellule. Les réactions des protéines avec des espèces radicalaires peuvent provoquer leur oxydation principalement au niveau des résidus cystéine, méthionine, thyrosine, tryptophane, phénylalanine, valine, leucine, histidine, glutamine, proline, thréonine, arginine et lysine (Stadtman, 1992; Stadtman *et al.*, 1992). Les protéines les plus sensibles aux attaques radicalaires sont surtout celles qui comportent un groupement sulfhydryle (SH) (enzyme anti-oxydante). C'est le cas de nombreuses enzymes cellulaires et de protéines de transport qui vont ainsi être oxydées et inactivées (Valko *et al.*, 2006). Les produits de la peroxydation lipidique (4-HNE et MDA) peuvent contribuer à l'oxydation des protéines, en particulier au niveau des résidus histidine, cystéine et lysine (Maier *et al.*, 2010). Les protéines modifiées par oxydation deviennent beaucoup plus sensibles à l'action des protéases (Valko *et al.*, 2006). Les changements structuraux des protéines oxydées altèrent l'intégrité des membranes cellulaires, ainsi que les propriétés fonctionnelles et antigéniques des protéines membranaires (Gruber *et al.*, 2006; Jacob *et al.*, 2006). Les carbonyles sont utilisés comme des marqueurs de l'oxydation des protéines et de façon générale comme des marqueurs du stress oxydant (Nakamura *et al.*, 2010). Les réactions des protéines avec les ERO peuvent conduire à la formation de nouveaux radicaux organiques alcoxyles ou peroxyles (Davies *et al.*, 1995). Ces radicaux peuvent endommager l'ADN; c'est à dire créer des pontes entre les protéines et les bases de l'ADN et provoquer des dommages oxydatifs, comme la 8-oxo-7,8-dihydroguanine (Furukawa *et al.*, 2005).

L'oxydation des protéines est liée à plusieurs maladies et à l'âge. Le processus de vieillissement est le plus souvent lié à une accumulation de protéines oxydées, l'accumulation est due à 1) une augmentation de taux ERO/ERN dans l'organisme, 2) à une défaillance du système anti-oxydant et/ou 3) à une diminution de la capacité du système de dégradation des protéines oxydées (Valko *et al.*, 2006).

4.3 Effets des ERO/ERN sur les glucides

L'oxydation du glucose conduit à la libération d'aldéhydes et de peroxyde d'hydrogène. Cette oxydation entraîne la glycation des protéines par attachement d'un aldéhyde conduisant à la coupure de la chaîne protéique. La glycation des protéines favorise leur réaction avec l'oxygène pour former des ERO (Hunt & Wolff, 1991).

4.4 Effets des ERO/ERN sur l'ADN

La stabilité du génome est essentielle pour maintenir une homéostasie des cellules et de l'organisme, mais il est soumis à de nombreuses menaces. Les ERO représentent une menace omniprésente et continue pour le génome. Les produits d'oxydation de l'ADN peuvent affecter la stabilité du génome. Les lésions oxydatives de l'ADN peuvent être efficacement réparées par excision des bases ou des nucléotides. Si le taux d'ERO dépasse la capacité du système anti-oxydant à maintenir un équilibre RedOx, la capacité de la réparation de l'ADN par les cellules peut être submergée, ce qui conduit à l'accumulation de dommages à l'ADN par oxydation (Sedelnikova *et al.*, 2010). Plusieurs classes de dommages à l'ADN sont décrites : la coupure simple ou double brin, la génération de bases modifiées comme la 8-oxoguanine (8-OHdG) (Figure 28), les pontages ADN-ADN et ADN-protéines et les sites abasiques (Radak & Boldogh, 2010).

Le radical $^{\circ}\text{OH}$ est très électrophile et donc réagit préférentiellement en position 5 du cycle de la thymine ou de la cytosine. Le radical $^{\circ}\text{OH}$ peut également réagir avec le groupement méthyl de la thymine en arrachant un atome d'hydrogène conduisant à la formation d'un radical allylique. Ces radicaux formés vont réagir avec l'oxygène pour former des radicaux peroxydes. Les purines sont plus sensibles aux ERO en particulier la guanine. Le premier mécanisme conduisant à la formation de 8-OHdG à partir de la guanidine implique l'arrachement d'un électron à la guanine et la formation d'un cation radical. L'oxygène singulet conduit spécifiquement à la formation de 8-OHdG. A l'inverse du radical hydroxyle, qui peut réagir avec l'ensemble des bases, l'oxygène singulet réagit avec la guanine uniquement (Cadet *et al.*, 2010). La formation de la 8-OHdG est considérée comme un biomarqueur du stress oxydant de l'ADN (Valko *et al.*, 2006).

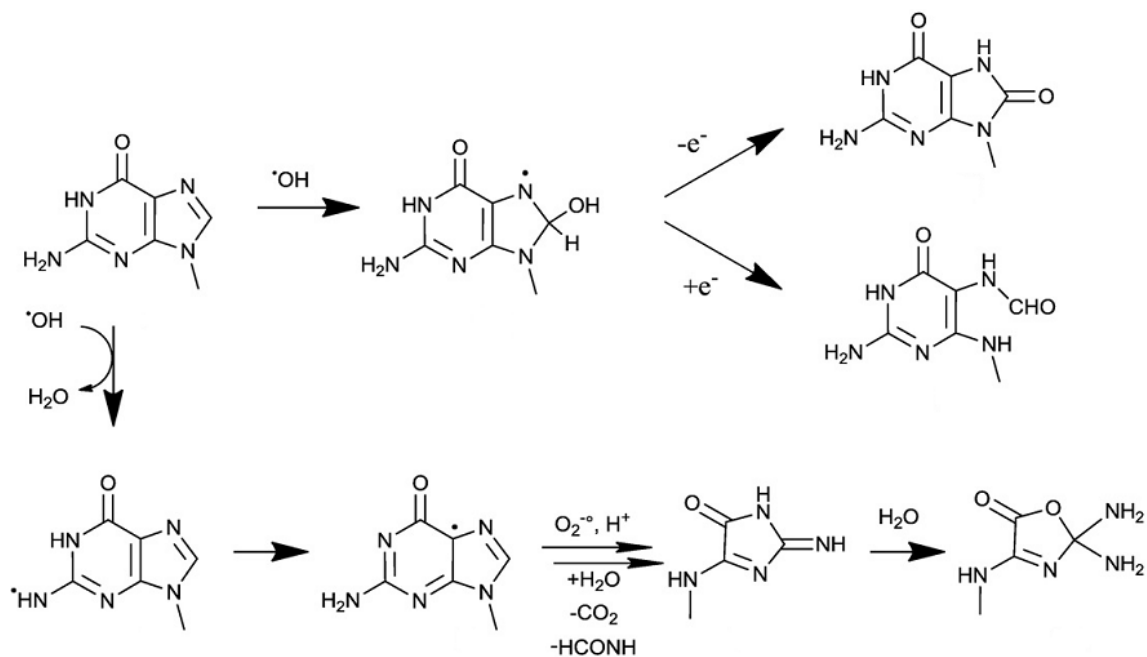


Figure 28 : Différentes voies d'oxydation de la guanine conduisant à différents produits

5 Maladies associées à un stress oxydant

Le stress oxydant est impliqué dans plusieurs pathologies comme les maladies cardiovasculaires, les maladies neurodégénératives, le diabète et le cancer mais également dans le vieillissement (Valko *et al.*, 2007; Barouki, 2006; Salmon *et al.*, 2010).

5.1 Maladies neurodégénératives

Dans la maladie d'Alzheimer, l'oxydation des lipides et des protéines est importante. L'altération de l'ADN mitochondrial et l'augmentation de l'activité Cu/Zn SOD sont décrites dans le cerveau de patients atteints de la maladie d'Alzheimer. Les ERO peuvent oxyder l'APP (amyloïde protein precursor) entraînant son dépôt et son agrégation (Smith *et al.*, 1995). Dans la maladie de Parkinson, la diminution de GSH et de l'activité du complexe-I de la chaîne respiratoire mitochondriale a été rapportée (Di Monte *et al.*, 1992).

5.2 Diabète

Une augmentation du stress oxydant a été proposée pour être une complication majeure associée à l'hyperglycémie. L'hyperglycémie stimule la production d'ERO à partir de sources variées (NADPH oxydase, cytochrome P450 monooxygénases, nitric oxyde synthase (NOS)) entraînant une auto-oxydation du glucose (Valko *et al.*, 2007).

5.3 Cancer

Dans plusieurs types de cancer l'équilibre RedOx est rompu ce qui peut provoquer une stimulation de l'oncogénèse. Le stress oxydant provoque des dommages permanents à l'ADN ce qui représente la première étape dans la mutagenèse et la carcinogénèse. Les dommages à l'ADN provoqués par les ERO peuvent être une modification des bases (oxydation, alkylation...), une coupure de la chaîne (simple ou double brin), ou encore des pontages ADN-protéines (Cadet *et al.*, 2010). La lésion à l'ADN résultant d'une oxydation, la plus étudiée est la formation de la 8-Oxo-guanine (Cadet *et al.*, 2010).

6 X-ALD, AGTLC et Oxydation

L'augmentation du stress oxydatif a été rapportée chez les patients atteints de CALD et d'AMN. Cela se traduit par une augmentation de la peroxydation lipidique (TBA-RS), une diminution de la réactivité anti-oxydante totale (TAR) dans le plasma et par une augmentation de l'activité anti-oxydante de la catalase et de la SOD (Vargas *et al.*, 2004). Le statut anti-oxydant total (TAS) est diminué chez les patients atteints d'X-ALD symptomatiques mais pas chez les patients asymptomatiques (Deon *et al.*, 2007). Au niveau du cerveau de patients atteints d'X-ALD, le stress oxydant provoque une peroxydation des lipides qui se manifeste par l'augmentation du taux de 4-HNE, qui est un aldéhyde issu de l'attaque radicalaire des acides gras polyinsaturés (AGPI) (Powers *et al.*, 2005). Récemment, des dommages aux protéines ont été également rapportés dans les cellules mononucléaires périphériques de patients atteints d'X-ALD (Fourcade *et al.*, 2010). La corrélation entre le taux d'AGTLC plasmatique et les marqueurs du stress oxydant dans le plasma n'est pas évidente (Deon *et al.*, 2008). L'expression d'iNOS est augmentée dans les astrocytes et les cellules microgliales de patients atteints d'X-ALD conduisant à une augmentation de la nitration des protéines dans les lésions inflammatoires (Gilg *et al.*, 2000). Chez les patients atteints d'X-ALD, la synthèse de plasmalogène est diminuée, or le plasmalogène a un pouvoir anti-oxydant dans le SNC (Khan *et al.*, 2008). La diminution de la synthèse de plasmalogène peut donc avoir un effet synergique avec l'accumulation d'AGTLC dans la production des ERO (Singh & Pujol, 2010). Chez les souris déficientes en Abcd1 des dommages oxydatifs sur les lipides et les protéines ont été révélés à l'âge de 3,5 mois, soit un an avant la première apparition de signes neurologiques (Fourcade *et al.*, 2008). La mitochondrie, qui est la première source d'ERO dans la cellule, est modifiée structuralement mais aussi fonctionnellement (métabolisme des AG) chez les patients atteints d'X-ALD et chez les souris déficientes en Abcd1 (Ferrer *et al.*, 2010).

7 X-ALD, AGTLC et Inflammation

L'inflammation et l'altération des réponses immunitaires existent uniquement dans la forme la plus sévère de l'X-ALD (CCALD). L'inflammation se caractérise par l'infiltration de lymphocytes T CD8+ majoritairement, mais aussi de lymphocytes CD4+ et de lymphocytes B. On observe aussi des macrophages qui se localisent dans les zones présentant une démyélinisation. L'infiltration de ces cellules est souvent accompagnée d'une rupture de la barrière hémato-méningée. Dans les zones avec démyélinisation, la microglie et les astrocytes sont hyper-réactifs et expriment la molécule CD1b (Ito *et al.*, 2001). Le CD1 est une molécule présentatrice de l'antigène lipidique aux cellules immunocompétentes. Il a donc été suggéré que l'expression de CD1 par des cellules gliales, suite à l'accumulation des AGTLC, pourrait participer à la réponse inflammatoire dans la CALD (Ito *et al.*, 2001). Une autre hypothèse proposée par Powers *et al.* (Powers *et al.*, 1992) suggère que l'excès d'AGTLC stimule les astrocytes et les macrophages et provoque la sécrétion de TNF α , ainsi que de tout un panel de cytokines conduisant à la destruction de la myéline par les lymphocytes T principalement, mais aussi par les lymphocytes B. En accord avec cette hypothèse, il a été montré une augmentation des taux d'ARNm des cytokines (INF- γ , IL-1 α , IL-12, IL-6, GM-CSF, TNF α), des chemokines et de leurs récepteurs dans les lésions cérébrales de patients atteints d'X-ALD (McGuinness *et al.*, 1997; Paintlia *et al.*, 2003).

VI Modèles d'études

Deux types de modèles sont utilisés : des modèles *in vitro* et des modèles animaux.

In vitro, plusieurs modèles (vésicules lipidiques, cultures primaires mixtes ou non, lignées cellulaires sauvages ou transfectées par des siRNA) ont été utilisés pour étudier les mécanismes d'intégration des AGTLC dans la membrane cellulaire et leur cytotoxicité. Plusieurs modèles animaux des maladies peroxysomales ont été générés afin d'étudier et de mieux comprendre la physiopathologie de ces maladies (Wanders & Waterham, 2006a).

1 *In vitro*

1.1 Vésicules lipidiques

L'équipe de James Hamilton a été la première à utiliser une approche biophysique pour étudier l'effet des AGTLC dans la membrane lipidique. Des vésicules lipidiques (bicouche lipidique de phosphatidylcholine) ou des vésicules mélangées avec de l'albumine bovine sérique (BSA) ont été utilisées pour étudier l'interaction de C26:0 avec une membrane modélisée. Il semble que la partie hydrophobe de C26:0 s'intègre profondément dans la membrane et provoque une désorganisation et une rupture de cette dernière (Ho *et al.*, 1995). L'AGTLC traverse cette membrane synthétique par un mécanisme de « flip-flop » (Pillai *et al.*, 2009).

1.2 Lignées cellulaires

Plusieurs lignées astrocytaires et oligodendrocytaires (Buntinx *et al.*, 2003; Bongarzone *et al.*, 1997; Verity *et al.*, 1993; Feutz *et al.*, 1995; Feutz *et al.*, 2001; Ghandour *et al.*, 2002) présentent un intérêt pour aborder la physiopathologie de l'X-ALD *in vitro*.

La lignée de cellules gliales des rats (C6) exprimant à la fois des marqueurs astrocytaires et oligodendrocytaires a été largement utilisée pour étudier les effets cytotoxiques du C26:0 et ses activités sur le cytosquelette, l'homéostasie lipidique et le statut oxydatif (Di Biase *et al.*, 2004; Khan *et al.*, 1998; Dobashi *et al.*, 1997).

Des lignées de fibroblastes humains établis à partir de patients atteints d'X-ALD sont disponibles et permettent d'étudier les effets de l'absence d'ALDP sur la β -oxydation peroxysomale, la cytotoxicité et les effets pro-oxydants des AGTLC (Wanders *et al.*, 1987; Ofman *et al.*, 2010; Fourcade *et al.*, 2008).

Des hépatomes de rat H4IIEC3 exprimant ALDP et peu ALDRP, transfectés stablement par un vecteur permettant d'exprimer Abcd2-EGFP normale ou mutée, sont aussi utilisés pour étudier l'aspect fonctionnel de l'ALDRP (Gueugnon *et al.*, 2006).

1.3 Cultures primaires et organotypiques

Des cultures primaires mixtes de cellules gliales (astrocytes, oligodendrocytes), avec ou sans neurones, ont été utilisées pour évaluer les effets des AGTLC sur les différents types de cellules gliales (Hein *et al.*, 2008; Khan *et al.*, 2010; Sinhg *et al.*, 2009; Gondcaille *et al.*, 2005). Les cultures primaires ou secondaires de cellules gliales ont été utilisées pour étudier l'expression des protéines peroxysomales et l'abondance des peroxysomes dans le SNC (Fouquet *et al.*, 1997). Des cultures primaires de fibroblastes (humain ou murin : sauvages ou déficients en ABCD1) ont été aussi utilisées pour mesurer la β -oxydation peroxysomale (Morita *et al.*, 2008; Petroni *et al.*, 2007; Morita *et al.*, 2005; Pettus, 2004; Oezen, 2005; Yamada *et al.*, 2004). Des cultures primaires de macrophages de souris sauvages ou déficientes en *Abcd1* (Yanagisawa *et al.*, 2008), ou des lymphocytes humains (issus de sujets sains ou de patients atteints d'X-ALD), ont été utilisés pour étudier les statuts oxydatif et inflammatoire de ces cellules, ainsi que leur vulnérabilité vis-à-vis des AGTLC (Uto *et al.*, 2008). Fourcade *et al.* ont utilisé la culture organotypique de moelle épinière de souris âgée de 18 mois (sauvage ou déficiente en *Abcd1*) pour étudier les effets pro-oxydants et les conséquences biologiques de l'accumulation des AGTLC (Fourcade *et al.*, 2008).

1.4 Utilisation des siRNA

Le siRNA est un outil de la biologie moléculaire largement utilisé pour analyser les fonctions des gènes et de leurs produits dans le fonctionnement cellulaire (Leung & Whittaker, 2005). Dans l'X-ALD, cette technique a été utilisée par plusieurs auteurs pour étudier l'implication de certains gènes peroxysomaux (famille ABCD) dans l'X-ALD. Di Benedetto *et al.* ont utilisé des siRNA pour inactiver *Abcd3* (PMP70) dans les cellules gliales C6 afin d'étudier le rôle de cette protéine dans le transport et le métabolisme des AGTLC (Di Benedetto *et al.*, 2008), mais aussi sur les effecteurs du stress oxydant et de l'inflammation (Di Benedetto *et al.*, 2008). Le rôle d'*Abcd1* et d'*Abcd2* dans des cultures primaires d'astrocytes de rat a été étudié après extinction de ces deux gènes par des siRNA (Khan *et al.*, 2010). Ces extinctions de gènes sont associées à une augmentation de 5-lipoxygénase conduisant à la synthèse de leucotirène-B4 produit à partir de l'acide arachidonique et à une diminution de glutathion réduit. Cela est en accord avec l'augmentation de 5-LOX observée au niveau des lésions cérébrales de patients atteints d'X-ALD (Khan *et al.*, 2010).

2 *In vivo*

Les pluparts des études biochimiques sur les maladies peroxysomales ont été réalisées sur des cellules de patients, en particulier sur de cultures primaires des fibroblastes de peau. Bien que ces études soient informatives; elles ne montrent pas comment et pourquoi un dysfonctionnement peroxysomal aboutit à la pathologie. Pour mieux comprendre l'incidence physiopathologique des maladies peroxysomales, un certain nombre de modèles murins ont été réalisés (Wanders & Waterham, 2006a).

2.1 Souris déficientes conventionnelles

Après l'identification du gène responsable de l'X-ALD (Mosser *et al.*, 1993), plusieurs laboratoires ont travaillé sur l'élaboration d'un modèle animal permettant de mieux comprendre la physiopathologie de l'X-ALD. Des modèles de souris ont été réalisés par invalidation du gène visé (Lu *et al.*, 1997; Forss-Petter *et al.*, 1997; Kobayashi *et al.*, 1997; Pujol, 2002). Les souris obtenues (*Abcd1*⁻) présentent l'anomalie biochimique propre à l'X-ALD (accumulation des AGTLC) ainsi que des anomalies du métabolisme du cholestérol, mais pas de manifestations phénotypiques ou neurologiques précoces. A un stade tardif de leur vie (>15mois), ces souris présentent des anomalies neurologiques (perte des axones au niveau de la moelle épinière avant la démyélinisation ce qui correspond à l'adrénomyeloneuropathie (AMN) et pas à l'adrénoleucodystrophie cérébrale (CCALD)) (Pujol, 2002; Weinhofer *et al.*, 2005). Vu la redondance fonctionnelle entre l'ALDP (ABCD1) et l'ALDRP (ABCD2) (Pujol *et al.*, 2004), des souris déficientes en *Abcd2*, ou doublement déficientes en *Abcd1* et *Abcd2* ont été élaborées (Ferrer *et al.*, 2005; Lu *et al.*, 2007). Les souris *Abcd2*^{-/-} accumulent moins d'AGTLC que les souris *Abcd1*⁻ et que les souris (*Abcd1*⁻ et *Abcd2*^{-/-}). Les souris *Abcd2*^{-/-} développent une atteinte cérébrale tardive et des signes de stress oxydant se manifestent plus précocement que chez les souris *Abcd1*⁻. Les souris (*Abcd1*⁻ et *Abcd2*^{-/-}) manifestent des signes neurologiques plus précoces qu'*Abcd1*⁻ ou *Abcd2*^{-/-} (Ferrer *et al.*, 2005; Lu *et al.*, 2007; Pujol *et al.*, 2004). Chez les souris *Abcd1*⁻ ou *Abcd2*^{-/-} aucune infiltration des lymphocytes T n'a été détectée (Ferrer *et al.*, 2010).

Pour la P-NALD, des souris modèles ont aussi été générées (*Acox1*^{-/-}). Ces souris sont infertiles avec un développement postnatal tardif. Elles présentent une stéatose hépatique et des réactions inflammatoires au niveau hépatique révélées par la présence de macrophages, de lymphocytes, d'éosinophiles et de leucocytes polymorphonucléaires (Fan *et al.*, 1996a; Fan *et al.*, 1996b).

D'autres modèles murins pour les maladies peroxysomales ont été développés (souris *Pex5*^{-/-}, *Pex2*^{-/-}, *Pex7*^{-/-}, ...) (Faust & Hatten, 1997; Baes *et al.*, 1997; Brites *et al.*, 2003). Ces inactivations miment la

physiopathologie de la maladie de Zellweger. Au niveau biochimique, ces souris présentent une accumulation d'AGTLC et une diminution de plasmalogène. Ces souris présentent des problèmes de développement postnatal, ainsi qu'une défaillance de migration neuronale et meurent précocement dès l'âge de 6 mois (Faust & Hatten, 1997; Baes *et al.*, 1997; Brites *et al.*, 2003).

2.2 Souris déficientes conditionnelles (système Cre-Lox)

Le système Cre-Lox a été utilisé pour élaborer des souris KO conditionnelles. Les modèles de souris *Pex5*^{-/-} conventionnelles (absence de peroxysomes fonctionnels) montrent des anomalies métaboliques et neurologiques (Baes *et al.*, 1997). Afin de déterminer les rôles des peroxysomes en fonction des tissus et du type cellulaire des lignées, des souris *Pex5*^{-/-} conditionnelles ont été produites en utilisant le système Cre-Lox. Les souris *Nestine-Pex5*^{-/-} (absence des peroxysomes dans les cellules gliales et les neurones) montrent une initiation de neurodégénérescence et mort cellulaire très précoce, dès 6 mois (Hulshagen *et al.*, 2008). Des souris *CNPase-Pex5*^{-/-} (absence des peroxysomes dans les oligodendrocytes) montrent des troubles neurologiques précoces, des réactions inflammatoires et une mort précoce entre 6 et 12 mois (Kassman *et al.*, 2007). Les souris *NEX-Pex5*^{-/-} (absence des peroxysomes dans les neurones) et les souris *GFAP-Pex5*^{-/-} (absence de peroxysomes dans les astrocytes) ne montrent pas de dégénérescences avant l'âge de 20 mois (dégénérescence très tardive) (Bottelbergs *et al.*, 2010). C'est grâce à ces modèles qu'il a été établi que les peroxysomes sont essentiels au bon fonctionnement du système nerveux central et que leur fonctionnement a plus ou moins d'incidence en fonction du type cellulaire considéré. Les oligodendrocytes, cellules synthétisant la myéline, étant les plus sensibles aux dysfonctionnements peroxysomaux. La différence d'agressivité neuroinflammatoire et dégénérative d'un modèle à l'autre souligne une éventuelle compensation fonctionnelle du peroxysome entre les différents types cellulaires du SNC. En conclusion, les souris *Abcd1*⁻ (modèle de l'X-ALD), bien qu'ayant des taux d'AGTLC plasmatique et tissulaire élevés, ne manifestent aucuns signes neurologiques comparables à ceux observés chez les patients. Les souris *Pex5*^{-/-} (modèle du syndrome de Zellweger) présentent des anomalies biochimiques, histologiques et neurologiques identiques à celles observées chez les patients CCALD. Ceci permet d'utiliser ces souris comme modèle afin d'aborder la transition entre une maladie métabolique et une maladie neurodégénérative sévère.

OBJECTIFS

OBJECTIFS

L'X-ALD se caractérise par un phénomène de démyélinisation inflammatoire. La myéline, synthétisée par les oligodendrocytes, est un complexe lipoprotéique (composé à 70% de lipides et à 30% de protéines) qui sert à protéger les axones et à les isoler électriquement permettant ainsi la bonne conduction de l'influx nerveux. (Vargas *et al.*, 2004; Hudspeth & Raymond, 2007). L'identification de cellules apoptotiques au niveau des zones péri-lésionnelles d'X-ALD suggère que la mort cellulaire pourrait contribuer à l'évolution de cette pathologie (Eichler *et al.*, 2008)

La P-NALD est associée à une déficience enzymatique en AcylCoA oxydase 1 (ACOX 1) qui catalyse l'étape initiale et limitante de la β -oxydation des acides gras à très longue chaîne (AGTLC) (Fournier *et al.*, 1994).

La caractéristique biochimique majeure de l'X-ALD et de la P-NALD est l'accumulation tissulaire et plasmatique d'AGTLC (C24:0 et C26:0). Les effets des ces AGTLC sur les oligodendrocytes (cellules productrices de la myéline) ne sont pas encore clairement elucidés actuellement (Kemp & Wanders, 2010). Dans le cadre de l'X-ALD et de la P-NALD, il est donc important de préciser les relations entre peroxysomes, accumulation d'AGTLC, mort cellulaire en relation avec la cytotoxicité des AGTLC, démyélinisation, oxydation et inflammation. La compréhension de ces mécanismes de démyélinisation constitue en effet un challenge majeur pour développer des traitements efficaces dans ces pathologies.

Mon sujet de Thèse de Doctorat intitulé « Activités cytotoxiques et pro-oxydantes d'acides gras à très longue chaîne sur des oligodendrocytes murins sauvages et déficients en Abcd1 et Acox1 : application à la physiopathologie de l'X-ALD et de la P-NALD » s'inscrit dans la cadre d'un projet qui vise à identifier et à mieux comprendre les mécanismes impliqués dans la physiopathologie de l'X-ALD et de la P-NALD.

Pour répondre à certaines de ces questions, mes travaux de recherche ont consisté :

- 1) A caractériser une lignée d'oligodendrocytes murins (158N) constituant l'outil biologique nécessaire à la réalisation de l'étude,
- 2) A étudier les mécanismes de cytotoxicité des AGTLC (C24:0, C26:0) sur les oligodendrocytes 158N,
- 3) A évaluer les éventuels effets pro-oxydants associés à l'accumulation intracellulaire de ces AGTLC,
- 4) A préciser les effets des AGTLC sur différents organelles cellulaires (mitochondrie, lysosome),

OBJECTIFS

- 5) A définir l'impact des AGTLC sur la synthèse des protéines majeures de la myéline (PLP (proteolipid protein) et MBP (myelin basic protein)),
- 6) A déterminer les conséquences de l'inactivation d'Abcd1 et/ou d'Acox1 sur la mort cellulaire, le stress oxydant et l'expression des protéines majeures de la myéline (PLP, MBP),
- 7) A partir des résultats obtenus *in vitro*, à rechercher des biomarqueurs plasmatiques du stress oxydant permettant de distinguer les différentes formes d'X-ALD.

RESULTS

I Article 1 : Peroxisomal and Mitochondrial Status of Two Murine Oligodendrocytic Cell Lines (158N, 158JP): Potential Models for the Study of Peroxisomal Disorders Associated with Dysmyelination Processes

Mauhamad Baarine, Kévin Ragot, Emmanuelle C. Genin, Hammam El Hajj, Doriane Trompier, Pierre Andréoletti, Said Ghandour, Franck Ménétrier, Mustapha Cherkaoui-Malki, Stéphane Savary, Gérard Lizard.

1 Introduction

Les oligodendrocytes (OL) sont les cellules qui assurent la myélinisation au niveau du SNC. Ils sont générés par des précurseurs d'oligodendrocytes (OPCs) qui sont des cellules multipotentes provenant des zones germinales du SNC ([Dugas *et al.*, 2006](#)). La maturation des OL est un mécanisme complexe avec un programme de prolifération, de migration, de différenciation et de myélinisation, bien contrôlé dans le temps et dans l'espace. L'exécution de ce programme conduit à la formation d'une cellule mature capable de produire la myéline (gaine isolante des axones). En raison de leur programme complexe de différenciation et de leur métabolisme spécifique très actif, les oligodendrocytes sont les cellules les plus vulnérables du SNC ([Bradl & Lassmann, 2010](#)).

La différenciation des précurseurs oligodendrocytaires (OPCs) est caractérisée par de nombreux changements phénotypiques (évolution de la morphologie cellulaire) et antigéniques (expression séquentielle des marqueurs spécifiques) ([Figure 29](#)). L'expression différentielle de protéines oligodendrocytaires au cours de la maturation des OL permet de les utiliser comme des marqueurs de différenciation ([Deloulme *et al.*, 2004](#)) ([Figure 29](#)).

RESULTATS

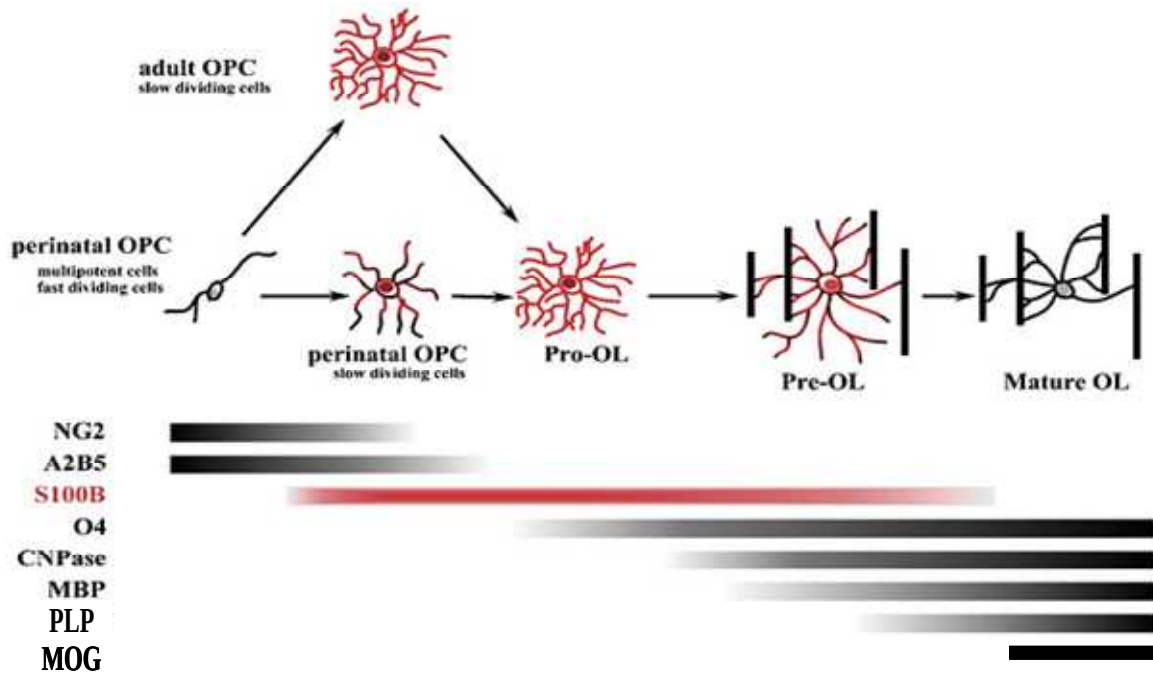


Figure 29 : Différenciation et maturation des oligodendrocytes (OL).

(MBP : myelin basic protein ; PLP : proteolipid protein; O4 : Antigène de surface de précurseurs d'oligodendrocytes; A2B5 et NG2 marqueurs de précurseurs d'oligodendrocytes; CNPase : 2', 3'-cyclic nucleotide 3-phosphohydrolase) (Deloulme et al., 2004).

Actuellement, plusieurs lignées d'OL (humain, rat, souris) ont été constituées mais celles-ci présentent le plus souvent des caractéristiques morphologiques et antigéniques d'OL immatures (Buntinx et al., 2003; Bongarzone et al., 1997; Verity et al., 1993). La culture primaire mixte de neurones et de cellules gliales (astrocytes, oligodendrocytes) a aussi souvent été utilisée pour évaluer les effets de certains produits (Hein et al., 2008).

Dans ce premier article, nous décrivons les caractéristiques ultrastructurales, antigéniques et fonctionnelles des deux lignées cellulaires oligodendrocytaires (158 N et 158 JP) initialement établies par l'équipe du Dr. Saïd M Ghandour à l'université de Strasbourg (Ghandhour et al., 2002; Feutz et al., 2001; Feutz et al., 1995).

Nous avons précisé l'état de maturation oligodendrocytaire de ces cellules en étudiant l'expression de protéines de la myéline (MOG, PLP, MBP) et de la CNPase exprimées par les pré-OL et les OL matures. Chez l'Homme, le gène *plp* qui code pour la protéine majeure de la myéline ou PLP (proteolipid protein) est localisé sur le chromosome X. Par épissage alternatif, *plp* donne lieu à deux isoformes PLP et DM20 qui constituent 50% des protéines totales de la myéline (Nave, 1994). Chez l'Homme, une mutation du gène *plp* peut induire une importante hypomyélinisation qui conduit à la pathologie de Pelizaeus-Merzbacher. Chez la souris, la mutation *jimpy* qui affecte l'expression de la PLP et du DM20 induit aussi une

RESULTATS

hypomyélinisation, une diminution du nombre d'OL et la mort précoce des souris mutantes (Nave, 1994). MBP représente 30% des protéines myéliniques (Hu & Isrealachvili, 2007). Il existe plusieurs isoformes obtenues par épissage alternatif du gène localisé sur le chromosome 18 chez l'Homme et la souris (Boggs, 2006).

PLP et MBP jouent un rôle important dans la stabilisation et la compaction de la myéline (de Vries & Hoekstra, 2000). MOG constitue moins de 0,1 % des protéines myéliniques. Cette protéine est présente dans le SNC, essentiellement à la surface des enroulements myéliniques et des prolongements oligodendrocytaires. MOG est hautement immunogène et constitue un auto-antigène clé dans la sclérose en plaque (Clements *et al.*, 2003). MOG contribue à la maturation et à la maintenance de la myéline (Birling *et al.*, 1993) et c'est la dernière des protéines myéliniques à être exprimée. Son expression est donc une preuve de différenciation oligodendrocytaire terminale. La CNPase constitue 4-5% des protéines de la myéline. C'est un marqueur spécifique des stades précoces du développement oligodendrocytaire. Elle joue un rôle dans la structuration de la myéline (Yin *et al.*, 1997).

Nous avons également déterminé l'expression de protéines peroxysomales (Abcd 1, Abcd 2, Abcd 3, Acox1 et L-PBE) par cytométrie en flux, Western blot et/ou RT-qPCR; ainsi que l'activité mitochondriale et le statut oxydatif de ces deux lignées en prenant en compte la production de radicaux oxygénés, le taux de glutathion réduit (GSH) et la masse mitochondriale. En effet, pour utiliser ces cellules afin d'aborder la physiopathologie de l'X-ALD et de la P-NALD, il était important de déterminer l'expression de ces ABC transporteurs peroxysomaux et de l'Acox1.

Nous avons aussi recherché la présence de peroxysomes fonctionnels par microscopie électronique à transmission et mesuré l'activité enzymatique de la catalase et de l'Acox1. La fonctionnalité des peroxysomes des OL 158N et 158JP a aussi été abordée en traitant les cellules avec du phénylbutyrate qui est connu pour induire une prolifération des peroxysomes. Les différences mitochondriales observées entre 158N et 158JP, nous ont incité à préciser la localisation de PLP (susceptible de moduler l'activité mitochondriale transmembranaire) par rapport à la mitochondrie par microscopie confocale associée à l'analyse d'images.

Cette étude a permis d'établir que :

- les cellules 158N et 158JP expriment fortement les marqueurs PLP, MBP, MOG et CNPase. Ces cellules sont donc des OL présentant des caractéristiques d'OL matures.

RESULTATS

- Les cellules 158N et 158JP ont des peroxysomes fonctionnels (activité catalase et Acox1).
- Les cellules 158N expriment les transporteurs Abcd1 et Abcd3 alors que les cellules 158JP expriment à la fois Abcd1, Abcd2 et Abcd3.
- Les cellules 158N et 158JP expriment aussi Acox1 et L-PBE impliquées dans la β -oxydation peroxysomale des AGTLC.
- Les cellules 158N et 158JP présentent des différences fonctionnelles au niveau de la mitochondrie et du statut oxydatif qui pourraient impliquer la mutation *jimpy*.

En conclusion, les cellules 158N et 158JP, et en particulier les 158N, constituent un modèle intéressant pour aborder les relations entre peroxysome, mitochondrie et marqueurs myéliniques afin de mieux comprendre la physiopathologie de l’X-ALD et de la P-NALD.

Peroxisomal and mitochondrial status of two murine oligodendrocytic cell lines (158N, 158JP): potential models for the study of peroxisomal disorders associated with dysmyelination processes

Mauhamad Baarine,*† Kevin Ragot,*† Emmanuelle C. Genin,*† Hammam El Hajj,*† Doriane Tromprier,*† Pierre Andreoletti,*† M. Said Ghandour,‡ Franck Menetrier,§ Mustapha Cherkaoui-Malki,*† Stephane Savary*† and Gerard Lizard*†

*Centre de Recherche INSERM, Dijon, France

†Université de Bourgogne, Faculté des Sciences Gabriel, Centre de Recherche Lipides, Nutrition, Cancer-Laboratoire de Biochimie Métabolique et Nutritionnelle (LBMN), GDR CNRS, Dijon, France

‡Biopathologie et Imagerie de la Myéline, UMR CNRS/ULP Laboratoire d'Imagerie et de Neurosciences Cognitives (LINC), Université Louis Pasteur, Faculté de Médecine, Strasbourg, France

§IFR Santé/STIC INSERM, Centre de Microscopie Préparative Appliqué à la Biologie et à la Médecine, Dijon Cedex, France

Abstract

In some neurodegenerative disorders (leukodystrophies) characterized by myelin alterations, the defect of peroxisomal functions on myelin-producing cells (oligodendrocytes) are poorly understood. The development of *in vitro* models is fundamental to understanding the physiopathogenesis of these diseases. We characterized two immortalized murine oligodendrocyte cell lines: a normal (158N) and a jimpy (158JP) cell line mutated for the proteolipid protein PLP/DM20. Fluorescence microscopy, flow cytometry, and western blotting analysis allow to identify major myelin proteins (PLP colocalizing with mitochondria; myelin basic protein), oligodendrocyte (CNPase and myelin oligodendrocyte glycoprotein), and peroxisomal markers [adrenoleukodystrophy protein, PMP70, acyl-CoA oxidase 1 (ACOX1), L-peroxisomal bifunctional enzyme, and catalase]. Using electron microscopy, peroxisomes were identified in the two cell lines. Gene

expression (ATP-binding cassette, *Abcd1*, *Abcd2*, *Abcd3*, and *Acox1*) involved in peroxisomal transport or β -oxidation of fatty acids was evaluated using quantitative PCR. 4-phenylbutyrate treatment increases expression of ACOX1, L-peroxisomal bifunctional enzyme, PLP, myelin oligodendrocyte glycoprotein, and CNPase, mainly in 158N cells. In both cell lines, 4-phenylbutyrate-induced ACOX1 and catalase activities while only *Abcd2* gene was up-regulated in 158JP. Moreover, the higher mitochondrial activity and content observed in 158JP were associated with higher glutathione content and increased basal production of reactive oxygen species revealing different redox statuses. Altogether, 158N and 158JP cells will permit studying the relationships between peroxisomal defects, mitochondrial activity, and oligodendrocyte functions.

Keywords: mitochondria, murine oligodendrocytes, myelin, peroxisome.

J. Neurochem. (2009) **111**, 119–131.

Received May 19, 2009; revised manuscript received July 15, 2009; accepted July 17, 2009.

Address correspondence and reprint requests to Dr Gérard Lizard, CR INSERM 866, Faculté des Sciences Gabriel, 6 Bd Gabriel, Dijon 21000, France. E-mail: Gerard.Lizard@u-bourgogne.fr

Abbreviations used: 4-PBA, 4-phenylbutyrate; $\Delta\Psi_m$, mitochondrial potential; ABC, ATP-binding cassette; ACOX1, acyl-CoA oxidase 1; ALD, adrenoleukodystrophy; ALDP, adrenoleukodystrophy protein; Ct,

cycle threshold; DHE, dihydroethidium; L-PBE, L-peroxisomal bifunctional enzyme; MBP, myelin basic protein; MCB, monochlorobimane; MOG, myelin oligodendrocyte glycoprotein; NAO, nonylacridine orange; PBS, phosphate-buffered saline; PLP, proteolipid protein; PMP70, peroxisomal membrane protein of 70 kDa; P-NALD, pseudo-neonatal adrenoleukodystrophy; ROS, reactive oxygen species; SDS, sodium dodecyl sulfate; TBST, Tris-buffered saline containing Tween 20; VLCFA, very-long-chain fatty acids; X-ALD, X-linked adrenoleukodystrophy.

Peroxisomes are single cell membrane organelles ensuring essential cellular functions, particularly in lipid metabolism (Wanders and Waterham 2006a; Schrader and Fahimi 2008). These organelles are involved in the β -oxidation process of long- and very-long-chain fatty acids (LCFA and VLCFA), branched-chain fatty acids, unsaturated fatty acids, and dicarboxylic acids (Nguyen *et al.* 2008). They participate in the α -oxidation of phytanic acid, the biosynthesis of bile acids, and the degradation of leukotrienes (Schrader and Fahimi 2008). They are also involved in the synthesis of specific fatty acids, such as docosahexaenoic acid (C22:6 $n - 3$), which are essential for the brain and the retina, as well as the synthesis of plasmalogens, which play essential roles in the growth of neural cells and are important components of myelin, a complex of proteins and lipids (30% proteins and 70% lipids) (Haraux *et al.* 2004; Hörster *et al.* 2005). In the CNS, the myelin sheath is formed by membranes that extend from oligodendrocytes that wrap concentrically around nerve fibers, thereby insulating them and facilitating rapid transmission of nerve impulses (Haraux *et al.* 2004). Consequently, alteration of peroxisomal functions induces lipid modifications that are detrimental for the development and functions of the nervous system.

Besides peroxisome biogenesis disorders (Schrader and Fahimi 2008), several disorders associated with a single defect in the β -oxidation process have been described. They are characterized by either developmental or degenerative pathologies, in particular in the CNS and PNS (Wanders and Waterham 2006a). These pathologies are usually characterized by a dysmyelination of the white matter belonging to the so-called leukodystrophies and are characterized by the accumulation of VLCFA in plasma and tissues because of an impaired β -oxidation in peroxisomes and/or increased elongation (Wanders and Waterham 2006b). X-linked adrenoleukodystrophy (X-ALD, OMIM 300100), the most frequent leukodystrophy, affects either young boys (cerebral childhood ALD, 40% of the cases) leading to a vegetative state or death, or adults (adrenomyeloneuropathy 50% of the cases). X-ALD is caused by mutations in the *ABCD1* gene located in Xq28 (Berger and Gartner 2006; Kemp and Wanders 2007) encoding a peroxisomal ATP-binding cassette (ABC) half-transporter called the adrenoleukodystrophy protein (ALDP), which participates in the entry of VLCFA-CoA into the peroxisome. Cerebral childhood ALD is associated with a strong inflammatory reaction and inducible nitric oxide synthase induction in the CNS white matter (Paintlia *et al.* 2003). Pseudo-neonatal adrenoleukodystrophy (P-NALD; OMIM 264470), characterized by a generalized hypotonia and severe delayed motor development, is caused by mutations in the gene encoding the peroxisomal straight-chain acyl-CoA oxidase 1 (ACOX1) located in 17q25. P-NALD is associated with an enzymatic deficiency of ACOX1, which catalyzes the first and rate-limiting step of straight-chain fatty acid β -oxidation (Poll-The *et al.* 1988; Jia *et al.* 2004).

Understanding the mechanism of dysmyelination in these disorders is a major challenge to further developing efficient treatments and/or improving the quality of life of these patients, particularly X-ALD patients. While the mice models deficient in ALDP or ACOX1 do not mimic the human pathologies as they do not develop alterations in the CNS (Forss-Petter *et al.* 1997), it has been reported that the selective absence of peroxisomes in oligodendrocytes in *CNP-Pex5* knockout mice causes progressive demyelination (Kassmann *et al.* 2007). Similarly, in *Nes-Pex5* knockout mice, a clear reduction in myelin fibers is observed (Hulshagen *et al.* 2008). Consequently, it is important to clarify the relationships between the peroxisomal deficiencies in oligodendrocytes, the VLCFA accumulation, and the dysmyelination process. Currently, several human and murine oligodendrocytic cell lines have been established, and those expressing major myelin proteins could constitute interesting biological models to study these relationships. However, most of these cell lines [human oligodendrial cell lines myelin oligodendrocyte glycoprotein (MOG), MO3.13, and KG-1C (Buntinx *et al.* 2003); clones JP1.1 and JP1.2, obtained by immortalization of oligodendrocytes from jimpy mice with the temperature-sensitive Simian Virus 40 (SV-40) large T antigen (Bongarzone *et al.* 1997); the mouse oligodendrocyte cell lines N20.1 and N19 obtained by immortalization of oligodendrocytes from normal mice (Verity *et al.* 1993)] present oligodendrocytic precursor phenotypes. Interestingly, two murine oligodendrocytic cell lines, 158N and 158JP, obtained by immortalization with the Simian Virus 40 (SV-40) large T antigen of oligodendrocytes from normal and jimpy mice, respectively, show phenotypes of well-differentiated oligodendrocytes (Feutz *et al.* 1995, 2001; Ghandour *et al.* 2002). Jimpy mice are characterized by a single mutation (A-to-G) at the splice acceptor site of exon 5 of the proteolipid protein *PLP/DM20* gene, producing a deletion of the entire exon 5 and a translation frame shift of the mRNA, which results in a modified C-terminus in the jimpy PLP and of its isoform DM20 (Macklin *et al.* 1987). The 158N and 158JP cells express the main markers of well-differentiated oligodendrocytes: carbonic anhydrase II, galactocerebroside, and the major myelin proteins, PLP and the myelin basic protein (MBP) known to account for 50% and 30% of myelin proteins, respectively (Haraux *et al.* 2004; Taylor *et al.* 2004). So, these cell lines could be suitable *in vitro* models to study the side effects resulting from an intracellular accumulation of VLCFA on the synthesis of major myelin proteins.

To define whether these cells can be useful to study the relationships between VLCFA accumulation, peroxisomal activity, and the expression of the major myelin proteins, we characterized their peroxisomal equipment by transmission electronic microscopy and analyzed the expression of oligodendrocytic and peroxisomal markers at the transcriptional and/or translational levels by various methods (fluoro-

rescence microscopy, flow cytometry, western blotting, and real-time PCR). We were interested in myelin proteins including PLP and MBP, in markers of differentiated oligodendrocytes (CNPase and MOG), as well as in several peroxisomal markers [ALDP (ABCD1), adrenoleukodystrophy related protein (ALDRP) (ABCD2) and peroxisomal membrane protein of 70 kDa (PMP70) (ABCD3), L-peroxisomal bifunctional enzyme (L-PBE), ACOX1, and catalase]. Catalase and ACOX1 activities were also quantified by spectrophotometry and fluorimetry, respectively. Moreover, we tested the ability of 158N and 158JP cells to respond to 4-phenylbutyrate (4-PBA) known to induce peroxisome proliferation and peroxisomal genes (Gondcaille *et al.* 2005) and to be efficient in reducing VLCFA accumulation in the brain of *Abcd1*-null mice (Kemp *et al.* 1998). In addition, as the mitochondrial and redox status can be modified in the case of *ABCD1* deficiency and/or VLCFA accumulation (Fourcade *et al.* 2008; Hein *et al.* 2008), mitochondrial activity and content as well as redox status were measured by flow cytometry. Finally, as abnormal PLP expression leading to demyelination can modulate mitochondrial activity (Bongarzone *et al.* 2001), the interaction of PLP with mitochondria was investigated by laser scanning confocal microscopy.

Materials and methods

Reagents

Antibodies raised against MBP (ab53294), PLP (ab28486), and catalase (ab16771) were purchased from Abcam (Abcam, Paris, France); PMP70 antibodies (71-8300) from Invitrogen (Cergy-Pontoise, France); MOG antibodies (MAB2439) from R&D Systems (Minneapolis, MN, USA); CNPase antibodies (C5922) from Sigma-Aldrich (St Louis, MO, USA). Antibodies against ACOX1 and L-PBE have been described elsewhere (Huin *et al.* 2002) and were produced in the laboratory by Prof. Cherkaoui-Malki. Antibodies raised against ALDP (serum 1664) were a generous gift from Prof. Aubourg (INSERM, Paris, France) (Fouquet *et al.* 1997). The following dyes were used: Hoechst 33342 and H₂-DCFDA (Sigma-Aldrich); dihydroethidium (DHE), nonylacridine orange (NAO), Mitotracker Red, and 3,3'-diethyloxycarbocyanine iodide [DiOC₆(3)] (Molecular Probes, Eugene, OR, USA/Invitrogen); monochlorobimane (MCB) (Biochemica, St. Louis, MO, USA). The Amplex Red catalase assay kit was from Invitrogen. The 4-PBA used was from Sigma-Aldrich.

Cells, cell cultures, and cell treatments

Murine oligodendrocytic cells 158N and 158JP (Feutz *et al.* 2001) were seeded at 5000–10 000 cells/cm² either in 75-cm² culture flasks or in Petri dishes (100 mm in diameter) in Dulbecco's modified Eagle's medium supplemented with 5% (v/v) heat inactivated fetal bovine serum (PANTM Biotech GmbH, Aidenbach, Germany). Cells were incubated at 37°C in a wet atmosphere containing 5% CO₂. The conditions of treatment with 4-PBA were the following. After plating cells in culture flasks for 24 h, cells were treated for 72 h with 2.5 mM of 4-PBA.

Transmission electron microscopy of peroxisomes and mitochondria

Transmission electron microscopy was used to visualize peroxisomes and mitochondria in 158N and 158JP cells cultured in the absence or in the presence of 4-PBA (2.5 mM, 72 h). Hepatic sections of 9- to 10-week-old C57 Black/6 males were used as positive controls for peroxisomal analysis. For peroxisomal localization, cells and tissue sections were prepared as follows (Schrader *et al.* 1994). The samples were fixed for 1 h at 4°C in 2.5% (w/v) glutaraldehyde diluted in cacodylate buffer (0.1 M, pH 7.4), washed in cacodylate buffer (0.1 M, pH 7.4), incubated in the dark for 1 h at 21°C in Tris-HCl (0.05 M, pH 9.0) containing diaminebenzidine (2.5 mg/mL) and H₂O₂ (10 µL/mL of a 3% solution), washed in cacodylate buffer (0.1 M, pH 7.4) for 5 min at 21°C, post-fixed in 1% (w/v) osmium tetroxide diluted in cacodylate sodium (0.1 M, pH 7.4) for 1 h at 21°C in the dark, and rinsed in cacodylate buffer (0.1 M, pH 7.4). The preparations were then dehydrated in graded ethanol solutions and embedded in Epon. Ultra-thin sections were cut with an ultramicrotome, contrasted with uranyl acetate and lead citrate, and examined under an H7500 electron microscope (Hitachi, Tokyo, Japan).

Immunofluorescence staining procedures, and antigen analysis by conventional fluorescence microscopy, laser scanning confocal microscopy, and flow cytometry

Immunofluorescence staining was performed on cells seeded at 10 000 cells/cm² on 12-mm glass coverslips. After 3 days of culture, cells were fixed with 2% *p*-formaldehyde for 5–15 min at 21°C or with 2.5% glutaraldehyde for 1 h at 4°C, washed with phosphate-buffered saline (PBS), pre-incubated with FACS permeabilizing solution (BD-Biosciences, San Jose, CA, USA) for 5 min at 21°C, and incubated with blocking buffer (PBS, 0.05% saponine; Sigma-Aldrich), 10% goat or bovine serum (PANTM Biotech GmbH) for 20 min at 21°C. After washing in PBS, cells were incubated for 1 h at 21°C with the following primary antibodies (mouse monoclonal antibodies raised against CNPase, catalase, used at 1/100; rabbit polyclonal antibodies directed against MBP, PLP, and PMP70 (ABCD3); ACOX1 and L-PBE, and ALDP (ABCD1) used at 1/60, 1/200, 1/200, 1/100, 1/100, and 1/100, respectively; a rat monoclonal antibody recognizing MOG used at 1/100) diluted in blocking buffer, washed in PBS, and then incubated for 30 min either with a 488-Alexa (or a 594-Alexa) goat anti-rabbit, anti-mouse, or anti-rat used at 1/300. Nuclei were counter-stained with Hoechst 33342 used at 2 µg/mL. After washing with PBS, slides were mounted, observations were made with an Axioskop Zeiss microscope, and digitalized images were obtained with an AxioCam Zeiss camera (Zeiss, Jena, Germany). To investigate the colocalization between mitochondria and PLP, cells were incubated with Mitotracker Red (100 nM, 15 min, 37°C), which stains mitochondria before the immunostaining procedure. Digital images acquisitions were collected with an SP2 AOBs confocal laser microscope (Leica, Wetzlar, Germany) equipped for epifluorescence microscopy. Alexa 488, Mitotracker Red, and Hoechst 33342 were excited with an argon ion laser, a Helium-Neon laser, and a blue diode, respectively. The objective magnification was 40x with a 1.25 numerical aperture Plan Apochromatic oil immersion objective for high resolution (Lizard *et al.* 1994). Optical sections were obtained at 0.2 µm along the optical axis, and each plane consist of

1024 × 1024 pixels. Laser and diode powers and detection gains were set up such that signals from single-stained controls would not appear in adjacent channels. The focal plane of maximal PLP expression within the cells was selected to maximize the probability of detection of colocalization with mitochondria (Santos *et al.* 2000). For colocalization of PLP and mitochondria, the IMAGEJ software was used (ImageJ, NIH, Bethesda, MA, USA).

For flow cytometric analyses, cells were collected by trypsinization (0.25% trypsin/EDTA solution) (Sigma-Aldrich), washed and mixed in PBS, and fixed in freshly prepared 2% (w/v) *p*-formaldehyde diluted in PBS, pH 7.4, for 10 min at 21°C. Furthermore, the cells were treated with the FACS permeabilizing solution 2 (BD-Biosciences) for 10 min. After washing in PBS, cells were incubated for 20 min with blocking buffer (PBS, 0.05% saponine, 10% goat serum), washed in PBS, and incubated for 1 h at 21°C with the appropriate primary antibody (mouse monoclonal antibodies raised against CNPase, catalase, used at 1/100; rabbit polyclonal antibodies directed against MBP, PLP, PMP70, ACOX1, L-PBE, and ALDP used at 1/60, 1/200, 1/200, 1/100, 1/100, and 1/100, respectively; a rat monoclonal antibody recognizing MOG used at 1/100) diluted in blocking buffer. Then, cells were washed twice with PBS and incubated for 1 h at 21°C either with a 488-Alexa goat anti-rabbit, -mouse, or -rat antibodies used at 1/300, 1/300 and 1/200, respectively. For the different secondary antibodies used, conjugated controls were performed. Cells were washed and mixed in PBS, and immediately analyzed by flow cytometry on a GALAXY flow cytometer (Partec, Münster, Germany). The green fluorescence of 488-Alexa was collected with a 520/10-nm band pass filter. The fluorescent signals were measured on a logarithmic scale. For each sample, 10 000 cells were acquired (dead cells and debris were excluded from the analysis by gating on living cells with the size/structure density plots), and the data were analyzed with FLOWMAX (Partec) and FLOWJO softwares (FlowJo Inc., Ashland, OR, USA).

Protein extraction and western blot analysis

Cells obtained after 3–4 days of culture were trypsinized (0.25% trypsin/EDTA solution), washed with PBS, and lysed in a radioimmunoprecipitation assay (RIPA) buffer [Tris-HCl 0.05 M, pH 8, NaCl 0.15 M, sodium dodecyl sulfate (SDS) 0.1%, Na desoxycholate 0.5%, Nonidet®P-40 (Sigma-Aldrich) 1%, NaF 50 mM, and EDTA 2 mM] in the presence of a complete protease inhibitor cocktail (Roche Diagnostics Inc., Basel, Switzerland) for 20 min on ice. Cell homogenates were cleared by 15 min centrifugation at 20 000 g. The supernatant was collected and used for gel electrophoresis associated with the immunoblot assay. The protein concentration of the samples was determined using the Bio-Rad DC protein assay kit (Ivry-sur-Seine, France), and bovine serum albumin was used as standard. Forty micrograms of total protein extract were diluted in loading buffer 1x (Tris-HCl, 125 mM, pH 6.8, 16% glycerol, 8% β-mercaptoethanol, 4% SDS, and 0.003% bromophenol blue). Proteins were further separated by electrophoresis on a 10% polyacrylamide SDS-containing gel and transferred onto a polyvinylidene difluoride membrane (Bio-Rad). After blocking non-specific sites for 2 h with 5% skim milk and 1% bovine serum albumin in 1x Tris-buffered saline containing Tween 20 (TBST; 10 mM Tris-HCl, 0.1% Tween 20, and 150 mM NaCl, pH 8), the membranes were incubated overnight at 4°C with various primary antibodies diluted in TBST, raised either against mice

ALDP (1/300), ACOX1 (1/500), or L-PBE (1/200). After washing the membrane with TBST, it was incubated with horseradish peroxidase-conjugated anti-rabbit IgG (1/10 000) for 1 h at 21°C. The membranes were then washed with TBST and revealed using an enhanced chemiluminescence detection kit (Amersham, Louisville, CO, USA) and autoradiography.

Enzymatic activities: acyl-CoA oxidase 1 and catalase

To perform enzymatic activity, the protein extract was prepared on 8–30 × 10⁶ cells. Cells were mixed in 7.5 mL PBS containing a mixture of protease inhibitors (Roche Diagnostics Inc.), and three successive freezing and thawing cycles were performed. The samples were sonicated, centrifuged (50 000 g, 30 min), and the supernatant was collected. ACOX1 activity was assayed by a fluorimetric assay as described by Oaxaca-Castillo *et al.* The reaction mixture (200 µL) contained Tris buffer (50 mM, pH 8.3), homovanillic acid (0.75 mM), horseradish peroxidase (20 µg/mL), and acyl-CoA substrate (palmitoyl-CoA at 50 µM final concentration). The reactions were started by the addition of 5–20 µL of enzymatic solution. Catalase activity was quantified with the Amplex Red Catalase Assay Kit (Invitrogen) which uses the highly fluorescent oxidation product, resorufin. The absorbance of resorufin-formed solution was measured at 570 nm using a spectrophotometer (Serlabo Technologies, Entraigues sur la Sorgue, France). One unit of the enzyme is defined as 1 µmol of H₂O₂ consumed per minute and the specific activity is reported as units per milligram of protein.

Quantitative RT-PCR

Cells were harvested with 0.25% trypsin/EDTA and washed with PBS. Total RNA from oligodendrocytes (158N or 158JP) was extracted using the RNeasy Mini kit (Qiagen, Valencia, CA, USA) following the manufacturer's instructions. cDNA was generated by reverse transcription using QuantiTect Rev. Transcription Kit (Qiagen) according to the manufacturer's protocol and analyzed by quantitative PCR using the SYBR Green real-time PCR technology, and an iCycler iQ Real-Time Detection System (Bio-Rad). The primer sequences (*Abcd1*: forward, 5'-ACATCCCTATCATCACACCCACTG-3' and reverse, 5'-GAGAACTCTTGCCACAGCCATTG-3'; *Abcd2*: forward, 5'-GTTCAAAGAGAAGGAGGATGGGATG-3' and reverse, 5'-TGCTCACGGCACTGGTACATTC-3'; *Abcd3*: forward, 5'-GCTGGGCGTGAAATGACTAGATTG-3' and reverse, 5'-CCTTCTCCTGTTGTGACACCATTG-3'; *Acox1*: forward, 5'-GCCCAACTGTGACTTCCATT-3' and reverse, 5'-GGCATGTAACCCGTAGCACT-3'; and *β-actin*: forward, 5'-AACACCCAGCCATGTACG-3' and reverse 5'-ATGTCACGCACGATTCCC-3') were chosen using the Beacon Designer Software (Bio-Rad). PCR reactions were carried out in duplicate in a final volume of 25 µL containing 12.5 µL of MESA Green qPCR Mastermix (Eurogentec, Uppsala, Sweden), 5 µL of cDNA and forward and reverse primers at 200 nM for *Abcd1*, 100 nM for *Abcd2*, or 300 nM for the other genes (*Abcd3*, *Acox1*, and *β-actin*) studied. The PCR enzyme (*Taq* DNA polymerase) was heat-activated at 95°C for 10 min, and the DNA was amplified for 40 cycles at 95°C for 15 s, 60°C for 30 s, and 72°C for 30 s, followed by a melting curve analysis to control the absence of non-specific products. For each transcript, the amplification efficiency was determined by the slope of the standard curve generated from twofold serial dilutions of

cDNA. Gene expression was quantified using cycle threshold (Ct) values and normalized by the β -actin reference gene. The quantitative expression of *Abcd1*, *Abcd2*, *Abcd3*, and *Acox1* was determined according to $2^{-\Delta Ct}$ with $\Delta Ct = (Ct \text{ of the gene studied}) - (Ct \text{ of the } \beta\text{-Actin gene})$, or as fold induction of the control.

Flow cytometric characterization of mitochondrial and redox status

The mitochondrial potential ($\Delta\Psi_m$) was measured with DiOC₆(3) used at 40 nM (Miguet *et al.* 2001). The DiOC₆(3)-related green fluorescence was analyzed by flow cytometry and collected through a 520/10-nm band pass filter. The mitochondrial mass was studied with NAO (Ratinaud *et al.* 1988). To this end, cells mixed in PBS at 5×10^5 cells/mL were incubated for 30 min at 37°C with NAO used at 5 nM. After washing and mixing in PBS, cells were analyzed by flow cytometry, and the green fluorescence of NAO was collected through a 520/10-nm band pass filter. Both 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (H₂-DCFDA) and DHE were used to characterize the production of reactive oxygen species (ROS) and of superoxide anions (O₂⁻), respectively (Bass *et al.* 1983; Rothe and Valet 1990). To measure the production of ROS, cells (10^6 cells/mL of culture medium) were incubated with H₂-DCFDA used at 6 μ M final for 10 min at 37°C, and the green fluorescence of 2',7'-dichlorofluorescein resulting from the oxidation of H₂-DCFDA was analyzed by flow cytometry and collected through a 520/10-nm band pass filter. DHE, a non-fluorescent compound rapidly oxidized in ethidium under the action of O₂⁻ (Rothe and Valet 1990), was prepared at 10 mM in dimethylsulfoxide, and used at 2 μ M on cell samples (10^6 cells/mL of culture medium). After 15 min of incubation at 37°C, cells were analyzed by flow cytometry. The red fluorescence of ethidium was collected through a 590/10-nm band pass filter.

The redox status was evaluated by the level of intracellular reduced GSH after staining with MCB (Lizard *et al.* 1998). MCB, prepared at 4 mM, was added at 100–200 μ M in cell suspensions (10^6 cells/mL in PBS). After 15 min of incubation at 37°C, cells were washed and mixed in PBS, and the blue fluorescence of MCB was collected with a 420-nm long pass filter. The fluorescent signals were measured on a logarithmic scale on a GALAXY flow cytometer (Partec) equipped with an argon laser, and with a mercury xenon lamp (to excite MCB). For each sample, 10 000 cells were acquired. The data were analyzed with FLOWMAX (Partec) and FLOWJo softwares (FlowJo Inc.).

Statistical analysis

Statistical analyses were performed on at least three independent experiments using SIGMASTAT 2.03 software (Systat Software Inc., Chicago, IL, USA) with the Mann–Whitney test, and data were considered statistically different at $p < 0.05$.

Results

Analysis of oligodendrocytic and myelin markers using fluorescence microscopy and flow cytometry in 158N and 158JP cells

The expression of markers of differentiated oligodendrocytes (CNPase and MOG), and of major myelin proteins (PLP and

MBP) was determined by fluorescence microscopy and flow cytometry. High levels of CNPase (Fig. 1a–c) and MOG (Fig. 1d–f) expression were observed. In agreement with previous investigations (Feutz *et al.* 2001; Ghandour *et al.* 2002), high levels of MBP (Fig. 1g–i) and PLP (Fig. 1j–l) expression were found. The expressions of CNPase, MOG, MBP, and PLP were either slightly or substantially higher in 158N than in 158JP cells.

Peroxisomal and mitochondrial content

Transmission electron microscopy was used to visualize peroxisomes in murine oligodendrocyte 158N and 158JP cells. Tissue sections from mice liver were used as positive controls (Fig. 2a and b). In 158N and 158JP cells, peroxisomes were also detected at the cytoplasmic level (Fig. 2c–f), but they were less numerous than in murine hepatocytes and had a heterogeneous aspect in the diaminobenzidine reaction deposit. We also investigated the morphological aspects of mitochondria in 158N and 158JP cells. Figure 2c–f shows clear morphological differences, in size and shape, between the mitochondria from 158N and 158JP cells. Indeed, the mitochondria from 158JP cells (Fig. 2f) were generally larger and more rod-shaped than the mitochondria of 158N cells (Fig. 2d). Thus, the consequences of PLP mutation and myelin synthesis disruption in the oligodendrocyte cell line 158JP might have a morphological impact on mitochondria shape.

Analysis of peroxisomal markers by fluorescence microscopy, flow cytometry, and western blotting

The expression of the peroxisomal ABC transporters ALDP and PMP70 encoded by the *Abcd1* and *Abcd3* genes, respectively, and of the peroxisomal enzymes (catalase, ACOX1, and L-PBE) was determined by fluorescence microscopy, flow cytometry, and western blotting on 158N and 158JP cells. On these two cell lines, as shown by fluorescence microscopy and flow cytometry analyses, a high level of ALDP (Fig. 3a–c) and PMP70 (Fig. 3d–f) expression were observed. Substantial expression of catalase (Fig. 3g–i), ACOX1 (Fig. 3j–l), and L-PBE (Fig. 3m–o) were also detected. The expression of these peroxisomal markers was always higher in 158JP than in 158N cells. The expression of ALDP, ACOX1, and L-PBE was confirmed by western blot analysis, which revealed the characteristic bands of these molecules (Fig. 3p). Thus, a major band at 75 kDa for ALDP, and an expected band at 78 kDa for L-PBE were identified (Fig. 3p) (Suzuki *et al.* 1994; Fouquet *et al.* 1997). The native 72-kDa ACOX1 protein is known to be cleaved inside the peroxisome mainly into a 50-kDa polypeptide protein (Oaxaca-Castillo *et al.* 2007). Using a polyclonal antibody, we detected the 72 and 50 kDa bands in 158N and 158JP cells, and these bands were not detected in the deficient ACOX1 fibroblasts (ACOX1^{-/-}) used as negative control (Fig. 3p).

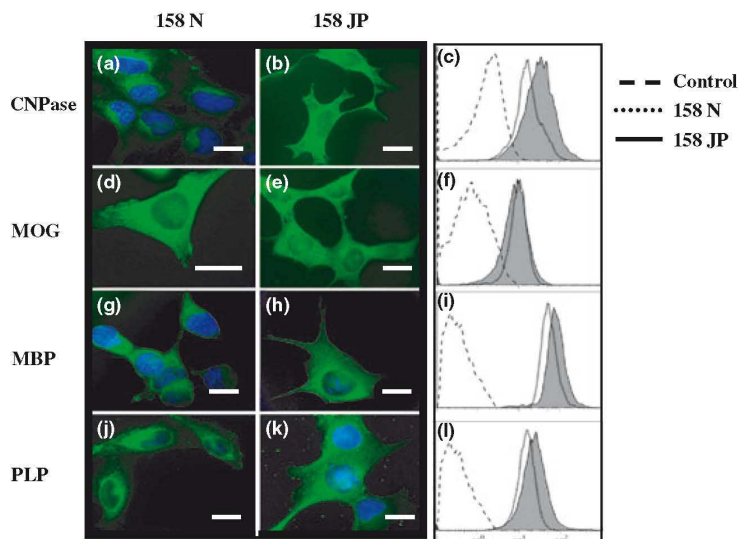


Fig. 1 Expression analysis of oligodendrocytic and myelin markers in murine oligodendrocytes 158N and 158JP. Fluorescence microscopy and flow cytometry analysis were accomplished on subconfluent murine oligodendrocytes 158N and JP to determine the expression of oligodendrocyte differentiation markers such as 2',3' cyclic nucleotide 3'-phosphodiesterase (CNPase; a–c), myelin oligodendrocyte glycoprotein (MOG; d–f), major myelin proteins (proteolipid protein; PLP; g–i), and myelin basic protein (MBP; j–l). Data shown are representative of three to six independent experiments. Scale bar, 10 μm. Control corresponds to conjugated control.

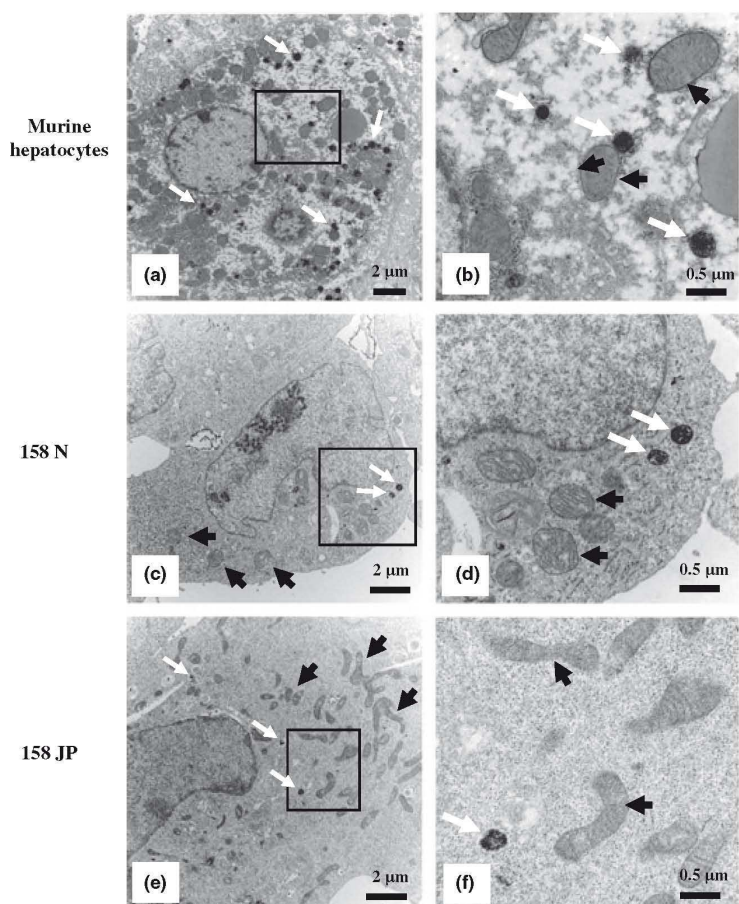
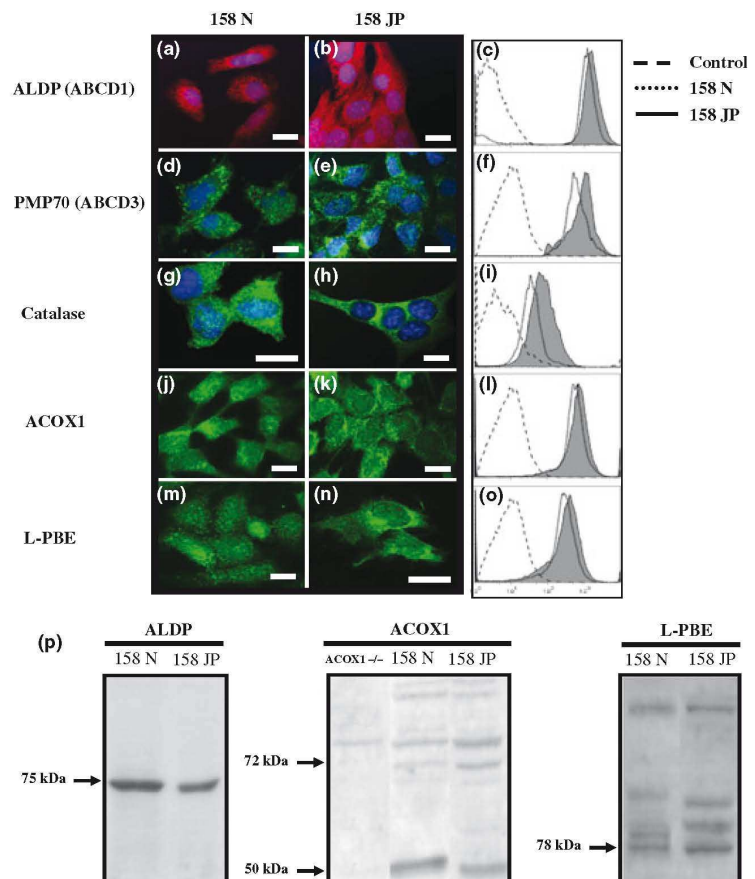


Fig. 2 Transmission electron microscopy analysis of peroxisomes and mitochondria in murine oligodendrocytes 158N and 158JP. Livers of 9- to 10-week-old C57 Black/6 males were used as positive controls for peroxisome cytochemical analysis. (a) Numerous peroxisomes (white arrows) are observed in a hepatocyte. (b) These peroxisomes were clearly observed at high magnification in the presence of diaminobenzidine and H_2O_2 . In 158N (c and d) and 158JP (d and e) cells, compared with murine hepatocytes, only a few peroxisomes were observed. Most often, the number of mitochondria (dark arrows) seems lower in 158N (c) than in 158JP (e). Data shown are representative of three independent experiments.

Fig. 3 Expression analysis of the peroxisome transporters and peroxisomal enzymes in murine oligodendrocytes 158N and 158JP. Conventional fluorescence microscopy and flow cytometry analyses were performed on subconfluent murine oligodendrocytes 158N and JP for peroxisomal transporters (ALDP (ABCD1; a–c), and PMP70 (ABCD3; d–f) and for peroxisomal enzymes (catalase; g–i), acyl-CoA oxidase1 (ACOX1; j–l), and peroxisomal bifunctional enzyme (L-PBE; m–o). ALDP, ACOX1, and L-PBE expression were also characterized using western blotting (p). Data shown are representative of three to six independent experiments. Scale bar, 10 μ m. Control corresponds to conjugated control. To investigate ACOX1 expression by western blotting, we used homogenate from human fibroblasts deficient in ACOX1 (ACOX1^{−/−}).



Analysis of peroxisomal markers by RT-qPCR

The relative expression level of the *Abcd1*, *Abcd2*, *Abcd3*, and *ACOX1* genes was determined in 158N and 158JP murine oligodendrocytes by RT-qPCR and evaluated according to $2^{-\Delta C_t}$ calculated comparatively to β -actin (Fig. 4). Similar expression levels of *Abcd1* and *Acox1* were observed in 158N and 158JP cells, while the expression levels of *Abcd2* and *Abcd3* were higher in 158JP than in 158N cells. Moreover, *Abcd2* was very weakly expressed in 158N cells, whereas its expression level in 158JP cells was in the range observed for *Abcd1* and *Acox1*.

4-Phenylbutyrate responses of 158N and 158JP cells

4-Phenylbutyrate has been previously shown to induce peroxisomal genes and peroxisomal proliferation especially in rat hepatocytes (Gondcaille *et al.* 2005). It was therefore interesting to evaluate the response of 158N and 158JP cells to 4-PBA. Under treatment with 4-PBA (2.5 mM, 72 h), cell growth was strongly inhibited, and significant morphological changes were observed in both cell types (Fig. 5a–d). In 158N cells, the expression of the peroxi-

somal proteins ACOX1 and L-PBE was enhanced (Fig. 5e), as well as the expression of the myelin protein PLP (Fig. 5f) and the oligodendrocyte markers, MOG and CNPase (Fig. 5g). On 158JP cells, only a weak stimulation of the expression of CNPase was observed (Fig. 5e–g). As 4-PBA was shown to induce the transcription of *Abcd2* but not *Acox1* in glial cells (Gondcaille *et al.* 2005), the expression levels of these genes was evaluated by RT-qPCR in both 4-PBA-treated or untreated 158N and 158JP cells. Data from Fig. S1 show that, in 158N cells, the mRNA levels of both *Abcd2* and *Acox1* was unchanged after 4-PBA treatment, while in 158JP cells 4-PBA induces slightly the mRNA level of *Acox1* and strongly the mRNA level of *Abcd2*.

In addition, specific activities of peroxisomal enzymes were also compared in untreated and in 4-PBA-treated 158N and 158JP cells. Whereas the catalase activity was similar in 158N and 158JP cells (Fig. 6a), ACOX1 activity was higher in 158JP than in 158N cells (Fig. 6b). In H4IIC3 rat hepatoma cells, used as positive controls, the catalase activity was approximately three times higher than

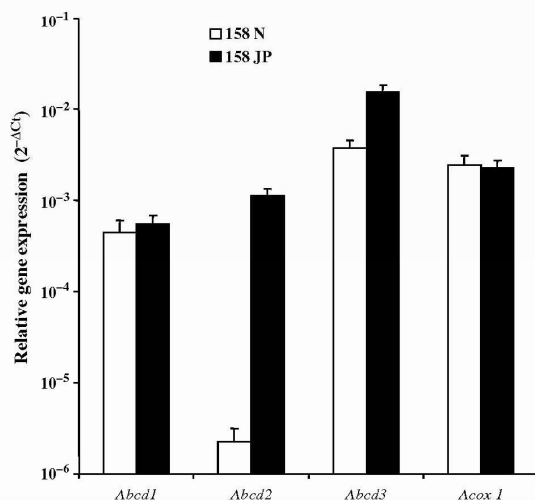


Fig. 4 Oligodendrocyte expression levels of genes encoding peroxisome transporters (Abcd1, Abcd2, and Abcd3) or peroxisomal enzyme (Acox1) in murine oligodendrocytes 158N and 158JP, respectively. The mRNA levels were measured using real-time RT-qPCR and normalized to β -actin. Data presented are the mean $\pm$ SD of two or three experiments (carried out in duplicate) and are expressed as $2^{-\Delta C_t}$.

in 158N and JP cells (data not shown). Thus, in both cell types, the 4-PBA treatments resulted in a significant increase in the activity of both enzymes (Fig. 6a and b). Observations made by transmission electron microscopy did not show a peroxisomal proliferation under treatment with 4-PBA in either 158N or 158JP, whereas an increase in the size of peroxisomes was found in 158N cells (data not shown).

Redox and mitochondrial status of 158N and 158JP cells

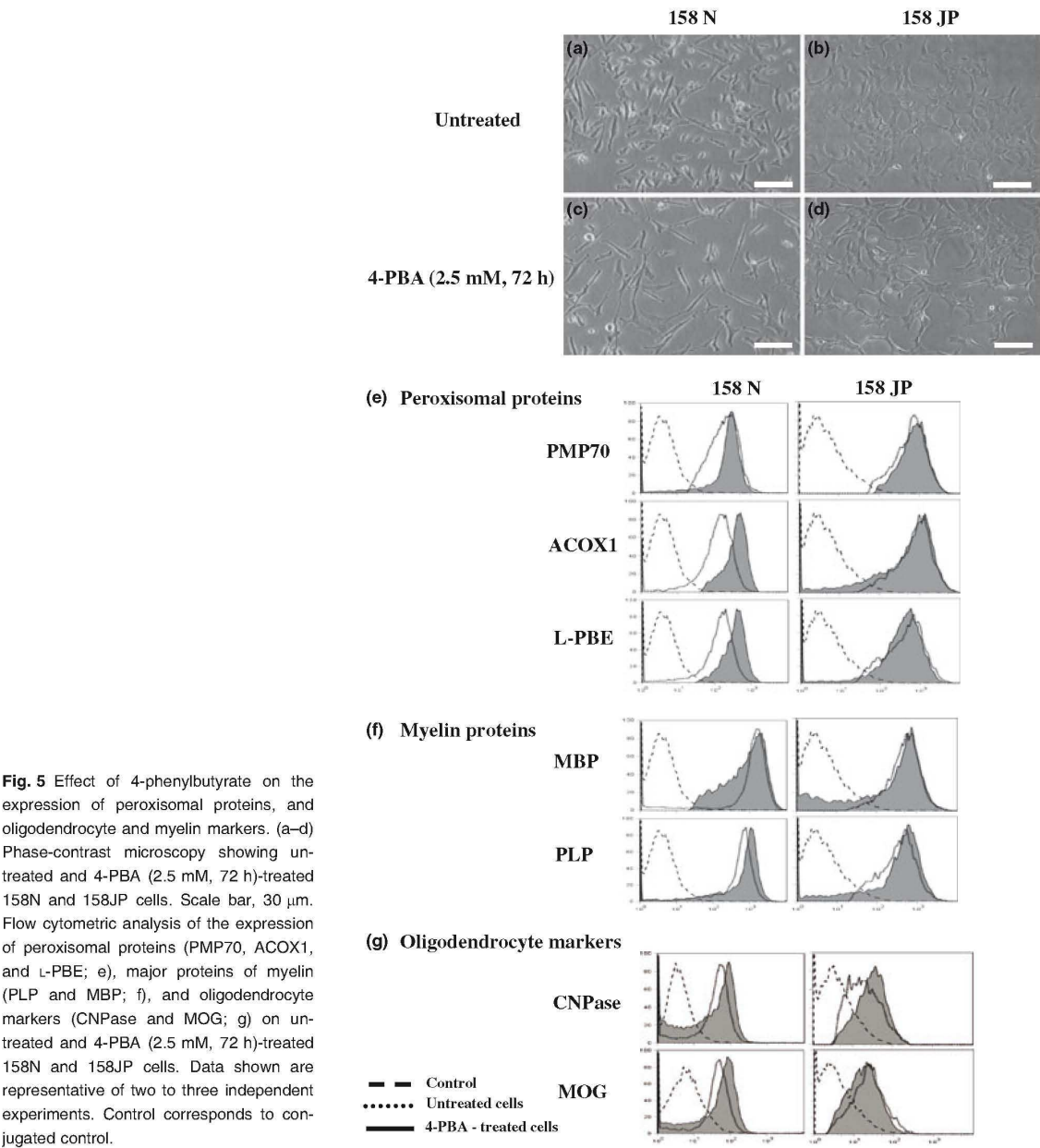
The oxidation of fatty acids requires both peroxisomal and mitochondrial activities, and the metabolic activities of these organelles are tightly connected to ensure the degradation of fatty acids contributing to produce acetyl-CoA. Therefore, the mitochondrial and redox status of murine oligodendrocytes of 158N and 158JP cells was investigated by flow cytometry with various dyes. The spontaneous production of ROS and of superoxide anions ($O_2^{\cdot -}$) measured by flow cytometry after staining with H_2 -DCFDA and DHE, respectively, was significantly greater in 158JP than in 158N, as well as the intracellular level of reduced GSH quantified with MCB (Table 1). The $\Delta\Psi_m$, and the mitochondrial mass determined by flow cytometry after staining with DiOC₆(3) and NAO, respectively, were also significantly higher in 158JP than in 158N cells. These data show substantial differences between the redox and the mitochondrial status of 158N and 158JP cells.

Confocal laser microscopic analysis of the interaction of PLP with mitochondria

As 158JP cells express a mutated PLP form (Feutz *et al.* 2001) and as this protein could modulate the $\Delta\Psi_m$ (Bongarzone *et al.* 2001) and contribute to the induction of a mitochondria-dependent form of cell death (Cergnet *et al.* 2001), we hypothesized that PLP could play a role in the differences in mitochondrial status observed between 158N and 158JP. Thus, by confocal laser scanning microscopy, after mitochondrial staining with Mitotracker Red and PLP identification by indirect immunofluorescence with Alexa 488, we studied the colocalization of PLP with mitochondria (Fig. 7). The number of colocalization sites of PLP with mitochondria were significantly ($p < 0.05$) lower in 158N cells (2783 ± 4) (Fig. 7a-d), than in 158JP cells (9581 ± 23) (Fig. 7e-h), supporting the hypothesis that PLP, in addition to its role in myelination, might contribute to other cellular functions.

Discussion

The CNS comprises different cell types: neurons, microglial cells, and glial cells consisting of astrocytes and oligodendrocytes. In the CNS, oligodendrocytes synthesize myelin made up of lipid (up to 70% dry weight) and two major proteins: the MBP and the PLP (Baumann and Pham-Dinh 2001; Taylor *et al.* 2004). The myelin sheath of the CNS is formed by membranes that extend from oligodendrocytes and wrap concentrically around nerve fibers, thereby insulating them and facilitating rapid transmission of nerve impulses (Harauz *et al.* 2004). Myelin is a dynamic functionally active membrane, and its disruption because of intrinsic or environmental factors (Hörster *et al.* 2005; Eichler and van Haren 2007) can result in serious neurological disorders including central and peripheral neuropathies (Zhou and Griffin 2003), inflammatory demyelinating diseases such as multiple sclerosis (Steinman 2008), and leukodystrophies such as Pelizaeus–Merzbacher disease, X-ALD, and P-NALD (Koeppen and Robitaille 2002). Given that oligodendrocytes damage is observed in these different pathologies and that it has been demonstrated that oligodendrocytes play a crucial role in the progression of X-ALD (Kassmann *et al.* 2007), it is important to develop cellular models as better knowledge of oligodendrocyte biology is crucial for the understanding of demyelination and remyelination mechanisms. To this end, murine or rat primary cultures of oligodendrocytes, as well as organotypic cultures can be used. However, these culture methods are difficult to standardize, and it may be advantageous to work on established oligodendrocyte cell lines. Consequently, we did an extensive characterization of the two murine oligodendrocyte cell lines 158N and 158JP isolated from the brain of normal and jimpy mice, respectively.



In agreement with previous investigations (Feutz *et al.* 2001; Ghandour *et al.* 2002), both cell lines strongly express the two major proteins of myelin, PLP and MBP, which account for 50% and 30% of whole myelin proteins, respectively (Taylor *et al.* 2004). In addition, these cells strongly express CNPase and MOG. CNPase is a myelin-associated enzyme localized almost exclusively in the cells elaborating myelin (oligodendrocytes and Schwann cells),

and it is involved in the growth of myelin membrane during early oligodendrocyte membrane biogenesis (Sprinkle 1989). Whereas MOG only accounts for 0.1% of oligodendrocytic proteins, it is considered that this protein, which belongs to the immunoglobulin superfamily and plays important roles in the immune response associated with multiple sclerosis (Clements *et al.* 2003), could also contribute to the stability of myelin structure (Hörster *et al.* 2005). Thus, as 158N and

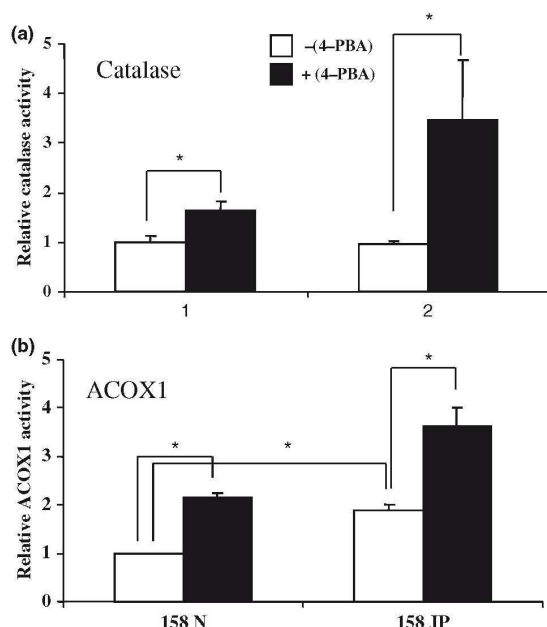


Fig. 6 Effects of 4-phenylbutyrate on catalase and ACOX1 activities in murine oligodendrocytes 158N and 158JP. The activities of the peroxisomal enzymes (catalase, a and ACOX1, b) were determined on subconfluent murine oligodendrocytes 158N and JP cultured in the absence or in the presence of 4-PBA used at 2.5 mM for 72 h. The enzymatic activities are expressed in fold induction comparatively to those of 158N cells used as reference. In these cells, catalase specific activity was $21.56 \pm 2.99 \mu\text{mol/min/mg}$ of proteins and ACOX1 specific activity was $6.00 \pm 0.28 \text{ nmol/min/mg}$ of proteins. Data shown are representative of two independent experiments carried out in triplicate. Results are presented as mean $\pm$ SD; * $p < 0.05$.

158JP cells express major proteins involved in the elaboration, the structure, and the immunoreactivity of myelin, they could be useful to study the effects of intrinsic and extrinsic factors on oligodendrocytic differentiation and study the role

Table 1 Redox and mitochondrial status of murine oligodendrocytes 158N and 158JP

Assays	158N	158JP
ROS ($\text{H}_2\text{-DCFDA}$)	113.59 ± 25.09	$170.20 \pm 9.50^*$
O_2^- (DHE)	2.83 ± 0.60	$14.07 \pm 0.92^{***}$
GSH (MCB)	13.80 ± 0.51	$33.87 \pm 2.01^{***}$
$\Delta\Psi\text{m}$ [$\text{DiOC}_6(3)$]	47.05 ± 10.50	$122.60 \pm 14.67^{***}$
Mitochondrial mass (NAO)	34.44 ± 2.80	$88.15 \pm 9.57^{***}$

MCB, monochlorobimane; NAO, nonylacridine orange; ROS, reactive oxygen species; $\Delta\Psi\text{m}$, mitochondrial potential. Data are mean $\pm$ SD of three independent experiments. Statistic significance of the differences between 158N and 158JP cells; * $p < 0.05$, ** $p < 0.005$, and *** $p < 0.001$. Data are expressed as ΔMFI (mean fluorescence intensity) $\Delta\text{MFI} = \text{MFI of stained cells} - \text{MFI of unstained cells}$.

of the cellular metabolism in various pathologies associated with important myelin disorders such as the peroxisomal diseases X-ALD and P-NALD.

Several hypotheses have been postulated to explain the physiopathogenesis of the peroxisomal disorders, one of them presenting the toxicity of VLCFA for the myelin-producing cells as central. So, it was important to characterize the peroxisomal equipment of the 158N and 158JP cells. Using transmission electron microscopy, some peroxisomes were detected in both cell lines, but they were less numerous than in mice hepatocytes. Interestingly, by using flow cytometry, western blotting, and/or RT-qPCR, we evidenced that 158N and 158JP express at a similar level the following peroxisomal markers: ALDP and PMP70 corresponding to the peroxisomal ABC transporters ABCD1 and ABCD3, respectively, as well as the peroxisomal enzymes catalase, ACOX1, and L-PBE.

Concerning X-ALD, several pharmacological compounds have been tested *in vitro* or *in vivo* to induce peroxisomal β -oxidation. One of them, 4-PBA, has been shown to induce the expression of *Abcd2* in mixed primary culture of murine oligodendrocytes and astrocytes (Gondcaille *et al.* 2005). It was therefore interesting to analyze the effect of 4-PBA on the 158N and 158JP cells. 4-PBA treatments resulted in morphological changes concerning the size and shapes of peroxisomes were only observed in 158N cells. Similarly, enhanced protein expression of ACOX1, L-PBE, PLP, MOG, and CNPase was also only observed in these oligodendrocytes isolated from normal mice, whereas CNPase was only slightly increased in 158JP cells. Although ACOX1 is induced by 4-PBA at both protein and enzymatic activity levels, no 4-PBA effect has been detected for its mRNA. Thus, the ACOX1 expression in treated 158N cells could involve the existence of a post-translational up-regulation mechanism, which has been previously reported for other peroxisome proliferators (Hashimoto 1987). Furthermore, it was also reported that 158JP cells have a defective cAMP metabolic pathway (Feutz *et al.* 2001). These observations, together with previous results showing that 158JP were unable to respond to basic fibroblast growth factor (Feutz *et al.* 1995) and dibutyryl cAMP (Feutz *et al.* 2001), suggest that 4-PBA-induced ACOX1, L-PBE, PLP, and MOG could occur in 158N through a cAMP-dependent pathway. On the other hand, as CNPase expression and catalase activity are enhanced by 4-PBA in both cell lines, our data support that these events could be independent of the cAMP pathway.

Surprisingly, in the absence of any treatment, adrenoleukodystrophy related protein (ALDRP) (ABCD2) gene was found poorly expressed in 158N cells when compared with 158JP cells, which harbor mutation in the PLP gene (Macklin *et al.* 1987). The increase of the basal expression of *Abcd2* gene in 158JP cells raises the question about the relationship

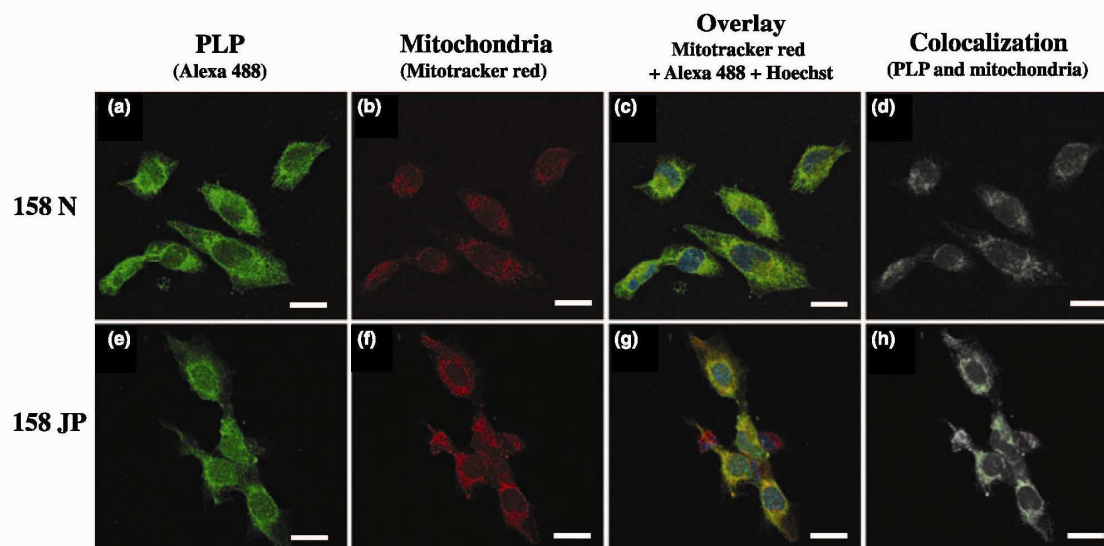


Fig. 7 Analysis of the colocalization of PLP and mitochondria by confocal laser scanning microscopy. PLP was revealed with Alexa 488 and mitochondria were stained with Mitotracker Red. The nuclei were counter-stained with Hoechst 33342. Overlay (c and g) was performed on optical sections showing the highest PLP-associated fluorescence (a and e) to maximize the probability of detection of PLP with mitochondria (b and f). The green dots correspond to colocalization sites

(d and h). Interestingly, the number of green pixels are strongly higher in 158JP cells (9581 ± 23 green pixels/cell; h) than in 158N cells (2783 ± 4 green pixels/cell; d). The localization of PLP at the mitochondrial level was investigated with the colocalization finder plug-in of ImageJ software. For each slide observed, three microscopical fields were examined (four to six cells per field). Data shown are specific of three independent experiments. Scale bar, 10 μ m.

between dysmyelination in JP mice oligodendrocytes and *Abcd2* gene regulation. Interestingly, PLP gene expression in oligodendrocytes was shown to be regulated via derepression mechanism involving several negative regulatory elements. Accordingly, such repression/derepression mechanisms could explain the low level of *Abcd2* mRNA in the myelinating 158N oligodendrocytes when compared with the strong induction of *Abcd2* mRNA level in 4-PBA-treated 158JP cells. Therefore, the use of both 158N and 158JP cell lines, instead of primary culture of murine oligodendrocytes, will be greatly helpful to depict the regulation of *Abcd2* gene expression and the involved transcription factors, and to understand the substrate specificity of different peroxisomal ABC transporters using gene silencing and/or gene transfection methods.

Peroxisomes and mitochondria are ubiquitous and tightly connected organelles, which have an indispensable role in the cellular metabolism of higher eukaryotes (Schumann and Subramani 2008), and peroxisomal alterations can potentially influence mitochondrial functions (Fourcade *et al.* 2008; Hein *et al.* 2008). Consequently, given that peroxisomal and mitochondrial dysfunctions are often associated with neurological and developmental defects and that peroxisomes and mitochondria have been suggested to contribute to pathological conditions associated with oxidative stress (Schrader and Fahimi 2006), the mitochondrial and the redox status

were simultaneously studied in 158N and 158JP cells. Interestingly, significant differences were observed between 158N and 158JP cells: the spontaneous production of ROS and O_2^- was higher in 158JP than in 158N as well as the GSH level; $\Delta\Psi_m$ and the whole mitochondrial mass were also higher in 158JP than in 158N. Although the primary causes of these differences are difficult to establish, it is tempting to speculate that the highest expression of mutated PLP observed in 158JP might be involved. This hypothesis is supported by the strong colocalization of PLP and mitochondria observed mainly in 158JP. Therefore, as previously suggested, in addition to its important role in myelin structure and functions, PLP might have additional roles (Campagnoni and Skoff 2001). Indeed, potential roles of PLP in the induction of cell death have been suggested (Bongarzone *et al.* 2001), and it has been clearly established that increased levels of PLP favor the death of oligodendrocytes and neurons (Boucher *et al.* 2002; Skoff *et al.* 2004). Therefore, based on the data obtained in the present investigation and on those of the literature, we suggest that PLP could modulate the mitochondrial and the redox status, which subsequently could contribute to trigger cell death.

Our study shows that 158N and 158JP cells express the main proteins of mature oligodendrocytes (CNPase, MOG, and the two major proteins of myelin, PLP and MBP), contain major peroxisomal proteins and/or mRNAs [ALDP

(ABCD1), PMP70 (ABCD3), catalase, ACOX1, and L-PBE], and have different mitochondrial content and activities, and redox status. Interestingly, under treatment with 4-PBA, the expression of some of these proteins is enhanced, especially in 158N cells while *Abcd2* gene expression is only modulated in 158JP. Therefore, our data support that 158N and 158JP cells can provide powerful models to explore the relationships between peroxisome, mitochondrial metabolism, and myelin protein expression, and to dissect the complexity of the molecular mechanisms involved in some neurodegenerative diseases, especially X-ALD, P-NALD, and multiple sclerosis.

Acknowledgements

This work was supported by grants from the INSERM, CNRS, the council of Burgundy, the European Leukodystrophy Association (ELA), and the University Hospital of Dijon (CHU de Dijon).

Supporting information

Additional Supporting information may be found in the online version of this article:

Fig. S1 Effects of 4-phenylbutyrate on the expression levels of genes encoding for *Abcd2* and *Acox1* in murine oligodendrocytes 158N and 158JP. The mRNA levels were measured in control and 4-PBA (2.5 mM, 72 h)-treated 158N or 158JP cells, using real-time RT-qPCR and normalized to β -actin. Data presented are the mean $\pm$ standard deviation of three experiments (done in duplicate) and are expressed as fold induction of the control.

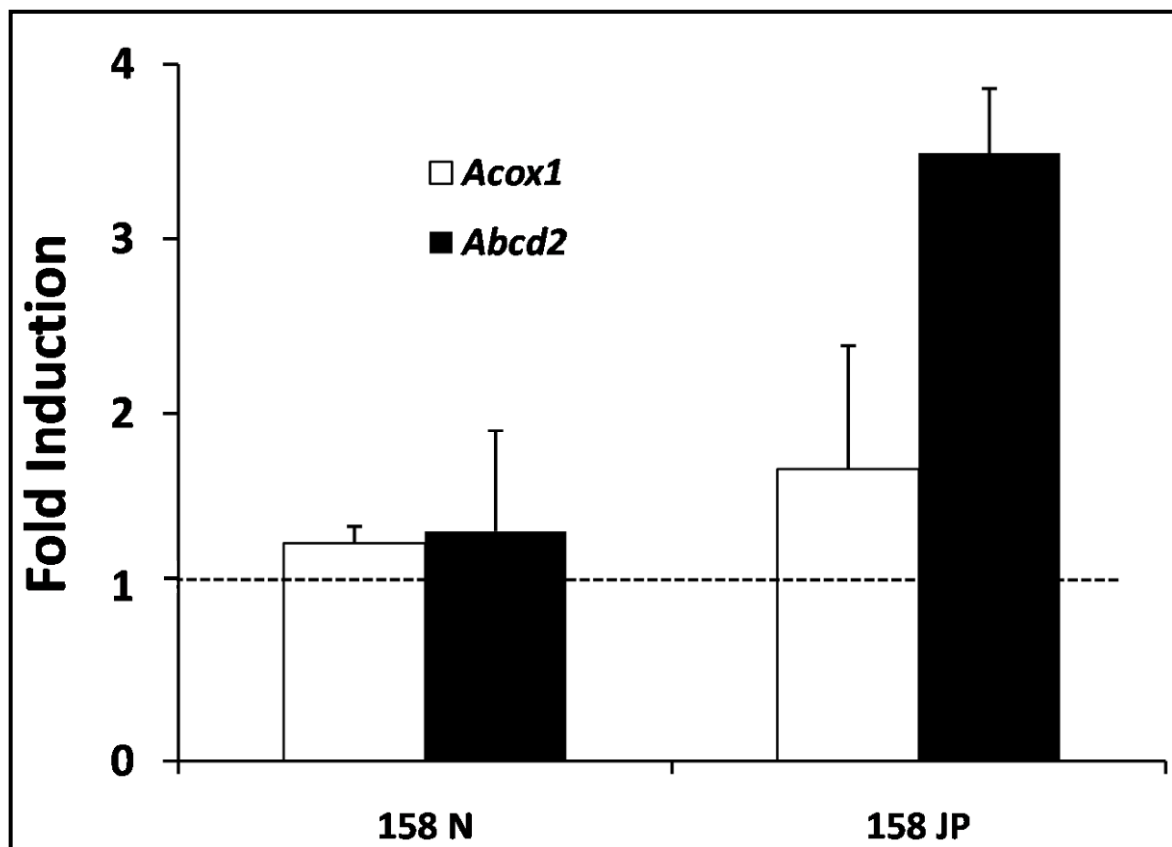
As a service to our authors and readers, this journal provides supporting information supplied by the authors. Such materials are peer-reviewed and may be re-organized for online delivery, but are not copy-edited or typeset. Technical support issues arising from supporting information (other than missing files) should be addressed to the authors.

References

- Bass D. A., Parce J. W., Dechatelet L. R., Szejda P., Seeds M. C. and Thomas M. (1983) Flow cytometric studies of oxidative product formation by neutrophils: a graded response to membrane stimulation. *J. Immunol.* **130**, 1910–1917.
- Baumann N. and Pham-Dinh D. (2001) Biology of oligodendrocyte and myelin in the mammalian central nervous system. *Physiol. Rev.* **81**, 871–927.
- Berger J. and Gartner J. (2006) X-linked adrenoleukodystrophy: clinical, biochemical and pathogenetic aspects. *Biochim. Biophys. Acta* **1763**, 1721–1732.
- Bongarzone E. R., Foster L. M., Byravan S., Schonmann V. and Campagnoni A. T. (1997) Temperature-dependent regulation of PLP/DM20 and CNP gene expression in two conditionally-immortalized jimpy oligodendrocyte cell lines. *Neurochem. Res.* **22**, 363–372.
- Bongarzone E. R., Jacobs E., Schonmann V., Kampf K., Campagnoni C. W. and Campagnoni A. T. (2001) Differential sensitivity in the survival of oligodendrocyte cell lines to overexpression of myelin proteolipid protein gene products. *J. Neurosci. Res.* **65**, 485–492.
- Boucher S. E., Cypher M. A., Carlock L. R. and Skoff R. P. (2002) Proteolipid protein gene modulates viability and phenotype of neurons. *J. Neurosci.* **22**, 1772–1783.
- Buntinx M., Vanderlocht J., Hellings N., Vandenabeele F., Lambrechts I., Raus J., Ameloot M., Stinissen P. and Steels P. (2003) Characterization of three human oligodendroglial cell lines as a model to study oligodendrocyte injury: morphology and oligodendrocyte-specific gene expression. *J. Neurocytol.* **32**, 25–38.
- Campagnoni A. T. and Skoff R. P. (2001) The pathobiology of myelin mutants reveal novel biological functions of the MBP and PLP genes. *Brain Pathol.* **11**, 74–91.
- Cerghet M., Bessert D. A., Nave K. A. and Skoff R. P. (2001) Differential expression of apoptotic markers in jimpy and in Plp overexpressors: evidence for different apoptotic pathways. *J. Neurocytol.* **30**, 841–855.
- Clements C. S., Reid H. H., Beddoe T., Tynan F. E., Perugini M. A., Johns T. G., Bernard C. C. and Rossjohn J. (2003) The crystal structure of myelin oligodendrocyte glycoprotein, a key autoantigen in multiple sclerosis. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **100**, 11059–11064.
- Eichler F. and van Haren K. (2007) Immune response in leukodystrophies. *Pediatr. Neurol.* **37**, 235–244.
- Feutz A. C., Bellomi L., Allinquant B., Schladenhaufen Y. and Ghandour M. S. (1995) Isolation and characterization of defective jimpy oligodendrocytes in culture. *J. Neurocytol.* **24**, 865–877.
- Feutz A. C., Pham-Dinh D., Allinquant B., Miehle M. and Ghandour M. S. (2001) An immortalized jimpy oligodendrocyte cell line: defects in cell cycle and cAMP pathway. *Glia* **34**, 241–252.
- Forss-Petter S., Werner H., Berger J., Lassmann H., Molzer B., Schwab M. H., Bernheimer H., Zimmermann F. and Nave K. A. (1997) Targeted inactivation of the X-linked adrenoleukodystrophy gene in mice. *J. Neurosci. Res.* **50**, 829–843.
- Fouquet F., Zhou J. M., Ralston E., Murray K., Troalen F., Magal E., Robain O., Dubois-Dalcq M. and Aubourg P. (1997) Expression of the adrenoleukodystrophy protein in the human and mouse central nervous system. *Neurobiol. Dis.* **3**, 271–285.
- Fourcade S., López-Erauskin J., Galino J. *et al.* (2008) Early oxidative damage underlying neurodegeneration in X-adrenoleukodystrophy. *Hum. Mol. Genet.* **17**, 1762–1773.
- Ghandour S., Feutz A. C., Jalabi W., Taleb O., Bessert D., Cypher M., Carlock L. and Skoff R. P. (2002) Trafficking of PLP/DM20 and cAMP signalling in immortalized jimpy oligodendrocytes. *Glia* **40**, 300–311.
- Gondcaille C., Depreter M., Fourcade S. *et al.* (2005) Phenylbutyrate up-regulates the adrenoleukodystrophy-related gene as a nonclassical peroxisome proliferator. *J. Cell Biol.* **169**, 93–104.
- Harauz G., Ishiyama N., Hill C., Bates I. R., Libich D. S. and Farès C. (2004) Myelin basic protein-diverse conformational states of an intrinsically unstructured protein and its roles in myelin assembly and multiple sclerosis. *Micron* **35**, 503–542.
- Ishimoto T. (1987) Comparison of enzymes of lipid β -oxidation in peroxisomes and mitochondria, in *Peroxisome in Biology and Medicine* (Fahimi D. H. and Sies H., eds), pp. 97–105. Springer-Verlag, Heidelberg.
- Hein S., Schönfeld P., Kahlert S. and Reiser G. (2008) Toxic effects of X-linked adrenoleukodystrophy-associated, very long chain fatty acids on glial cells and neurons from rat hippocampus in culture. *Hum. Mol. Genet.* **17**, 1750–1761.
- Hörster F., Surtees R. and Hoffmann G. F. (2005) Disorders of intermediary metabolism: toxic leukoencephalopathies. *J. Inher. Metab. Dis.* **28**, 345–356.
- Huin C., Schohn H., Hatier R., Bentejac M., Antunes L., Plénat F., Bugaut M. and Dauça M. (2002) Expression of peroxisome

- proliferator-activated receptors alpha and gamma in differentiating human colon carcinoma Caco-2 cells. *Biol. Cell* **94**, 15–27.
- Hulshagen L., Krysko O., Bottelbergs A., Huyghe S., Klein R., Van Veldhoven P. P., de Deyn P. P., d'Hooge R., Hartmann D. and Baes M. (2008) Absence of functional peroxisomes from mouse CNS causes dysmyelination and axon degeneration. *J. Neurosci.* **28**, 4015–4027.
- Jia Z., Pei Z., Li Y., Wei L., Smith K. D. and Watkins P. A. (2004) X-linked adrenoleukodystrophy: role of very long-chain acyl-CoA synthetases. *Mol. Genet. Metab.* **83**, 117–127.
- Kassmann C., Lappe-Siefke C., Baes M. *et al.* (2007) Axonal loss and neuroinflammation caused by peroxisome-deficient oligodendrocytes. *Nat. Genet.* **39**, 969–976.
- Kemp S. and Wanders R. J. (2007) X-linked adrenoleukodystrophy: very long-chain fatty acid metabolism, ABC half-transporters and the complicated route to treatment. *Mol. Genet. Metab.* **90**, 268–276.
- Kemp S., Wei H. M., Lu J. F., Braiterman L. T., McGuinness M. C., Moser A. B., Watkins P. A. and Smith K. D. (1998) Gene redundancy and pharmacological gene therapy: implications for X-linked adrenoleukodystrophy. *Nat. Med.* **4**, 1261–1268.
- Koeppen A. H. and Robitaille Y. (2002) Pelizaeus–Merzbacher disease. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* **61**, 747–759.
- Lizard G., Chignol M. C., Souchier S., Schmitt D. and Chardonnet Y. (1994) Laser scanning confocal microscopy and quantitative microscopy with a charge coupled device camera improve detection of human papillomavirus DNA revealed by fluorescence in situ hybridization. *Histochemistry* **101**, 303–310.
- Lizard G., Gueldry S., Sordet O., Monier S., Athias A., Miguet C., Bessède G., Lemaire S., Solary E. and Gambert P. (1998) Glutathione is implied in the control of 7-ketocholesterol-induced apoptosis, which is associated with radical oxygen species production. *FASEB J.* **12**, 1651–1663.
- Macklin W., Gardinier M., King K. and Kampf K. (1987) An AG → CG transition at a splice site in the myelin proteolipid protein gene in jimpy mice results in the removal of an exon. *FEBS Lett.* **2**, 417–421.
- Miguet C., Monier S., Bettaieb A., Athias A., Bessède G., Laubriet A., Lemaire S., Néel D., Gambert P. and Lizard G. (2001) Ceramide generation occurring during 7β-hydroxycholesterol- and 7-ketocholesterol-induced apoptosis is caspase independent and is not required to trigger cell death. *Cell Death Differ.* **8**, 83–99.
- Nguyen S. D., Baes M. and Van Veldhoven P. P. (2008) Degradation of very long chain dicarboxylic polyunsaturated fatty acids in mouse hepatocytes, a peroxisomal process. *Biochim. Biophys. Acta* **1781**, 400–405.
- Oaxaca-Castillo D., Andreoletti P., Vluggens A., Yu S., van Veldhoven P. P., Reddy J. K. and Cherkaoui-Malki M. (2007) Biochemical characterization of two functional human liver acyl-CoA oxidase isoforms 1a and 1b encoded by a single gene. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **360**, 314–319.
- Paintlia A. S., Gilg A. G., Khan M., Singh A. K., Barbosa E. and Singh I. (2003) Correlation of very long chain fatty acid accumulation and inflammatory disease progression in childhood X-ALD: implications for potential therapies. *Neurobiol. Dis.* **14**, 425–439.
- Poll-The B. T., Roels F., Ogier H. *et al.* (1988) A new peroxisomal disorder with enlarged peroxisomes and a specific deficiency of acyl-CoA oxidase (pseudo-neonatal adrenoleukodystrophy). *Am. J. Hum. Genet.* **42**, 422–434.
- Ratinaud M. H., Leprat P. and Julien R. (1988) In situ flow cytometric analysis of nonyl acridine orange-stained mitochondria from splenocytes. *Cytometry* **9**, 206–212.
- Rothe G. and Valet G. (1990) Flow cytometric analysis of respiratory burst activity in phagocytes with hydroethidine and 2',7'-dichlorofluorescein. *J. Leukoc. Biol.* **47**, 440–448.
- Santos M. J., Henderson S. C., Moser A. B., Moser H. W. and Lazarow P. B. (2000) Peroxisomal ghosts are intracellular structures distinct from lysosomal compartments in Zellweger syndrome: a confocal laser scanning microscopy study. *Biol. Cell* **92**, 85–94.
- Schrader M. and Fahimi H. D. (2006) Peroxisomes and oxidative stress. *Biochim. Biophys. Acta* **1763**, 1755–1766.
- Schrader M. and Fahimi H. D. (2008) The peroxisome: still a mysterious organelle. *Histochem. Cell Biol.* **129**, 421–440.
- Schrader M., Baumgart E., Völkl A. and Fahimi H. D. (1994) Heterogeneity of peroxisomes in human hepatoblastoma cell line HepG2. Evidence of distinct subpopulations. *Eur. J. Cell Biol.* **64**, 281–294.
- Schumann U. and Subramani S. (2008) Special delivery from mitochondria to peroxisomes. *Trends Cell Biol.* **18**, 253–256.
- Skoff R. P., Bessert D. A., Cerghet M., Franklin M. J., Rout U. K., Nave K. A., Carlock L., Ghandour M. S. and Armant D. R. (2004) The myelin proteolipid protein gene modulates apoptosis in neural and non-neural tissues. *Cell Death Differ.* **11**, 1247–1257.
- Sprinkle T. J. (1989) 2',3'-Cyclic nucleotide 3'-phosphodiesterase, an oligodendrocyte-Schwann cell and myelin-associated enzyme of the nervous system. *Crit. Rev. Neurobiol.* **4**, 235–301.
- Steinman L. (2008) Nuanced roles of cytokines in three major human brain disorders. *J. Clin. Invest.* **118**, 3557–3563.
- Suzuki Y., Shimozawa N., Yajima S. *et al.* (1994) Novel subtype of peroxisomal Acyl-CoA oxidase deficiency and bifunctional enzyme deficiency with detectable enzyme protein: identification by means of complementation analysis. *Am. J. Hum. Genet.* **54**, 36–43.
- Taylor C. M., Marta C. B., Claycomb R. J., Han D. K., Rasband M. N., Coetzee T. and Pfeiffer S. E. (2004) Proteomic mapping provides powerful insights into functional myelin biology. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **101**, 4643–4648.
- Verity A. M., Bredesen D., Vonderscher C., Handeley V. W. and Campagnoni A. T. (1993) Expression of myelin protein genes and other myelin components in an oligodendrocytic cell line conditionally immortalized with a temperature-sensitive retrovirus. *J. Neurochem.* **60**, 577–587.
- Wanders R. J. and Waterham H. R. (2006a) Biochemistry of mammalian peroxisomes revisited. *Annu. Rev. Biochem.* **75**, 295–332.
- Wanders R. J. and Waterham H. R. (2006b) Peroxisomal disorders: the single peroxisomal enzyme deficiencies. *Biochim. Biophys. Acta* **1763**, 1707–1720.
- Zhou L. and Griffin J. W. (2003) Demyelinating neuropathies. *Curr. Opin. Neurol.* **16**, 307–313.

Supplementary data:



Supplementary file: Effects of 4-phenylbutyrate on the expression levels of genes encoding for Abcd2 and Acox1 in murine oligodendrocytes 158N and 158JP. The mRNA levels were measured in control and 4-PBA (2.5 mM, 72 h)-treated 158N or 158JP cells. using real-time RT-qPCR and normalized to β -actin. Data presented are the mean $\pm$ standard deviation of three experiments (done in duplicate) and are expressed as fold induction of the control.

II Article 2 : Pro-oxidative activities of Abcd1 or Acox1 deficiency, and of VLCFA on murine oligodendrocytes support evidences of lipid peroxidation in X-ALD patients

(Soumis à Human Molecular Genetics)

Mauhamad Baarine, Zilal Kattan, Kévin Ragot, Pierre Andréoletti, Anne Athias, Emmanuelle C Genin, Stéphane Savary, Mustapha Cherkaoui-Malki, Gérard Lizard

1 Introduction

L’X-ALD et la P-NALD sont des maladies peroxysomales demyélinisantes résultant respectivement de dysfonctionnements de l’hémitransporteur peroxysomal ABCD1 et de l’enzyme ACOX1, première enzyme de la β -oxydation peroxysomale (Mosser *et al.*, 1993; Fournier *et al.*, 1994). Ces deux pathologies ont en commun une accumulation cytoplasmique et tissulaire d’AGTLC (C24:0 et C26:0). Comme les peroxysomes sont impliqués dans le métabolisme des AG, ainsi que dans le métabolisme des espèces réactives de l’oxygène (ERO) et de l’azote (ERN), nous avons étudié les effets pro-oxydants des AGTLC sur des oligodendrocytes murins 158N exprimant ou non *Abcd1* ou *Acox1*. Après avoir quantifié l’accumulation des AGTLC (utilisés à 5, 10 et 20 μ M) dans les cellules et leur répartition dans différentes sous-classes de lipides, nous avons évalué la mort cellulaire induite par les AGTLC (à 24 et 48 h) et déterminé les effets des AGTLC sur le statut RedOx (à 24 h) en prenant en compte : 1) la production des ERO et ERN, 2) les défenses anti-oxydantes (taux de glutathion réduit, activités catalase et SOD), 3) la peroxydation lipidique (4-HNE, 7-hydroxycholestérols, HODEs) et les conséquences de l’oxydation au niveau de l’ADN et des protéines, 4) l’effet de l’extinction des gènes des protéines peroxysomales *Abcd1* et *Acox1* sur la production d’ERO et ERN. En utilisant des plasmas de patients avec différentes formes d’X-ALD fournis par le Pr Patrick Aubourg (INSERM UMR 745 / Hôpital St Vincent de Paul, Paris), nous avons recherché des marqueurs de peroxydation lipidique (7-

RESULTATS

hydroxycholestérols, HODEs) dans ces échantillons sur lesquels les taux de C24:0 et C26:0 ont été également mesuré. Des plasmas de sujets normaux ont été utilisés comme contrôle.

Ce travail a permis de montrer, en accord avec les résultats obtenus par d'autres équipes ([Hein et al., 2008](#); [Fourcade et al., 2008](#)), que les AGTLC ont des effets anti-prolifératifs et activent la mort cellulaire des cellules 158N en provoquant une dépolarisation des mitochondries dès 20 μ M.

De plus, ce travail a fournis des informations nouvelles permettant de mieux comprendre la physiopathologie de l'X-ALD et de la P-NALD : 1) l'accumulation de C24:0 et C26:0 induit un stress oxydant important ; 2) l'extinction d'*Abcd1* ou d'*Acox1* est suffisante pour augmenter le stress oxydant ; 3) l'extinction d'*Abcd1* ou d'*Acox1* accentue le stress oxydant induit par les AGTLC.

Par ailleurs, les analyses biochimiques réalisées par CPG (Chromatographie en Phase Gazeuse) ou HPLC (Chromatographie Liquide à Haute Performance) couplée à la spectrométrie de masse (MS) sur le plasma de patients présentant différentes formes d'X-ALD ont montré des augmentations importantes des taux de marqueurs de peroxydation lipidique (7-hydroxcholestérols, HODEs) résultant d'un stress oxydant chez 80% des malades atteints de CCALD. Dans les autres formes d'X-ALD moins sévères (ACALD, AMN et Addison), cette accumulation est moins importante. Cette étude révèle pour la première fois la présence de marqueurs du stress oxydant significativement plus élevés chez les sujets atteints de CCALD, renforçant l'hypothèse selon laquelle le stress oxydant pourrait intervenir dans l'évolution de l'X-ALD ([Sing & Pujol, 2010](#)).

RESULTATS

Pro-oxidative activities of Abcd1 or Acox1 deficiency, and of VLCFA on murine oligodendrocytes support evidences of lipid peroxidation in X-ALD patients

(Soumis à Free Radical Biology and Medecine)

Mauhamad Baarine ¹, Zilal Kattan ¹, Kévin Ragot ¹, Pierre Andréoletti ¹, Anne Athias ²,
Emmanuelle C Genin ¹, Stéphane Savary ¹, Mustapha Cherkaoui-Malki ¹, Gérard Lizard ^{1*}

¹ Centre de Recherche INSERM 866 (Lipides, Nutrition, Cancer) – Equipe Biochimie Métabolique et Nutritionnelle / Université de Bourgogne, Dijon, France

² INSERM IFR100 Santé - STIC / Plateau Technique de Lipidomique, CHU hôpital du Bocage, Boulevard Maréchal de Lattre de Tassigny, Dijon, France

*** To whom correspondence should be addressed :**

Dr. Gérard Lizard (Ph.D), Centre de Recherche INSERM 866, Faculté des Sciences Gabriel, 6
Bd Gabriel, 21000 Dijon, France

Phone: +33 380 39 62 56;

Fax: +33 380 39 62 50

Email: Gerard.Lizard@u-bourgogne.fr

Abstract

X-linked adrenoleukodystrophy (X-ALD) and pseudo neonatal adrenoleukodystrophies (P-NALD) are demyelinating diseases resulting from the functional loss of the peroxisomal ATP-binding cassette transporter D (ABCD1) and from single peroxisomal enzyme deficiency (Acyl-CoA oxidase1: ACOX1), respectively, involved in the metabolism of very long chain fatty acids (VLCFA: C24:0, C26:0). As peroxisomes are involved in the metabolism of reactive oxygen species (ROS) and nitrogen species (RNS), we examined the impact of VLCFA on 158N murine oligodendrocytes expressing or not *Abcd1* or *Acox1*. We show that VLCFA inhibit cell growth, induce cell death, activate an oxidative stress characterized by an overproduction of ROS and RNS associated with lipid peroxidation, increase superoxide dismutase activity, decrease catalase activity and glutathione level. Protein carbonylation and DNA degradation were observed. SiRNA extinction of *Abcd1* or *Acox1* increased ROS and RNS production even in the absence of VLCFA, and contributed to enhance VLCFA-induced oxidative stress. Noteworthy, high levels of peroxidation markers (total 7-hydroxycholesterols, HODEs) were mainly observed in the plasma of patients with inflammatory cerebral X-ALD (CCALD). Our data demonstrate: i) VLCFA induce an oxidative stress, ii) *Abcd1* or *Acox1* deficiency is sufficient to disrupt Redox equilibrium, iii) lipid peroxidation mainly occurs in the most aggressive form of X-ALD.

Keywords: X-ALD, P-NALD, lipid peroxidation, VLCFA, total 7-hydroxycholesterols, HODEs, 158N oligodendrocytes.

RESULTATS

Introduction

Peroxisomes are single cell membrane organelles present in nearly all eukaryotic cells. They are essential to some cellular functions such as lipid metabolism [1]. These organelles are mainly involved in the β -oxidation process of long-chain fatty acids (LCFA), very-long-chain fatty acids (VLCFA) and branched-chain fatty acids [2]. They are also involved in the synthesis of specific fatty acids such as docosahexaenoic acid (DHA, C22:6 n-3) that are essential for the brain as well as of plasmalogens playing major roles in the growth of neural cells [3], and which are important components of myelin sheath (a complex of proteins and lipids: 30% proteins, 70% lipids, mainly cholesterol and sphingomyelin) that extends from oligodendrocytes and wraps concentrically around nerve fibers, thereby insulating them and facilitating rapid transmission of nerve impulses [4]. Consequently, alterations of peroxisomal functions, especially in the oligodendrocytes, favour the accumulation of VLCFA and are detrimental for the nervous system development and functions [5-7].

Currently, data obtained with transgenic mice support that the loss of peroxisomes in the oligodendrocyte lineage is sufficient to lead to demyelination in central nervous system. Indeed, in *CNP-Pex5* knockout mice [5], the absence of functional peroxisomes caused progressive demyelination. At the opposite, when peroxisomes were deleted from astrocytes in *GFAP-Pex5* (-/-) mice or from neurons in *NEX-Pex5* (-/-) mice, the absence of peroxisomal metabolism in these cells did not provoke the neurodegenerative phenotype observed after deleting peroxisomes from oligodendrocytes whereas a marked accumulation of VLCFA was observed in brain [7]. Thus, these data underline that peroxisomes need to be present within oligodendrocytes to preserve axons and their myelin sheath [6].

In humans, the absence of functional peroxisomes is associated with multiple abnormalities leading to peroxisomal leukodystrophies. X-linked adrenoleukodystrophy (X-ALD; OMIM 300100), the most frequent peroxisomal leukodystrophy (1/17,000), and pseudo-neonatal adrenoleukodystrophy (P-NALD; OMIM 264470) a very rare peroxisomal leukodystrophy (1/200,000), are associated with peroxisomal transporters abnormalities and a single peroxisomal enzyme deficiency, respectively.

X-ALD is characterized by progressive demyelination within the peripheral and central nervous system, adrenal insufficiency and accumulation of saturated (C24:0; C26:0), and to a lesser extent, monounsaturated (C26:1) VLCFA in plasma and tissues [1, 8, 9]. X-ALD is characterized by a highly variable clinical spectrum, and currently no genotype/phenotype correlation has been established [10, 11]. It ranges from cerebral demyelinating, inflammatory childhood phenotypes associated with a poor prognosis (CCALD: childhood cerebral ALD),

RESULTATS

to milder adolescent and adulthood disease with focal demyelination in the central nervous system (ACALD: adolescent cerebral ALD), to adulthood forms without central nervous system demyelination and considerably slower symptom progression (AMN: adrenomyeloneuropathy) and to Addison disease [1, 9]. X-ALD is caused by mutations in the *ABCD1* gene located in Xq28 encoding a peroxisomal ABC transporter called adrenoleukodystrophy protein (ALDP), which participates in the entry of VLCFA-CoA into the peroxisome [9, 12, 13]. Recently, as ELOVL1 has been reported as the single enzyme catalyzing the synthesis of both saturated VLCFA (C26:0) and monounsaturated VLCFA (C26:1), this enzyme provides new insights on the pathways leading to elevated levels of VLCFA in X-ALD [14]. Indeed, VLCFA accumulating in X-ALD are partly absorbed from the diet [15] but mostly result from endogenous synthesis through elongation of LCFA [16].

P-NALD is a very rare single peroxisomal enzyme deficiency (Acyl-CoA oxidase1 (ACOX1) deficiency) characterized by several signs and symptoms including generalized hypotonia, deafness, apnea, dysphagia, retinal degeneration, enlarged liver, and also high plasmatic and tissular levels of VLCFA [17, 18]. In addition, children with P-NALD show neurodevelopmental regression, neurological deterioration, and early die. In humans, *ACOX1* gene is located on chromosome 17q25 and consists of 15 exons and 14 introns, with two exons 3 named 3a and 3b [19]. An alternative splicing of the pre-mRNA leads to the synthesis of two mature mRNAs, which encode two isoforms: ACOX1a and ACOX1b [20, 21]. ACOX1 catalyzes the first and rate-limiting step of straight-chain fatty acid β -oxidation, and ACOX1 activity leads to enoyl-CoA and hydrogen peroxide production.

Whereas it is well admitted that myelin synthesis is under the control of peroxisome present within oligodendrocytes [6], the pathomechanisms of X-ALD and P-NALD remain unclear. Therefore, a better understanding of the relationships between accumulation of VLCFA, peroxisomal status [22, 23], glial cell death [21-26], inflammation and oxidation [27-31] observed in brain lesions of patients with peroxisomal leukodystrophies is still needed. Among these events, some investigations support the hypothesis that the oxidative stress might be a major factor in the pathogenesis of peroxisomal leukodystrophies, especially in X-ALD. In a mouse model of X-ALD, in which an 'AMN-like' phenotype was observed (characterized by an abnormal neurological and behavioral phenotype, starting at around 15 months, correlated with slower nerve conduction, and with myelin and axonal anomalies detectable in the spinal cord and sciatic nerve, but not in brain) [32, 33], oxidative damages to proteins in spinal cord was observed [34]. It was also shown that an excess of VLCFA triggers free radical production *in vitro* and *ex vivo* in an organotypic spinal cord slice culture

RESULTATS

system [31, 34]. In humans, in female carriers of X-ALD [35], and in symptomatic and asymptomatic patients with X-ALD [36, 37] various oxidative stress parameters measured in the plasma and in erythrocytes and fibroblasts were either increased (superoxide dismutase, thiobarbituric acid reactive species) or decreased (total anti-oxidant defences, catalase, and glutathione peroxidase activities). Moreover, a 6 months pilot trial of valproic acid in X-ALD patients resulted in reversion of the oxidative damage of proteins in peripheral blood mononuclear cells [31].

So, in the present study, we determined the impact of the main VLCFA (C24:0, C26:0) found at increased levels in the plasma and tissues of patients with X-ALD and P-NALD [38] on the oxidative status of 158N murine oligodendrocytes which have some characteristics of well differentiated oligodendrocytes [39]. We precised the consequences of the inactivation of *Abcd1* and *Acox1* expression on oxidative status, and simultaneously investigated the plasmatic levels of C24:0, C26:0 with those of potential markers of oxidative stress (total 7-hydroxycholesterols, hydroxyoctadecadienoic acids (HODEs)) in patients with various forms of X-ALD (CCALD, ACALD, Addison disease, and AMN) [9].

We demonstrate that: i) C24:0 and C26:0 are able to induce an oxidative stress on 158N murine oligodendrocytes; ii) inactivation of *Abcd1* and *Acox1* expression in 158N cells is sufficient to induce overproductions of reactive oxygen species (ROS) and nitrogen species (RNS) which are increased by C24:0 and C26:0; iii) potential markers of lipid peroxidation (total 7-hydroxycholesterols, HODEs) are present at high levels especially in the plasma of some patients with CCALD, the most severe form of X-ALD.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Cell culture and treatments

Normal murine oligodendrocytes (158N) immortalized with the SV40 large T-antigen derive from Tabby male (Ta/Y) control mice [40, 41]. These cells have some characteristics of well differentiated oligodendrocytes [39]. They were seeded at 5,000–10,000 cells/cm² either in 75-cm² culture flasks or in Petri dishes (100 mm in diameter) and cultured in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) supplemented with 5% (v/v) heat inactivated fetal bovine serum. Cells were incubated at 37°C in an humidified atmosphere containing 5% CO₂, trypsinized (0.05% trypsin-0.02% EDTA solution) and passaged twice a week .

C24:0 and C26:0 were from Sigma-Aldrich (St Louis, MO, USA). They were solubilized in alpha-cyclodextrin (Sigma-Aldrich) as previously described [42]. Final concentration of

RESULTATS

alpha-cyclodextrine (vehicle) in the culture medium is 1 mg/ml [26]. For the different experiments, the conditions of treatment with VLCFA (tetracosanoic acid C24:0; hexacosanoic acid C26:0) were the followings. After plating 158N cells in 6 or 12 wells plates for 48 h, the cells were further treated for 24 or 48 h with various VLCFA concentrations (5, 10, 20, 40 μ M) in HAM's-F10 medium. For transfected cells, cells were plated for 24 h in 12 well plates, transfected with Abcd1 or Acox1 siRNAs for 24 h in DMEM medium supplemented with 10% SVF, and then treated for 24 h with different VLCFA concentrations (5, 10, 20 μ M) in HAM's-F10 medium. The concentrations of VLCFA used were in the ranges of those identified in the plasma of patients with X-ALD, P-NALD, and other peroxisomal leukodystrophies [38, 43].

Cell counting

After trypsinization with a 0.05% trypsin-0.02% EDTA solution, cells were centrifuged, and resuspended in culture medium. The total number of cells was determined after 24 h and 48 h of treatment with C24:0 and C26:0 (5, 10, 20, and 40 μ M) under a light microscope (Axioskop right microscope, Zeiss, Jena, Germany) using a hematocytometer.

Nuclei staining with Hoechst 33342

Nuclear morphology of untreated and VLCFA-treated cells was characterized by fluorescence microscopy after staining with Hoechst 33342 (2 μ g/ml): normal cells are characterized by round and regular nuclei, apoptotic cells by condensed and/or fragmented nuclei, necrotic cells by irregular and diffuse nuclei [44]. Cell deposits of about 40,000 cells were applied to glass slides by cytocentrifugation (5 min, 1,500 rpm) with a cytospin 2 (Shandon, Cheshire, UK), mounted in Dako fluorescent mounting medium (Dako, Copenhagen, Denmark), and stored in the dark at 4°C until observation. The morphological aspect of cell deposits was determined with an Axioskop fluorescent microscope (Zeiss, Jena, Germany) by using UV light excitation. For each sample, 300 cells were examined.

Transmission electron microscopy

Transmission electron microscopy was used to visualize the ultrastructural modifications induced by VLCFA (C24:0 and C26:0, 20 μ M, 24-48 h) on 158N murine oligodendrocytes. Briefly, the samples were fixed for 1 h at 4°C in 2.5% (w/v) glutaraldehyde diluted in cacodylate buffer (0.1 M, pH 7.4), washed twice in cacodylate buffer (0.1 M, pH 7.4), post-fixed in 1% (w/v) osmium tetroxide diluted in cacodylate sodium (0.1 M, pH 7.4) for 1 h at

RESULTATS

room temperature in the dark, and rinsed twice in cacodylate buffer (0.1 M, pH 7.4). The preparations were then dehydrated in graded ethanol solutions and embedded in Epon. Ultra-thin sections were cut with a diamond knife on an ultramicrotome, contrasted with uranyl acetate and lead citrate, and examined under an H7500 electron microscope (Hitachi, Tokyo, Japan).

Flow cytometric evaluation of cell viability by staining with propidium iodide

At the end of the incubation times (24 - 48 h) in the absence or in the presence of C24:0 or C26:0 (5, 10, 20, and 40 μ M), 158N cells were colored with propidium iodide (PI), which enters cells with permeable plasmatic membrane and stains dead cells only [45]. Fluorescence of PI was collected using a 590/10 nm bandpass filter and measured on a logarithmic scale. Flow cytometric analyses were performed on Galaxy flow cytometer (Partec, Münster, Germany). Ten thousand cells were acquired for each sample. Data were analyzed with FlowMax software (Partec).

Flow cytometric measurement of transmembrane mitochondrial potential with JC-1

Variations of the mitochondrial transmembrane potential ($\Delta\Psi_m$) were measured with 5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethylbenzimidazolylcarbocyanine iodide (JC-1; Invitrogen, Cergy Pontoise, France) which allows to determine the percentage of cells with low $\Delta\Psi_m$. JC-1 is a cationic dye that exhibit potential-dependent accumulation in mitochondria, indicated by a fluorescence emission shift from green (~525 nm) to red (~590 nm). Consequently, mitochondrial depolarization is indicated by a decrease in the red fluorescence and by an increase of green fluorescence. In viable cells, the potential-sensitive color shift is due to concentration dependent formation of red fluorescent J-aggregates in mitochondria [46]. JC-1 stock solution was prepared at 1 mg/ml in DMSO, stored in the dark at -20°C, and used at 1 μ g/ml on cell suspension adjusted at 1×10^6 cells per ml of culture medium. Flow cytometric analyses were performed on Galaxy flow cytometer (Partec). Ten thousand cells were acquired for each sample. Data were analyzed with FlowJo software (Tree Star Inc., Ashland, OR, USA).

Flow cytometric measurement of superoxide anions, hydrogen peroxide, and nitric oxide

The production of superoxide anions, hydrogen peroxide, and nitric oxide was performed on sub-confluent 158N murine oligodendrocytes cultured in the absence or in the presence of VLCFA (5, 10 and 20 μ M) for 24 h.

RESULTATS

The whole intracellular production of superoxide anion ($O_2^{\cdot-}$) was detected with DHE (Invitrogen) which is a non-fluorescent compound which can diffuse through cell membranes, and which is rapidly oxidized in ethidium under the action of $O_2^{\cdot-}$ [47]. DHE was initially prepared at 10 mM in DMSO and used at 2 μ M final concentration on cell samples of 1×10^6 cells/mL of HAM'S F10 medium. Cells were incubated for 15 min at 37°C cells before flow cytometric analysis.

The mitochondrial production of superoxide anion ($O_2^{\cdot-}$) was detected with MitoSOX (Invitrogen). MitoSOX™ Red reagent is live-cell permeant and is rapidly and selectively targeted to the mitochondria. Once in the mitochondria, MitoSOX™ Red reagent is oxidized by superoxide and exhibits red fluorescence (λ_{Ex} = 510 nm; λ_{Em} = 580nm). MitoSOX™ Red reagent is readily oxidized by superoxide but not by other ROS- or reactive nitrogen species (RNS)–generating systems. The oxidation product becomes highly fluorescent upon binding to nucleic acids [48, 49]. MitoSOX was initially prepared at 5 mM in PBS and used at 5 μ M final concentration on cell samples of 1×10^6 cells/mL of PBS. Cells were incubated for 15 min at 37°C cells before flow cytometric analysis.

To detect nitric oxide (NO), DAF-FM diacetate (4-amino-5-methylamino- 2', 7'-difluorescein diacetate) (Invitrogen) was used [50]. Inside the cells, DAF-FM diacetate rapidly reacts with NO to form the fluorescent compound benzotriazole derivative (λ_{Ex} max 495 nm, λ_{Em} max 515 nm). DAF-2 was prepared at 5 mM in DMSO and used at 10 μ M on cell samples of 1×10^6 cells/ml of PBS. After 15 min of incubation at 37 °C, cells were analyzed by flow cytometry.

DHR123 is a lipophilic oxidation-sensitive indicator of H_2O_2 which is known to enter cells and intracellular compartments easily [51]. DHR123 is oxidized by H_2O_2 and forms the cationic, membrane-impermeable fluorescent dye Rh123. Thus, fluorescence Rh123 reflects intracellular H_2O_2 level . DHR123 (Sigma-Aldrich) was prepared at 2 mM in DMSO and used at 6 μ M on cells samples of 1×10^6 cells/ml of PBS. After 15 min of incubation at 37 °C, cells were analyzed by flow cytometry.

The fluorescent signals were collected either through a 520 ± 20 nm band pass filter (DHR123, DAF-FM), a 580 ± 20 nm band pass filter (DHE) or a 420 nm long pass filter on a logarithmic scale of four decades of log on a GALAXY flow cytometer (Partec) equipped with an argon laser emitting at 488 nm. For each sample, 10,000 cells were acquired and the data were analyzed with Flomax software (Partec).

RESULTATS

Quantification of reduced and total glutathione

The redox status was also evaluated by the level of intracellular reduced glutathione (GSH) and total glutathione by using flow cytometric and colorimetric methods, respectively.

By flow cytometry, intracellular level of GSH was determined after staining with monochlorobimane (MCB) ([syn-(ClCH₂, CH₃)-1,5-diazabicyclo-[3.3.0]-octa-3,6-dione-2,8-dione); λ_{Ex} max: 380 nm, λ_{Em} max: 461 nm]) (Invitrogen) [52]. MCB, which reacts with GSH under the action of glutathione S-transferase, was prepared at 4 mM in 100% ethanol and stored in the dark at 4°C. It was added at 200 μM in cell suspensions adjusted to 10^6 cells/ml in PBS. After 30 min of incubation at 37°C, cells were washed and mixed in PBS, and the blue fluorescence of MCB was collected with a 420-nm-long pass filter on a GALAXY flow cytometer (Partec) equipped with a UV lamp. For each sample, 10,000 cells were acquired and the data were analyzed with Flomax software (Partec).

Total GSH was quantified by a colorimetric method by using the ApoGSHTM glutathione colorimetric kit (BioVision, Mountain View, CA). Briefly, a cell lysat was performed on 5×10^5 cells, and for each sample 20 μl of cell lysat were added to a mix constituted of 20 μl NADPH Generating Mix, 20 μl glutathione reductase, and 120 μl glutathione reaction buffer. After 10 min incubation at room temperature 20 μl of glutathione substrate (DTNB) were added, and further incubated for 10 min at room temperature. The absorbance was read at 405 nm, and data obtained were quantified by using a standard glutathione calibration curve and expressed in ng of total glutathione/ 10^6 cells.

Quantification of superoxide dismutase activity

The total superoxide dismutase (SOD) activity was measured using a SOD Assay Kit-WST (Dojindo Molecular Technologies, Tokyo, Japan). Briefly, the total SOD activity was measured by the inhibition rate of 2-(4-iodophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-(2,4-disulfophenyl)-2H-tetrazolium, monosodium salt (WST-1) reduction. SOD activity was expressed as units per milligram of protein (1 U was defined as the amount of enzyme protein that inhibited the reduction of WST-1 by 50%).

Quantification of catalase activity

To perform enzymatic activity, the protein extract was prepared on $8\text{--}30 \times 10^6$ cells in the following conditions. Cells were mixed in 7.5 ml PBS containing a mixture of protease inhibitors (Roche Diagnostics Inc, Basel, Switzerland), and three successive freezing and thawing cycles were performed. The samples were then sonicated, centrifuged at 14,000 rpm

RESULTATS

for 30 min, and the supernatant, constituting the enzymatic solution, was collected. Catalase activity was quantified with the Amplex Red Catalase Assay Kit (Invitrogen), which is a sensitive assay that uses a nonfluorescent detection reagent to measure the H_2O_2 substrate left over from the catalase reaction. In the assay, catalase first reacts with H_2O_2 to produce water and oxygen (O_2). Next the Amplex Red reagent reacts with a 1:1 stoichiometry with any unreacted H_2O_2 in the presence of horseradish peroxidase (HRP) to produce the highly fluorescent oxidation product, resorufin. Therefore, as catalase activity increases, the signal from resorufin decreases. The stock solution of Amplex Red was prepared in DMSO and stored at -20°C . The reaction medium containing 25 μl H_2O_2 (20 μM final concentration) and 25 μl of enzymatic solution was incubated at room temperature for 30 min. At the end of the incubation time, 50 μL of reaction mixture (100 μM Amplex Red, 0.4 U/mL HRP) was added, and the mixture was incubated at 37°C for 30 min. The absorbance of resorufin-formed solution was measured at 570 nm using a spectrophotometer. One unit of the enzyme is defined as 1 μmol of H_2O_2 consumed per minute and the specific activity is reported as units per milligram of protein.

Flow cytometric evaluation of DNA fragmentation

To determine the percentage of SubG1 cells (indicating the presence of cells with internucleosomal DNA fragmentation characteristic of apoptotic cells) and of hypodiploid cells (indicating the presence of cells with degraded DNA) [53], 158N cells were seeded in 6 well plates (70,000 cells/well) in 2 ml of culture medium. The cells were cultured in the absence or in the presence of C24:0 or C26:0 (10 and 20 μM) for 24 h. At the end of the incubation time non-adherent cells and cells collected by trypsinization were pooled, washed in PBS and fixed in 2 ml cold 80% ethanol for 2 h at -20°C . The cells were washed again twice with 4 ml PBS and stained by a 80 $\mu\text{g}/\text{ml}$ solution of propidium iodide (PI) containing 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ RNase A. Stained cells were analysed with a Galaxy flow cytometer (Partec) equipped with a 488 nm blue laser providing acquisition of 10,000 events. Red fluorescent of PI was detected through a 625 nm long pass filter to measure the DNA content. Data were analyzed with FlowJo software (Tree Star Inc.)

Quantification of protein carbonylation

Protein carbonyl groups were quantified by using Protein Carbonyl assay kit (Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, USA). Cells were collected by trypsinization, homogenized and sonicated on ice for protein extraction in 1 ml of 2-(N-morpholino) ethanesulfonic acid

RESULTATS

monohydrate cold buffer (50 mM). The samples were then centrifuged at 10,000 g for 15 min at 4°C and the supernatant constituting the protein solution was collected. The contaminating nucleic acid present in the sample was removed by incubation with streptomycin sulphate used at 1% final concentration. 800 µL of DNPH were added to 200 µl of assay extract, mixed, incubated for 1 h at room temperature. A blank without DNPH was performed for each sample. Proteins were precipitated with an equal volume of 20% trichloroacetic acid and centrifuged at 10,000 g for 10 min. The precipitated protein pellet was washed three times with ethanol/ethylacetate mixture (v/v). After washing, the proteins were collected by centrifugation at 10,000 g for 10 min. The pellet was dissolved in 500 µL of guanidine hydrochloride (6 M) by vortexing, and 220 µl of this final solution was transferred into two wells of a 96-well plate. The absorbance of DNPH in the assay ($\epsilon = 0,022 \mu\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$) was measured at 380 nm against the blank.

Flow cytometric and microscopical analysis of 4-hydroxynonenal

4-hydroxynonenal (4-HNE) is an α,β -unsaturated hydroxyalkenal which is produced by lipid peroxidation in cells and is therefore a suitable marker of oxidative stress. As 4-HNE has an aldehyde function, it is highly reactive and can react with various molecules giving 4-hydroxynonenal adducts [54, 55].

To identify and quantify 4-HNE and 4-HNE adducts, by flow cytometry cells were collected by trypsinization (Sigma-Aldrich), washed, and resuspended in PBS, and fixed in freshly prepared 2% paraformaldehyde diluted in PBS (pH 7.4) for 10 min at room temperature. Furthermore, the cells were treated with the FACS permeabilizing solution 2 (BD-Biosciences, San Jose, CA, USA) for 10 min. After washing in PBS, cells were then incubated for 20 min with blocking buffer (PBS, 0.05% saponine, 10% goat serum), washed in PBS, and incubated for 1 h at room temperature with a mouse monoclonal anti 4-HNE (Abcys, Paris, France) diluted in blocking buffer (2 µg/ml). Cells were further washed twice with PBS and incubated for 1 h at room temperature with a 488-Alexa goat anti mouse polyclonal antibody diluted at 1/300 in blocking buffer. Cells were further washed and resuspended in PBS, and immediately analyzed by flow cytometry on a GALAXY flow cytometer (Partec). The green fluorescence of 488-Alexa was collected with a 520/10-nm band pass filter. The fluorescent signals were measured on a logarithmic scale. For each sample, 10,000 cells were acquired, and the data were analyzed with FlowMax (Partec) and FlowJo (Tree Star Inc.) softwares.

RESULTATS

For fluorescence microscopy, immunofluorescence staining procedure was similar that by flow cytometry but the secondary antibody is a 594 nm -Alexa goat anti mouse polyclonal antibody (Invitrogen) diluted at 1/300 in blocking buffer. Immunofluorescence staining was performed on cells seeded at 10,000 cells/cm² on 12 mm glass coverslips or on cell deposits, applied to glass slides by cytocentrifugation with a cytospin 4 centrifuge (Shandon, Cheshire, UK). After washing with PBS, slides were mounted, and observations were realized with an Axioskop Zeiss microscope ((Zeiss, Jena, Germany).

Quantification of total 7-hydroxycholesterols, hydroxyoctadecadienoic acids, and very long chain fatty acids (C24:0, C26:0) by gas chromatography or liquid chromatography coupled with mass spectrometry

Analyses performed by gas or liquid chromatography coupled with mass spectrometry were realised with deuterated internal standards such as 7 β -hydroxycholesterol-d7 and 13(S)-hydroxyoctadecadienoic acid-d4 obtained from Cayman Chemical (Ann Arbor, MI, USA).

Oxysterol analysis was performed after reduction of 7-ketocholesterol and after hydrolysis of oxysterol-esters with KOH in order to obtain 7 β - and 7 α -hydroxycholesterol (total 7-hydroxycholesterols), as previously described [56]. A silylating agent, N,O-bis(trimethylsilyl)-trifluoroacetamide (Pierce; Rockford, IL, USA) was added to obtain trimethyl silyl esters which will be analysed using a HP6890 Gas Chromatograph equipped with a HP5973 Mass Selective Detector (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) and a HP-5MS fused silica capillary column (30 m x 0.25 mm inner diameter, 0.25 μ m film thickness) (Agilent Technologies). The gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) conditions were as follows: carrier gas, helium at a flow-rate of 1.1 ml/min; injector temperature, 250°C; oven temperature, 180°C, increased at 10 °C/min to 260°C, then at 1°C/min to 280°C and held for 5 min. The mass spectrometer was operated under electron impact mode with electron energy of 70 eV. The ion source and the quadrupole temperature were 230°C and 150°C, respectively.

Total hydroxyoctadecadienoic acids (9-hydroxy-octadecadienoic acid, and 13-hydroxy-octadecadienoic acid: HODEs) analysis was carried out on a Zorbax Eclipse Plus C18, 2.1x100 mm, 1.8 μ m column (Agilent Technologies) in a 1200 HPLC (Agilent Technologies). Conditions of chromatography were as described [56]. The ESI-MS analyses were performed using a 6460 triple quadrupole (Agilent Technologies) by multiple reaction monitoring (MRM) after collision-induced dissociation in the negative mode with the use of nitrogen as

RESULTATS

collision gas. Transitions were the same as described [56] and collision energy was determined after the optimization of MS/MS.

Quantification of C24:0 and C26:0 was realized as previously described [57] using a HP7890A Gas Chromatograph equipped with an HP7683 Injector and a HP5975C Mass Selective Detector (Agilent Technologies). Chromatography was performed using an HP-5MS fused silica capillary column (30 m x 0.25 mm inner diameter, 0.25 mm film thickness, Agilent Technologies). The GC-MS conditions were as follows: carrier gas, helium at a flow-rate of 1.1 ml/min; injector temperature, 250°C, splitmode; oven temperature 140°C, increased at 5°C/min to 300°C, and held for 10 min. The mass spectrometer was operated under negative chemical ionization mode with methane as reactant gas. The ion source temperature and the quadrupole temperature were 150°C and 106°C, respectively. A SIM program was used for mass spectrometry with $[M - 181]^-$ ions as quantification.

Repartition of C24:0 and C26:0 in lipid sub-classes

Total lipids of 158N cells cultured for 24 h in the absence or in the presence of alpha-cyclodextrine (1 mg/ml), C24:0 or C26:0 (5, 10, and 20 μ M) were extracted with chloroform/methanol (2/1 v/v) according to the method of Folch [58]. Lipid mixtures were separated by chromatography affinity in three classes (neutral sterols, phospholipids, and free fatty acids (FFA)) as previously described [59]. Lipid extracts were further incubated at 56°C for 45 min. After incubation, fatty acids were extracted by adding 1 ml of 1.2 M HCl and 2 ml of hexane to each tube. The tubes were shaken at room temperature for 5 min, centrifuged and the organic phase was evaporated to dryness under nitrogen and derivatized to pentafluorobenzyl esters with 100 μ l of acetonitrile, 5 μ l of pentafluorobenzyl bromide and 5 μ l of diisopropylethylamine at room temperature for 30 min. Internal standard used were C17:0-cholesterol, tricosanoic acid (C23:0), and diC21:0-phosphatidylcholine. Quantification of C24:0 and C26:0 was realized as previously described [57] using a HP7890A Gas Chromatograph equipped with an HP7683 Injector and a HP5975C Mass Selective Detector (Agilent Technologies). The ions used for analysis (m/z) were as follows: C17:0, 269; C21:0, 325; C23:0, 353; C24:0, 367; C26:0, 395.

Inactivation of Abcd1 and Acox1 with SiRNAs

Acox1 siRNAs were from Invitrogen, and Abcd1 siRNAs were from Ambion (Applied Biosystems, Courtaboeuf, France). These siRNAs were used at 30 nM and transfected in 158N cells by means of the INTERFERin transfection reagent according to the manufacturer's

RESULTATS

instructions (Polyplus / Ozyme, St Quentin en Yvelines, France). For *Abcd1* inactivation, three siRNAs were tested:

siRNA 1 (1D s62233), 5'-cacugucguuuuaagaggatt-3'(sense) and 5'-uccucuuaaaacgacagugtt-3'(antisense);
siRNA 2 (1D s62234), 5'-ccaacagacuacuaccgatt-3'(sense) and 5'-ucgguaguaagucuguuggga-3'(antisense);
siRNA 3 (1D s62235), 5'-gaagccgucuaguagcucatt-3'(sense) and 5'-ugagcuacuagacggcuucgg-3'(antisense).

For *Acox1* inactivation, three siRNAs were also used:

siRNA 1 (stealth 373), 5'-auuaacucuggauugaagguggcgg-3'(sense) and 5'-ccgccaccuucuaucagaguuaau-3'(anti-sense);
siRNA 2 (stealth 813), 5'-cccaagaccaagagucauucuca-3'(sense) and 5'-ugagaaugaacucuugggucuuggg-3'(anti-sense);
siRNA 2 (stealth 1260), 5'-aggcgccagucugaaaaucaagagaa-3'(sense) and 5'-uucucuugauuucagacuggcgccu-3'(anti-sense)].

A negative control siRNA (Ambion) directed against gene sequences with no significant homology to any known genes from mouse, rat, or human were simultaneously used. Twenty-four hours after siRNA transfection, cells were collected by trypsinization and used to analyze the expression of *Abcd1* and *Acox1* mRNAs and proteins by RT-qPCR and western blotting, respectively. To evaluate transfection efficiency, a Silencer Cy3TM labeled negative control-siRNA (Ambion) was used, and the percentage of transfected cells was determined 24 h after transfection by fluorescence microscopy using an Axioskop Zeiss microscope (Zeiss).

Quantification of *Abcd1* and *Acox1* mRNAs by RT-qPCR

Cells were harvested with trypsin/EDTA and washed with PBS. Total RNA isolation from control, Scrambled RNA, *Abcd1* SiRNAs and *Acox1* SiRNAs treated-158N cells was extracted using the RNeasy Mini kit (Qiagen, Cortaboef, France) following the manufacturer's instructions. cDNA was generated by reverse transcription using QuantiTect Rev. Transcription Kit (Qiagen) according to the manufacturer's protocol and analyzed by quantitative PCR using the SYBR Green (BioScience Technology, Rockaway, NJ, USA) real-time PCR technology, and an iCycler iQ Real-Time Detection System (Bio-Rad laboratories, Marne la Coquette, France). The primer sequences are: (*Abcd1*: forward 5'-acatccctatcatcacaccactg-3' and reverse 5'-gagaactcttgccacagccattg-3'; *Acox1*: forward 5'-

RESULTATS

gcccaactgtgacttcatt-3' and reverse 5'-ggcatgtaacccgtagcact-3'; *L27*: forward 5'-ctcatgcccacaagggtactctgtg-3' and reverse 5'-tgtatcgctcctcaaacttgacct-3') were chosen using the Beacon Designer Software (Bio-Rad laboratories). Thermal cycling conditions were as follows: activation of DNA polymerase at 95°C for 10 min, followed by 40 cycles of amplification at 95°C for 15 s, 60°C for 30 s, and 72°C for 30 s, followed by a melting curve analysis to control the absence of nonspecific products. Gene expression was quantified using cycle to threshold (Ct) values and normalized by the *L27* reference gene. The quantitative expression of *Abcd1*, *Acox1* and β -actin, was determined according to $2^{-\Delta C_t}$ with $\Delta C_t = (C_t \text{ of the gene studied}) - (C_t \text{ of the } L27)$, or as fold induction of the control.

Characterization and quantification of Abcd1 and Acox1 proteins by western blotting

After 24 h of transfection (2 days of culture), cells were trypsinized, washed with PBS, harvested and lysed in a 10 mM Tris/HCl buffer, pH 8, containing 10 mM EDTA, 1% Triton X100, 100 mM NaCl and a protease inhibitor cocktail (Roche Diagnostics Inc.) for 20 min on ice. After centrifugation at 17,000 g for 20 min at 4 °C, the total protein concentrations of supernatants were determined using bovine serum albumin as a standard (Bio-Rad Laboratories). A total protein (30 µg) was run on SDS-polyacrylamide gels (10%) according to Laemmli [60], and transferred onto a PVDF membrane (Bio-Rad Laboratories) as previously described [61]. The membrane was blocked in TBS with 0, 1% Tween containing 5% skim milk (blocking buffer) and incubated overnight at 4°C. Primary antibodies, anti *Abcd1* 1/5,000 (rabbit polyclonal, serum 925029), anti *Acox* 1/500 (rabbit polyclonal) have been described elsewhere (36), and anti β -actin 1/10,000 (mouse monoclonal, Sigma-Aldrich) were diluted in blocking buffer and applied to sections for 1 h at room temperature, (for anti *Abcd1*, the blocking buffer contained 1% skim milk). The membranes were washed TBS with 10% Tween 20 (TBST). Bands were detected using anti-IgG polyclonal antibody conjugated to peroxidase 1/10,000 (Santa Cruz, CA, USA) for 1 h at room temperature. The membranes were washed in TBST and revealed using an enhanced chemiluminescence detection kit (Santa Cruz Biotechnology Inc, Santa Cruz, CA, USA) and autoradiographed.

Patients and plasma preparation

Blood plasma taken from 25 male patients with different clinical forms of X-ALD (8 CCALD, 3 ACALD, 4 Addison disease, 10 AMN) and from 10 healthy subjects were used to evaluate the presence of lipid peroxidation markers associated with oxidative stress (total 7-hydroxycholesterols, HODEs), and to measure the plasmatic levels of C24:0 and C26:0 which

RESULTATS

are present at increased levels in X-ALD patients. Patients were diagnosed in the department of neurology of Pr P Aubourg (Hôpital St Vincent de Paul/INSERM U745, Paris, France).

The protocol of this clinical study was in agreement with the principles of the Helsinki's declaration, and was ethically approved by the local Committee on Human Research. All patients gave written informed consent for participation in this study prior to enrolment.

Statistical analysis

Statistical analyses were performed on at least three independent experiments using SigmaStat 2.03 software (Systat Software Inc) with the Mann-Whitney test. The Wilcoxon test was used for human plasma samples analysis. Data were considered statistically different at a *P*-value of 0.05 or less.

RESULTS

Effects of C24:0 and C26:0 on oligodendrocytes growth and viability

The effects of C24:0 and C26:0 (5, 10, 20, and 40 μ M) on oligodendrocyte cell growth and viability was investigated after a 24 and 48 h period of treatment on sub-confluent 158N murine oligodendrocytes. At these concentrations, oligodendrocytes show strong accumulations of C24:0 or C26:0 at 24 h in a dose-dependent manner (**Table 1**). Thus, marked accumulations of C26:0 (up to 5.4) were observed in C24:0-treated cells, suggesting the activation of elongases catalyzing the synthesis of VLCFA [62]. On the other hand, up to 2.7 folds increase of the C24:0 level was shown in the C26:0-treated cells, revealing the possible induction of C26:0 peroxisomal α -oxidation system. Moreover, the ratio [C24:0] / [C26:0] in untreated cells is around 7, and is comprised between 3 to 4 in VLCFA-treated cells. It is suggested, that this higher accumulation of C24:0 may be due either to different capture and transport, and or different metabolisms. In addition, analysis of the repartition of VLCFA in neutral sterols, phospholipids and free fatty acids (FFA) show a major accumulation under the form of FFA (**Table 1**). However, as the fold increase of C24:0 and C26:0 is important (up to 4 as soon as 5 μ M when compared to untreated cells), a dose dependent increase of the quantity of VLCFA in neutral sterols and phospholipids (expressed in ng/ 10^6 cells) was observed (**Table 1**). In these conditions, as shown on **Figure 1**, at 5 and 10 μ M, there was no effects on cell growth (quantified by counting on a hemacytometer) (**Figure 1A-B**), and on cell viability (determined by flow cytometry after staining with propidium iodide)(**Figure 1C-D**). However, at 20 and 40 μ M, cell growth was strongly

RESULTATS

inhibited (up to 60 %) and the percentages of dead cells were 4 to 5 times higher than in untreated cells (**Figure 1A-D**). As the effects of C24:0 and C26:0 on cell growth and cell viability were in the same range of order at 24 and 48 h, the effects of C24:0 and C26:0 on $\Delta\Psi_m$ were only determined at 24 h (**Figure 1E**). In these conditions, the percentages of cells with depolarized mitochondria were in the range of 10 % in C24:0 and C26:0 (10 μ M) - treated cells, and in the range of 40-60 % in C24:0 and C26:0 (20 μ M) - treated cells, whereas they were around of 5 % in untreated cells. With alpha-cyclodextrine, used as vehicle to solubilized C24:0 and C26:0, no effects on cell growth, cell viability, and $\Delta\Psi_m$ were observed when compared to untreated cells. In addition, in order to precise the mode of cell death induced by C24:0 and C26:0, the morphological aspects of VLCFA-treated cells were observed by fluorescence microscopy after staining with Hoechst 33342, and by transmission electron microscopy allowing to distinguish viable cells with round and regular nuclei, apoptotic cells with fragmented and/or condensed nuclei, and necrotic cells with disturbed nuclei of various sizes and shapes [44]. In these conditions, on VLCFA (10, 20 or 40 μ M; 24-48 h)-treated cells, when compared to untreated cells, no cells with condensed and/or fragmented nuclei were detected, and only few cells with swollen nuclei (evocating oncotic cells) were observed (our data not shown), supporting that VLCFA did not induce an apoptotic mode of cell death. As similar results were obtained at 20 and 40 μ M, further investigations were only performed with C24:0 and C26:0 used at 5, 10 and 20 μ M after 24 h of treatment.

VLCFA (C24:0 and C26:0) increase oligodendrocyte production of superoxide anions, hydrogen peroxide and nitric oxide

The effects of C24:0 and C26:0 (5, 10, and 20 μ M) on the production of superoxide anions ($O_2^{\cdot-}$), hydrogen peroxide (H_2O_2) and nitric oxide (NO) was investigated after a 24 h period of treatment on sub-confluent 158N oligodendrocytes (**Figure 2**). The superoxide anions production was analyzed by staining with DHE allowing quantification of the whole intracellular pool of superoxide anions inside the cells, and with MitoSOX staining, which permits the specific measurement of mitochondrial superoxide anions production, since the loss of $\Delta\Psi_m$ observed with JC-1 can suggest mitochondrial dysfunctions. With DHE and MitoSOX, when compared to untreated cells, no overproduction of superoxide anions was observed with C24:0 or C26:0 used at 5 μ M, whereas slight and high increased were detected at 10 and 20 μ M, respectively (**Figure 2 A-B**). With DHR123, the production of hydrogen peroxide detected was similar to that observed in untreated cells with C24:0 or C26:0 used at

RESULTATS

5 μM , slightly higher at 10 μM , and strongly enhanced at 20 μM (**Figure 2C**). With DAF-2 allowing to quantify NO, when compared to untreated cells, a dose dependent increase of NO production was found under treatment with C24:0 or C26:0 from 5 to 20 μM (**Figure 2D**). Comparatively to untreated cells, no significant effects of alpha-cyclodextrine were observed on superoxide anions, hydrogen peroxide and nitric oxide production (**Figure 2**).

VLCFA (C24:0 and C26:0) alter the anti-oxidant defences of oligodendrocytes

The effects of C24:0 and C26:0 (5, 10, 20 μM) on anti-oxidant defences were determined by measuring the intracellular levels of total and reduced glutathione, the activity of superoxide dismutases (SOD), which constitute a class of enzymes that catalyze the dismutation of superoxide into oxygen and hydrogen peroxide, and the activity of catalase catalyzing the degradation of hydrogen peroxide ($2\text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{O}_2 + 2\text{H}_2\text{O}$). GSH level, SOD and catalase activities were studied since they represent the major anti-oxidant defences in the CNS [63, 64].

Under treatment with C24:0 or C26:0, when compared to untreated 158N oligodendrocytes, an important decrease of total glutathione was only observed at 10 and 20 μM (**Figure 3A**). With monochlorobimane (MCB), allowing to detect reduced glutathione, comparatively to untreated cells, a significant decrease of glutathione positive cells detected by flow cytometry was only found at 20 μM (**Figure 3B**). Increased SOD activity and decreased catalase activity were simultaneously detected when C24:0 and C26:0 were used at 20 μM (**Figure 3C-D**). In addition, catalase activity was reduced in 158N by C24:0 used at 5 and 10 μM , whereas the same concentrations of C26:0 had no effects (**Figure 3D**). Comparatively to untreated cells, no significant effects of alpha-cyclodextrine were observed on the different parameters used to estimate anti-oxidant defences (**Figure 3**).

VLCFA (C24:0 and C26:0) induce lipid peroxidation in oligodendrocytes

The consequences of reactive oxygen species (ROS) and reactive nitrogen species (RNS) overproduction on lipid peroxidation was investigated on sub-confluent 158N cells treated for 24 h with C24:0 or C26:0 used at 5, 10, or 20 μM by measuring the levels of various molecules resulting from lipid peroxidation: 4-hydroxynonenal (4-HNE), total 7-hydroxycholesterols, and total hydroxyoctadecadienoic acids (HODEs).

Increased levels of 4-HNE were observed by fluorescence microscopy and flow cytometry in C24:0- or C26:0- treated 158N oligodendrocytes, especially at 10 and/or 20 μM (**Figure 4A**), whereas low and similar levels of 4-HNE were detected in untreated- and alpha-

RESULTATS

cyclodextrine-treated cells. At these concentrations, **Figure 4B** shows increased levels of total 7-hydroxycholesterols (including 7 α -hydroxycholesterol, 7 β -hydroxycholesterol, and 7-ketocholesterol) used as biomarkers of free radical oxidation of cholesterol. In addition, total hydroxyoctadecadienoic acids (HODEs: including 9-hydroxy-octadecadienoic acid, and 13-hydroxy-octadecadienoic acid) resulting from peroxidation of linoleate (**Figure 4C**) were significantly increased indicating the occurrence of cellular damages induced either by reactive oxygen species and/or nitric oxygen species overproduction.

Induction of DNA degradation and protein carbonylation by VLCFA (C24:0 and C26:0) in oligodendrocytes

The consequences of ROS and RNS overproduction on DNA degradation and protein carbonylation was investigated on sub-confluent 158N oligodendrocytes treated for 24 h with C24:0 or C26:0 used at 10, or 20 μ M by measuring DNA degradation and protein carbonylation.

As ROS and RNS are able to generate a variety of DNA lesions, including DNA strand breaks [65], DNA degradation was estimated by the presence of a SubG1 peak and of hypodiploid cells using flow cytometry analysis following propidium iodide staining (**Figure 5A**). The percentages of SubG1 cells (cells with inter-nucleosomal fragmented DNA corresponding to apoptotic cells) is similar in untreated cells and alpha-cyclodextrine-treated cells, and slightly higher in C24:0 - or C26:0 – treated 158N cells. However, comparatively to untreated cells, increased levels of carbonylated proteins were identified at higher concentrations (10 and 20 μ M) in C24:0- or C26:0– treated 158N oligodendrocytes.

As for protein carbonylation (**Figure 5B**), the levels of carbonylated proteins were similar in untreated-, alpha-cyclodextrine-, C24:0 and C26:0 (5 μ M)-treated cells. However, comparatively to untreated cells, increased levels of carbonylated proteins were identified in C24:0 and C26:0 (10 and 20 μ M) – treated cells.

Consequence of siRNA-mediated knockdown of *Abcd1* or *Acox1* and effects of VLCFAs (C24:0 or C26:0) treatments on oxidative stress in oligodendrocytes

In order to determine whether *Abcd1* and *Acox1* are involved in the control of oxidative stress, we chose to inactivate *Abcd1* and *Acox1* expression by silencing of the corresponding mRNAs in 158N murine oligodendrocytes. The assessment of the efficiency of *Abcd1* or *Acox1* silencing was accomplished at both mRNA and protein levels using different siRNAs. In our experimental conditions, the efficiency of transfection was 90 ± 10 %. As shown in

RESULTATS

Figure 6, the three different siRNAs raised against *Abcd1* or *Acox1* knock down the expression of the corresponding mRNAs with similar efficiencies (**Figure 6A**). From the three transfected different siRNAs, *Abcd1*#2 and *Acox1* #2 were the most efficient (more than 70% knockdown) at protein levels in oligodendrocytes (**Figure 6B**). Therefore, for further investigations, these two siRNAs were used.

Interestingly, inactivation of *Abcd1* or *Acox1* strongly increased the production of superoxide anions and hydrogen peroxide (**Figure 7A-B**), whereas it only slightly enhanced nitric oxide production (**Figure 7C**). Therefore, comparatively to untransfected cells, the production of superoxide anions and hydrogen peroxide were always higher when *Abcd1* and *Acox1* were inactivated, and when the transfected cells were cultured either in the absence or in the presence of C24:0 or C26:0 used at 5, 10 and 20 μ M (**Figure 7A-B**). Moreover, these increases were similar in untreated and alpha-cyclodextrin-treated cells, and no significant increase of superoxide anions and nitric oxide were observed in cells treated with scrambled siRNAs (**Figure 7A-B**).

Evidence of oxidative stress revealed by the presence of markers of lipid peroxidation (total 7-hydroxycholesterols, hydroxyoctadecadienoic acids (HODEs)) in the plasma of patients with X-ALD

This activation of oxidative stress by inactivation of *Abcd1* or *Acox1* on 158N murine oligodendrocytes lead us to investigate the presence of markers of lipid peroxidation (total 7-hydroxycholesterols, hydroxyoctadecadienoic acids (HODEs)) generated by an oxidative stress in the plasma of patients with different forms of X-ALD (CCALD, ACALD, Addison disease and AMN) as well as in the plasma of healthy subjects. To this end, total 7-hydroxycholesterols, VLCFA, and HODES were quantified by GC/MS, and LC/MS, respectively, in the plasma of X-ALD patients and healthy subjects (**Figure 8**).

Although high levels of C24:0 and C26:0 were observed in the different populations of patients studied and do not allow to distinguish the different forms of the disease (**Figure 8A-B**), the higher levels of total 7-hydroxycholesterols (**Figure 8C**), and HODEs (**Figure 8D**) were found in patients with CCALD, and were in the following range of order for total 7-hydroxycholesterols and HODEs: CCALD > Addison disease > AMN > ACALD. Noteworthy, in ACALD patients, the levels total 7-hydroxycholesterols and HODEs of were in the same range of order than in healthy subjects. So, our data underline that oxidative damages can be involved in the physiopathology of X-ALD. However, among patients with CCALD, 75% (6 patients among 8 studied) have both very high levels of total 7-

RESULTATS

hydroxycholesterols and HODEs whereas 25% (2 patients among 8 studied) have simultaneously low levels of total 7-hydroxycholesterols and HODEs. In these later patients, the levels of total 7-hydroxycholesterols and HODEs were in the range of those found in ACALD patients. In the plasma of healthy subjects, low levels of C24:0, C26:0, hydroxycholesterols and HODEs were identified.

DISCUSSION

Increased rates of oxidative and nitrosative stress are major factors associated with the pathogenesis of neurodegenerative diseases, playing a key role in these pathologies including amyotrophic lateral sclerosis and Parkinson's disease [66, 67]. Furthermore, experimental models and clinical investigations [31, 34], have brought some arguments suggesting that oxidative stress might be involved in the pathogenesis of peroxisomal leukodystrophies associated either with peroxisomal biogenesis disorders or with altered VLCFA peroxisomal β -oxidation [1]. Thus, oxidative damages could be linked to both initiation and progression of demyelination which constitutes a major event of peroxisomal leukodystrophies. However, the origin of this oxidative stress remains to be elucidated, mainly the part taken by the accumulation of C24:0 and C26:0 in oligodendrocytes, the myelin synthesizing cells [68], and by peroxisomal dysfunctions (*ABCD1* deficiency in X-ALD, *ACOX1* deficiency in P-NALD). Enhanced plasmatic and tissular levels of VLCFA, especially C24:0 and C26:0 [1], are hallmarks of peroxisomal leukodystrophies [38], including X-ALD and P-NALD. Hence, it was of interest to determine the effects of C24:0 and C26:0 on oligodendrocytes, and especially their ability to induce oxidative stress, which can further lead to various cellular dysfunctions contributing to the initiation and development of demyelination leading to fatal issues. To this end, 158N murine oligodendrocytes, expressing or not *Abcd1* or *Acox1*, were treated with either C24:0 or C26:0 (5, 10, 20, 40 μ M). Here, we report, that VLCFA can activate the oxidative stress in 158N cells, and that the absence of *Abcd1* or *Acox1* is sufficient to disrupt the Redox equilibrium in these oligodendrocytes. Accordingly, we show the presence of lipid peroxidation markers (total 7-hydroxycholesterols, HODEs) in the plasma of 75% of patients with the inflammatory cerebral form of X-ALD (CCALD) underlying thus the occurrence of oxidative processes in some patients with peroxisomal leukodystrophies.

As enhanced levels of VLCFA (especially C24:0 and C26:0) in tissue and plasma are hallmarks of peroxisomal leukodystrophies [1, 38], including X-ALD and P-NALD, it was of interest to determine the effects of C24:0 and C26:0 on oligodendrocytes, and especially their

RESULTATS

ability to induce oxidative stress which can further lead to various cellular dysfunctions contributing to the initiation and development of demyelination leading to fatal issues. Since induction of oxidative stress and activation of cell death are often tightly connected, we determined the effects of C24:0 and C26:0 on cell growth and viability of 158N cells. In our experimental conditions, performed on subconfluent 158N cells, no effects on cell growth and no induction of cell death were observed at 5 and 10 μ M both at 24 h and 48 h of treatment. At the opposite, at 20 and 40 μ M, a strong inhibition of cell growth was observed as well as an important induction of cell death characterized by enhanced permeability of propidium iodide (PI) which enters dead cells only. As mitochondrial dysfunction leading to cell death are known to precede membrane damages allowing the intracellular accumulation of PI [69], we also investigated the effects of C24:0 and C26:0 on transmembrane mitochondrial potential ($\Delta\Psi_m$) measured with JC-1. In these conditions, no cytotoxic effects were observed at 5 and 10 μ M whereas an important percentage of cells with depolarized mitochondria was detected at 20 μ M. This mitochondrial disturbance, also observed on normal fibroblasts and on fibroblasts of X-ALD patients [34] as well as on oligodendrocytes and astrocytes of rat brain [26] treated with C24:0 and/or C26:0 used at 20 μ M and higher, indicates that decrease of $\Delta\Psi_m$ is common to neural cells and fibroblasts, and provides evidence that mitochondrial-based cell death mechanisms are involved subsequently to VLCFA accumulation. Therefore, as cell death of oligodendrocytes has been supposed to contribute to demyelination, especially in patients with X-ALD [24, 25], the high concentrations of C24:0 and C26:0 required to induce oligodendrocyte cell death (higher than 10 μ M and rarely observed in the plasmas of patients with peroxisomal disorders [38]), rather suggest indirect effects of VLCFA via activation of immune cytotoxic processes [70] which could be activated by increased oxidative stress damages [71].

So, as a disruption of the Redox status could not be excluded even with low concentrations of VLCFA, the ability of C24:0 and C26:0 to trigger an oxidative stress was investigated at 5, 10, and 20 μ M. In these conditions, with C24:0 and C26:0, as no overproduction of ROS (superoxide anions ($O_2^{\cdot-}$), hydrogen peroxide (H_2O_2)) were found at 5 μ M, and as slight overproduction of H_2O_2 and/or of mitochondrial $O_2^{\cdot-}$ were observed at 10 μ M whereas marked overproduction of $O_2^{\cdot-}$ and H_2O_2 were found at 20 μ M, our data demonstrate that both non cytotoxic (10 μ M) and cytotoxic (20 μ M) concentrations of VLCFA induce overproduction of ROS whereas the highest overproduction was found at 20 μ M. Noteworthy, in normal and X-ALD human fibroblasts, an overproduction of ROS was also detected when the cells were treated with

RESULTATS

C26:0 at 25 or 50 μM for 24 h [31]. Interestingly, data obtained with DAF-FM allowing to identify nitric oxide (NO) reveal a marked overproduction of NO with C24:0 and C26:0 as soon as 5 and 10 μM , respectively, demonstrating thus that also non-cytotoxic (5 and 10 μM) and cytotoxic (20 μM) concentrations of VLCFA are capable to stimulate NO production which is known to negatively affect the oxidation of VLCFA and to favour their intracellular accumulation [28, 72]. As an overproduction of NO is detected at 5 μM , the regulation of NO production might be more sensitive to VLCFA than the regulation of O_2^- and H_2O_2 , and our data support the hypothesis that accumulation of VLCFA in oligodendrocytes might contribute to increased iNOS expression in inflammatory area of brain lesions from patients with X-ALD [30]. Moreover, with VLCFA (20 μM) as an increased ROS production is concomitant with a decrease of $\Delta\Psi\text{m}$, this may be due to a direct or indirect protonophoric uncoupling action of VLCFA, whereas extra-mitochondrial sources of ROS production capable to contribute to damage the mitochondria are also likely to be activated in response to C26:0 and C24:0 [31]. Indeed, the accumulation of VLCFA in X-ALD lymphoblasts has been described to increase the level of the catalytic subunit of NADPH oxidase gp91^{PHOX} observed in total cell homogenate and membrane fractions of those cells [32]. Therefore, C24:0 and C26:0 might favor the activation of NADPH oxidase activity, leading to an overproduction of ROS, which might further contribute to trigger cell death [33].

However, oxidative stress associated with ROS and RNS overproductions can be underestimated in oligodendrocytes: i) due to the involvement of cellular buffers such as glutathione, which is one of the most important cellular defense system against oxidative stress [76, 77]; and ii) to the activation of anti-oxidant defences, such as superoxide dismutase (SOD) and catalase enzymes involved in the degradation of O_2^- and H_2O_2 , respectively [78]. Here, we show that SOD and catalase activities were modified under the action of C24:0 and C26:0. We observed a decrease of glutathione levels in oligodendrocytes, underlying the potential pro-oxidative activities of VLCFA. This is in agreement with the previous investigations, performed on normal and X-ALD human fibroblasts in the presence of C26:0 [34]. The glutathione level has been measured using monochlorobimane, which binds to thiol groups by an enzymatic reaction catalyzed by glutathione S-transferases [52]. Under VLCFA treatment, a decrease in glutathione level is may be due to the lower glutathione S-transferase activity. Regarding the role of this enzyme in the degradation of a variety of cytotoxic molecules, one could suggest that such diminution during VLCFA accumulation might contribute to oligodendrocytes dysfunction. Additionally, the low glutathione level would induce further sensitization of oligodendrocytes to ROS and RNS leading to demyelination

RESULTATS

[79], underlying the importance of environmental factors in triggering demyelination process in peroxisomal leukodystrophies. Moreover, in agreement with investigations performed with organotypic spinal cord slices of knockout *Abcd1* mice cultured in the presence of C26:0 [34], we have shown increased levels of SOD activity while catalase activity decreased in VLCFA-treated oligodendrocytes. The decrease of catalase activity is concomitant to H₂O₂ overproduction, which can oxidize the major cellular components such as lipids, proteins, and DNA causing their inactivations and their subsequent degradations.

Beside the induction of ROS and RNS production, and alteration of anti-oxidant defences, the evidence of lipid peroxidation on 158N murine oligodendrocytes treated with C24:0 or C26:0 has been revealed by the presence of 4-HNE, total 7-hydroxycholesterols and HODEs. Currently, 4-HNE has already been identified in patients with neurodegenerative diseases. Indeed, it has been detected in the brain of patients with Alzheimer's disease [80], and it is present at elevated levels in the plasma of patients with Parkinson's disease [67]. As 4-HNE is a highly reactive aldehyde, it exhibits great reactivity with biomolecules, such as proteins, DNA, and phospholipids, generating a variety of intra- and inter-molecular covalent adducts [81]. At the membrane level, proteins and amino lipids can be covalently modified by lipid peroxidation products (hydroxy-alkenals) and activate various metabolic pathways contributing to the cell death process [82]. On the other hand, radical attack of cholesterol leading to intra cellular accumulation of total 7-hydroxycholesterols (including 7 α -hydroxycholesterol, 7 β -hydroxycholesterol, and 7-ketocholesterol) is the most probable hypothesis since overproduction of ROS and RNS are observed [83]. However, as 11 β -hydroxysteroid deshydrogenase type1 and cholesterol 7 α -hydroxylase (CYP7A1) are key enzymes of the cholesterol catabolism [84] leading to 7 β -hydroxycholesterol and 7 α -hydroxycholesterol biosynthesis, respectively, an activation of these enzymes can not be excluded as well as an interconversion between 7-ketocholesterol and 7 β -hydroxycholesterol [84]. As total 7-hydroxycholesterols have a wide range of biological activities, and are potent inducers of cell death [83], they might contribute to the cell death process triggered by VLCFA. Thus, the presence of 4-HNE and total 7-hydroxycholesterols in VLCFA treated-158N cells constitutes an important link between oxidative stress and induction of cell death. As polyunsaturated fatty acids and their esters are known to be more susceptible to free-radical mediated oxidation than cholesterol [85], we also focused on the degradation product of linoleate especially HODEs including 9-hydroxy-octadecadienoic acid, and 13-hydroxy-octadecadienoic acid. Interestingly, the detection of these molecules not only constitutes an

RESULTATS

additional criteria of lipid peroxidation, but it is also in agreement with previous investigations performed on mouse primary astrocytes cultures demonstrating that VLCFA can cause lipotoxic response via 5-lipoxygenase [20]. Indeed, 9-hydroxy-octadecadienoic acid, and 13-hydroxy-octadecadienoic acid can also be biosynthesized from linoleic acid by various lipoxygenases including 3-lipoxygenase, 5-lipoxygenase, 8-lipoxygenase, and 12/15-lipoxygenase [86, 87].

In addition to lipid peroxidation, DNA damage and protein carbonylation were also observed under treatment with VLCFA. Regarding DNA degradation, as no Sub G1 cells were identified whatever the concentrations of VLCFA used, our data rather support that VLCFA induce a non apoptotic mode of cell death whereas apoptosis without decrease of cell DNA content have also been reported [88]. After nuclei staining with Hoechst 33342 as well as by transmission electron microscopy allowing to distinguish between apoptosis and necrosis [44], the absence of cells with condensed and/or fragmented nuclei characteristic of apoptotic cells bring additional evidence that VLCFA induce a non apoptotic mode of cell death (our data not shown). Thus, VLCFA-inducing DNA damages (mainly observed at 20 μ M) can be considered rather as a consequence of cell death, activating various enzymes as endonucleases, than due to a consequence of oxidative stress revealed as low as 5 μ M. At the opposite to DNA degradation, protein carbonylation, which is known to reflect the level of oxidative stress was significantly enhanced as soon as 10 μ M. Accordingly, in the spinal cord of *Abcd1* deficient mice, as well as in cultured X-ALD fibroblasts, specific and well characterized markers of direct oxidation of carbonyl residues were identified [31] suggesting that the excess of VLCFA might not be the unique cause of oxidative damage in X-ALD, and that the loss of ABCD1 might hampers oxidative stress homeostasis [34].

So, in order to determine the part taken by ABCD1 and ACOX1 in oxidative stress, murine oligodendrocytes 158N were transfected with SiRNAs allowing to inactivate *Abcd1* and *Acox1* gene expression. The interesting aspect revealed by these experiments is that the loss (or the important decrease) of *Abcd1* or *Acox1* expression is associated with enhanced overproduction of ROS ($O_2^{\cdot-}$ and H_2O_2) and NO. This enhanced oxidative stress in deficient *Abcd1* and *Acox1* 158N oligodendrocyte cells, which is in agreement with observations performed on X-ALD fibroblasts and on spinal cords of *Abcd1* negative mice, as early as 3.5 months of age before onset of neuropathological signs [34], could ultimately constitute a major component leading to oxidative damages and pave the way for the cascade of events that might lead to neurodegeneration in X-ALD and P-NALD. Further, we provide evidences of an additional effect of C24:0 and C26:0 to enhance $O_2^{\cdot-}$, H_2O_2 and NO overproduction

RESULTATS

when added on deficient *Abcd1* and *Acox1* 158N cells. Thus, untransfected cells might tolerate higher doses of C24:0 or C26:0 without overproduction of ROS and NO, suggesting that the mechanisms that should buffer the oxidative stress caused by these VLCFA work less efficiently in *Abcd1* and *Acox1* deficient cells, or alternatively, that the C24:0 or C26:0 - dependent induction of oxidative stress is lower in untransfected cells, who can properly metabolize the VLCFA. Therefore, our data establish for the first time that the knockdown of *Abcd1* or *Acox1* expressions strongly increased $O_2^{\cdot-}$, H_2O_2 and NO production even in the absence of C24:0 and C26:0, and contributed to enhance C24:0 and C26:0-inducing oxidative stress. Thus, in the context of X-ALD and P-NALD, oxidative stress may constitute a major factor and an early event contributing to the pathogenesis of these diseases.

In agreement with the three-hit hypothesis of the pathogenesis of X-ALD [89], our investigation bring additional information supporting that X-ALD is a neurodegenerative disease associated with oxidative stress. Indeed, enhanced levels of lipid peroxidation markers (total 7-hydroxycholesterols and HODEs) were found in the plasma of patients with different forms of X-ALD. Thus, comparatively to healthy subjects, significant higher levels of total 7-hydroxycholesterols and HODEs were identified in CCALD, Addison disease, and AMN, and the higher levels of these peroxidation markers were found in CCALD patients suggesting that the oxidative stress might contribute to the evolution of the disease, and to the demyelination process. Interestingly, in ACALD patients no signs of lipid peroxidation were identified with the markers used. So, these data underline that oxidative damages can be involved in the physiopathology of CCALD, and can help to distinguish the different forms of X-ALD. As 75% of CCALD patients (6 patients among 8 studied) have both high levels of total 7-hydroxycholesterols and HODEs whereas 25% (2 patients among 8 studied) have simultaneously low levels of total 7-hydroxycholesterols and HODEs, our data also highlight that systemic oxidative stress is not a general feature of CCALD. Therefore, our data support that antioxidant therapeutic strategies can not be envisage as a general treatment of CCALD, whereas this therapy can have some interests in patients presenting an oxidative stress [31]. In addition, we suggest that total 7-hydroxycholesterols and HODEs might constitute suitable biomarkers of X-ALD in order to identify among CCALD patients those presenting a systemic oxidative stress capable to respond to antioxidant therapies.

Altogether, our data demonstrate that: i) C24:0 and C26:0 are able to induce oxidative stress; ii) inhibition of *Abcd1* and *Acox1* expression enhances oxidative stress; iii) inhibition of *Abcd1* or *Acox1* expression increases C24:0 and C26:0 - induced oxidative stress; ii) X-ALD is a neurodegenerative disease associated with oxidative stress as indicated by the presence of

RESULTATS

high levels of plasmatic markers of oxidation (total 7-hydroxycholesterols, HODEs) in X-ALD patients, especially in some CCALD patients (around 75%) . Therefore the present investigation supports the important role of peroxisomal metabolism in homeostasis of ROS and RNS, and shows that the implication of the oxidative stress is not a hallmark of severe forms of X-ALD (CCALD). Consequently, these observations have important implications for X-ALD therapy since anti-oxidants can have potential interest to prevent the evolution of the diseases only in some CCALD patients. In addition, in X-ALD patients, as the plasmatic levels of total 7-hydroxycholesterols and HODEs permit to distinguish the different forms of X-ALD, these biomarkers of oxidative stress may also have some interests to follow the evolution of the disease in order to apply to the patients the most appropriate treatment.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by grants from the INSERM, the Université de Bourgogne, and the Conseil Régional de Bourgogne. The authors are indebted to Pr Patrick Aubourg (Hôpital St Vincent de Paul / INSERM U745, Paris, France) for providing plasma samples of X-ALD patients, and for his helpful suggestions, as well as to Sylvie Guidoux-Boralevi for her excellent technical assistance (Hôpital St Vincent de Paul/INSERM U745, Paris, France).

REFERENCES

- [1] - Wanders RJ, Waterham HR. Biochemistry of mammalian peroxisomes revisited. *Annu. Rev. Biochem.*, **75**: 295-332; 2006.
- [2] - Schrader M, Fahimi D. Mammalian peroxisomes and reactive oxygen species. *Histochem. Cell. Biol.*, **122**: 383-393; 2004.
- [3] - Brites P, Waterham HR, Wanders RJ. Functions and biosynthesis of plasmalogens in health and diseases. *Biochim. Biophys. Acta*, **1636**: 219-231; 2004.
- [4] - Harauz G, Ishiyama N, Hill C, Bates IR, Libich DS, Farès C. Myelin basic protein-diverse conformational states of an intrinsically unstructured protein and its roles in myelin assembly and multiple sclerosis. *Micron*, **35**: 503-542; 2004.

RESULTATS

- [5]- Kassmann C, Lappe-Siefke C, Baes M, Brügger B, Mildner A, Werner HK, Natt O, Michaelis T, Prinz M, Frahm J, Nave KA. Axonal loss and neuroinflammation caused by peroxisome-deficient oligodendrocytes. *Nat. Genet.*, **39**: 969-976; 2007.
- [6] - Baes M, Aubourg P. Peroxisomes, myelination, and axonal integrity in the CNS. *Neuroscientist*, **15**: 367-379; 2009.
- [7] - Bottelbergs A, Verheijden S, Hulshagen L, Gutmann DH, Goebbels S, Nave KA, Kassmann C, Baes M. Axonal integrity in the absence of functional peroxisomes from projection neurons and astrocytes. *GLIA*, **58**: 1532-1543; 2010.
- [8] - Valianpour F, Selhorst JJ, van Lint LE, van Gennip AH, Wanders RJ, Kemp S. Analysis of very long-chain fatty acids using electrospray ionization mass spectrometry. *Mol. Genet. Metab.*, **79**: 189-196; 2003.
- [9] - Berger J, Gartner J. X-linked adrenoleukodystrophy: Clinical, biochemical and pathogenetic aspects. *Biochim. Biophys. Acta*, **1763**: 1721-1732; 2006.
- [10] - Kemp S, Pujol A, Waterham HR, van Geel BM, Boehm CD, Raymond GV, Cutting GR, Wanders RJ, Moser HW. ABCD1 mutations and the X-linked adrenoleukodystrophy mutation database: role in diagnosis and clinical correlations. *Hum. Mutat.*, **18**: 499-515; 2001.
- [11] - Semmler A, Bao X, Cao G, Köhler W, Weller M, Aubourg P, Linnebank M. Genetic variants of methionine metabolism and X-ALD phenotype generation: results of a new study sample. *J. Neurol.*, **256**: 1277-1280; 2009.
- [12] - Kemp S, Wanders RJ. X-linked adrenoleukodystrophy: Very long-chain fatty acid metabolism, ABC half-transporters and the complicated route to treatment. *Mol. Genet. Metab.*, **90**: 268-276; 2007.
- [13] - Mosser J, Douar AM, Sarde CO, Kioschis P, Feil R, Moser H, Poustka AM, Mandel JL, Aubourg P. Putative X-linked adrenoleukodystrophy gene shares unexpected homology with ABC transporters. *Nature*, **361**: 726-730; 1993.
- [14] - Ofman R, Dijkstra IM, van Roermund CW, Burger N, Turkenburg M, van Cruchten A, van Engen CE, Wanders RJ, Kemp S. The role of ELOVL1 in very long-chain fatty acid homeostasis and X-linked adrenoleukodystrophy. *EMBO Mol Med* **2**: 90-97; 2010.
- [15] - Kishimoto Y, Moser HW, Kawamura N, Platt M, Pallante SL, Fenselau C. Adrenoleukodystrophy: evidence that abnormal very long chain fatty acids of brain cholesterol esters are of exogenous origin. *Biochem Biophys Res Commun* **96**: 69-76; 1980.

RESULTATS

- [16] - Tsuji S, Sano T, Ariga T, Miyatake T. Increased synthesis of hexacosanoic acid (C26:0) by cultured skin fibroblasts from patients with adrenoleukodystrophy (ALD) and adrenomyeloneuropathy (AMN). *J Biochem (Tokyo)* **90**: 1233-1236; 1981.
- [17] - Fournier B, Saudubray JM, Benichou B, Lyonnet S, Munnich A, Clevers H, Poll-The BT. Large depletion of the peroxisomal acyl-CoA oxidase gene in pseudonatal adrenoleukodystrophy. *J. Clin. Inves.*, **94**: 526-531; 1994.
- [18] - Suzuki Y, Iai M, Kamei A, Tanabe Y, Chida S, Yamaguchi S, Zhang Z, Takemoto Y, Shimozawa N, Kondo N. Peroxisomal acyl CoA oxidase deficiency. *J. Pediatr.*, **140**: 128-130; 2002.
- [19] - Ferdinandusse S, Denis S, Hogenhout EM, Koster J, van Roermund CWT, Lijst L, Moser AB, Wanders RJA, Waterham HR. Clinical, biochemical, and mutational spectrum of peroxisomal Acyl-CoenzymeA oxidase deficiency. *Hum. Mut.*, **28**: 904-912; 2007.
- [20] - Oaxaca-Castillo D, Andreoletti P, Vluggens A, Yu S, van Veldhoven P, Reddy JK, Cherkaoui-Malki M. Functional expression and characterization of recombinant human liver acyl-CoA oxidase isoforms 1a and 1b. *Biochim. Biophys. Res. Commun.*, **360**: 314-319; 2007.
- [21] - Vluggens A, Andreoletti P, Viswakarma N, Jia Y, Matsumoto K, Kulik W, Khan M, Huang J, Guo D, Yu S, Sarkar J, Singh I, Rao MS, Wanders RJ, Reddy JK, Cherkaoui-Malki M. Reversal of mouse Acyl-CoA oxidase 1 (ACOX1) null phenotype by human ACOX1b isoform. *Lab Invest.*, **90**: 696-708; 2010.
- [22] - Singh J, Khan M, Singh I. Silencing of Abcd1 and Abcd2 genes sensitizes astrocytes for inflammation: implication for X-adrenoleukodystrophy. *J. Lipid. Res.*, **50**: 135-147; 2009.
- [23] - Khan M, Singh J, Gilg AG, Uto T, Singh I. Very long-chain fatty acid accumulation causes lipotoxic response via 5-lipoxygenase in cerebral adrenoleukodystrophy. *J. Lipid. Res.*, **51**: 1685-1695; 2010.
- [24] - Feigenbaum V, Gélot A, Casanova P, Daumas-Duport C, Aubourg P, Dubois-Dalcq M. Apoptosis in the central nervous system of cerebral adrenoleukodystrophy patients. *Neurobiol. Dis.*, **7**(6 Pt B): 600-612; 2000.
- [25] - Eichler FS, Ren JQ, Cossoy M, Rietsch AM, Nagpal S, Moser AB, Frosch MP, Ransohoff RM. Is microglial apoptosis an early pathogenic change in cerebral X-linked adrenoleukodystrophy? *Ann; Neurol.*, **63**: 729-742; 2008.
- [26] - Hein S, Schönfeld P, Kahlert S, Reiser G. Toxic effects of X-linked adrenoleukodystrophy-associated, very long chain fatty acids on glial cells and neurons from rat hippocampus in culture. *Hum. Mol. Genet.*, **17**: 1750-1761; 2008.

RESULTATS

- [27] - McGuinness MC, Griffin DE, Raymond GV, Washington CA, Moser HW, Smith KD. Tumor necrosis factor- α and X-linked adrenoleukodystrophy. *J. Neuroimmunol.*; **61**: 161-169; 1995.
- [28] - Khan M, Pahan K, Singh AK, Singh I. Cytokine-induced accumulation of very long-chain fatty acids in rat C6 glial cells: implication for X-adrenoleukodystrophy. *J. Neurochem.*, **71**: 78-87; 1998.
- [29] - Cimini A, Bernardo A, Cifone G, Di Muzio L, Di Loreto S. TNF α downregulates PPAR δ expression in oligodendrocytes progenitor cells: implication for demyelinating diseases. *GLIA*; **41**: 3-14; 2003.
- [30] - Paintlia AS, Gilg AG, Khan M, Singh AK, Barbosa E, Singh I. Correlation of very long chain fatty acid accumulation and inflammatory disease progression in childhood X-ALD: implications for potential therapies. *Neurobiol. Dis.*, **14**: 425-439; 2003.
- [31] - Fourcade S, Ruiz M, Guileria C, Hahnen E, Brichta L, Naudi A, Portero-Otín M, Dacremont G, Cartier N, Wanders R, Kemp S, Mandel JL, Wirth B, Pamplona R, Aubourg P, Pujol A. Valproic acid induces antioxidant effects in X-linked adrenoleukodystrophy. *Hum. Mol. Genet.*, **19**: 2005-2014; 2010.
- [32] - Pujol A, Hindelang C, Callizot N, Bartsch U, Schachner M, Mandel JL. Late onset neurological phenotype of the X-ALD gene inactivation in mice: a mouse model for adrenomyeloneuropathy. *Hum. Mol. Genet.*, **11**: 499-505; 2002.
- [33] - Pujol A, Ferrer I, Camps C, Metzger E, Hindelang C, Callizot N, Ruiz M, Pàmpol T, Giròs M, Mandel JL. Functional overlap between ABCD1 (ALD) and ABCD2 (ALDR) transporters: a therapeutic target for X-adrenoleukodystrophy. *Hum. Mol. Genet.*, **13**: 2997-3006; 2004.
- [34] - Fourcade S, López-Erauskin J, Galino J, Duval C, Naudi A, Jove M, Kemp S, Villarroja F, Ferrer I, Pamplona R, Portero-Otin M, Pujol A. Early oxidative damage underlying neurodegeneration in X-adrenoleukodystrophy. *Hum. Mol. Genet.*, **17**: 1762-1773; 2008.
- [35] - Deon M, Sitta A, Barschak AG, Coelho DM, Terroso T, Schmitt GO, Wanderley HY, Jardim LB, Giugliani R, Wajner M, Vargas CR. Oxidative stress is induced in female carriers of X-linked adrenoleukodystrophy. *J. Neurol. Sci.*, **266**: 79-83; 2008.
- [36] - Vargas CR, Wajner M, Sirtori LR, Goulart L, Chiochetta M, Coelho D, Latini A, Llesuy S, Bello-Klein A, Giugliani R, Deon M, Mello CF. Evidence that oxidative stress is increased in patients with X-linked adrenoleukodystrophy. *Biochim. Biophys. Acta.*, **1688**: 26-32; 2004

RESULTATS

- [37] - Deon M, Sitta A, Barschak AG, Coelho DM, Pigatto M, Schmitt GO, Jardim LB, Giugliani R, Wajner M, Vargas CR. Induction of lipid peroxidation and decrease of antioxidant defenses in symptomatic and asymptomatic patients with X-linked adrenoleukodystrophy. *Int. J. Dev. Neurosci.*, **25**: 441-444; 2007.
- [38] - Takemoto Y, Suzuki Y, Horibe R, Shimozaawa N, Wanders RJ, Kondo N. Gas chromatography/mass spectrometry analysis of very long chain fatty acids, docosahexaenoic acid, phytanic acid and plasmalogen for the screening of peroxisomal disorders. *Brain Dev.*, **25**: 481-487; 2003.
- [39] - Baarine M, Ragot K, Genin EC, El Hajj H, Trompier D, Andreoletti P, Ghandour MS, Menetrier F, Cherkaoui-Malki M, Savary S, Lizard G. Peroxisomal and mitochondrial status of two murine oligodendrocytic cell lines (158N, 158JP): potential models for the study of peroxisomal disorders associated with dysmyelination processes. *J. Neurochem.*, **111**: 119-131; 2009.
- [40] - Feutz AC, Pham-Dinh D, Allinquant B, Miehe M, Ghandour S. An immortalized jimpy oligodendrocyte cell line: defects in cell cycle and cAMP pathway. *GLIA*, **34**: 241-252; 2001.
- [41] - Ghandour S, Feutz AM, Jalabi W, Taleb O, Bessert D, Cypher M, Carlock L, Skoff RP. Trafficking of PLP/DM20 and cAMP signalling in immortalized jimpy oligodendrocytes. *GLIA*, **40**: 300-311; 2002.
- [42] - Singh I, Kishimoto Y. Effect of cyclodextrins on the solubilization of lignoceric acid, ceramide, and cerebroside, and on the enzymatic reactions involving these compounds. *J. Lipid Res.*, **24**: 662-665; 1983.
- [43] - Valianpour F, Selhorst JJ, van Lint LE, van Gennip AH, Wanders RJ, Kemp S. Analysis of very long-chain fatty acids using electrospray ionization mass spectrometry. *Mol Genet Metab* **79**: 189-196; 2003.
- [44] - Lizard G, Fournel S, Genestier L, Dhedin N, Chaput C, Flacher M, Mutin M, Panaye G, Revillard JP. Kinetics of plasma membrane and mitochondrial alterations in cells undergoing apoptosis. *Cytometry*, **21**: 275-283; 1995.
- [45] - Yeh, CJ, Hsi, BL, Faulk, WP. Propidium iodide as a nuclear marker in immunofluorescence. II. Use with cellular identification and viability studies. *J. Immunol. Methods*, **43**: 269-275; 1981.
- [46] - Smiley ST, Reers M, Mottola-Hartshorn C, Lin M, Chen A, Smith TW, Steele GD Jr, Chen LB. Intracellular heterogeneity in mitochondrial membrane potentials revealed by a J-aggregate-forming lipophilic cation JC-1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **88**: 3671-3675; 1991.

RESULTATS

- [47] - Rothe G, Valet G. Flow cytometric analysis of respiratory burst activity in phagocytes with hydroethidine and 2',7'-dichlorofluorescein. *J. Leukoc. Biol.*, **47**: 440-448; 1990.
- [48] - Zimmerman MC, Oberley LW, Flanagan SW. Mutant SOD1-induced neuronal toxicity is mediated by increased mitochondrial superoxide levels. *J. Neurochem.*, **102**: 609-618; 2007.
- [49] - Robinson KM, Janes MS, Beckman JS. The selective detection of mitochondrial superoxide by live cell imaging. *Nat. Protoc.*, **3**: 941-947; 2008.
- [50] - McQuade LE, Lippard SJ. Fluorescent probes to investigate nitric oxide and other reactive nitrogen species in biology (truncated form: fluorescent probes of reactive nitrogen species). *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **14**: 43-49; 2010.
- [51] - Rothe G, Valet G. Flow cytometric assays of oxidative burst activity in phagocytes. *Methods Enzymol.*, **233**: 539-548; 1994.
- [52] - Hedley DW, Chow S. Evaluation of methods for measuring cellular glutathione content using flow cytometry. *Cytometry*, **15**: 349-358; 1994.
- [53] - Ormerod MG, Sun XM, Brown D, Snowden RT, Cohen GM. Quantification of apoptosis and necrosis by flow cytometry. *Acta Oncol.*, **32**: 417-424; 1993.
- [54] - Esterbauer H, Schaur RJ, Zollner H. Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes. *Free Radic. Biol. Med.*, **11**: 81-128; 1991.
- [55] - Poli G, Schaur RJ, Siems WG, Leonarduzzi G. 4-hydroxynonenal: a membrane lipid oxidation product of medicinal interest. *Med. Res. Rev.*, **28**: 569-631; 2008.
- [56] - Yoshida Y, Kodai S, Takemura S, Minamiyama Y, Niki E. Simultaneous measurement of F2-isoprostane, hydroxyoctadecadienoic acid, hydroxyeicosatetraenoic acid, and hydroxycholesterols from physiological samples. *Anal. Biochem.*, **379**: 105-115; 2008.
- [57] - Arnauld S, Fidaleo M, Clémencet MC, Chevillard G, Athias A, Gresti J, Wanders RJ, Latruffe N, Nicolas-Francès V, Mandard S. Modulation of the hepatic fatty acid pool in peroxisomal 3-ketoacyl-CoA thiolase B-null mice exposed to the selective PPAR α agonist Wy14,643. *Biochimie*, **91**: 1376-1386; 2009
- [58] - Folch J, Lees M, Sloanes Stanley GH. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *J. Biol. Chem.*, **226**: 497-509; 1957.
- [59] - Kaluzny MA, Duncan LA, Merritt MV, Epps DE. Rapid separation of lipid classes in high yield and purity using bonded phase columns. *J. Lipid Res.*, **26**: 135-140; 1985.
- [60] - Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**: 680-685; 1970.

RESULTATS

- [61] - Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **76**: 4350-4354; 1979.
- [62] - Kemp S, Wanders R. Biochemical aspects of X-linked adrenoleukodystrophy. *Brain Pathol.*, **20**: 831-837; 2010.
- [63] - Warner HR. Superoxide dismutase, aging, and degenerative disease. *Free Radic Biol Med.* **17**: 249-258; 1994.
- [64] - Forman HJ, Zhang H, Rinna A. Glutathione: overview of its protective roles, measurement, and biosynthesis. *Mol Aspects Med.* **30**: 1-12; 2009.
- [65] - Maynard S, Schurman SH, Harboe C, de Souza-Pinto NC, Bohr VA. Base excision repair of oxidative DNA damage and association with cancer and aging. *Carcinogenesis* **30**: 2-10; 2009.
- [66] - Rothstein JD. Current hypotheses for the underlying biology of amyotrophic lateral sclerosis. *Ann. Neurol.*, **65 Suppl 1**: S3-S9; 2009.
- [67] - Seet RC, Lee CY, Lim EC, Tan JJ, Quek AM, Chong WL, Looi WF, Huang SH, Wang H, Chan YH, Halliwell B. Oxidative damage in Parkinson disease: Measurement using accurate biomarker. *Free Radic. Biol. Med.*, **48**: 560-566; 2010.
- [68] - Baumann N, Pham-Dinh D. Biology of oligodendrocyte and myelin in the mammalian central nervous system. *Physiol. Rev.*, **81**: 871-927; 2001.
- [69] - Kroemer G, Petit P, Zamzami N, Vayssière JL, Mignotte B. The biochemistry of programmed cell death. *FASEB J.*, **9**: 1277-1287; 1995.
- [70] - Powers JM, Liu Y, Moser AB, Moser HW. The inflammatory myelinopathy of adrenoleukodystrophy: cells, effector molecules, and pathogenetic implications. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* **51**: 630-643; 1992.
- [71] - Powers JM, Pei Z, Heinzer AK, Deering R, Moser AB, Moser HW, Watkins PA, Smith KD. Adreno-leukodystrophy: oxidative stress of mice and men. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*, **64**: 1067-1079; 2005.
- [72] - Dobashi K, Pahan K, Chahal A, Singh I. Modulation of endogenous antioxidant enzymes by nitric oxide in rat C6 glial cells. *J. Neurochem.*, **68**: 1896-1903; 1997.
- [73] - Skulachev VP. Uncoupling: new approaches to an old problem of bioenergetics. *Biochim. Biophys. Acta*, **1363**: 100-124; 1998.
- [74] - Uto T, Contreras MA, Gilg AG, Singh I. Oxidative imbalance in nonstimulated X adrenoleukodystrophy-derived lymphoblasts. *Dev. Neurosci.*, **30**: 410-418; 2008.

RESULTATS

- [75] - Pedruzzi E, Guichard C, Ollivier V, Driss F, Fay M, Prunet C, Marie JC, Pouzet C, Samadi M, Elbim C, O'dowd Y, Bens M, Vandewalle A, Gougerot-Pocidal MA, Lizard G, Ogier-Denis E. NAD(P)H oxidase Nox-4 mediates 7-ketocholesterol-induced endoplasmic reticulum stress and apoptosis in human aortic smooth muscle cells. *Mol. Cell. Biol.*, **24**: 10703-10717; 2004.
- [76] - Meister A, Anderson ME. Glutathione. *Annu. Rev. Biochem.*, **52**: 711-760; 1983.
- [77] - Reed DJ. Glutathione: toxicological implication. *Annu. Rev. Pharmacol.*, **30**: 603-631; 1990.
- [78] - Chaudière J, Ferrari-Iliou R. Intracellular antioxidants: from chemical to biochemical mechanisms. *Food Chem. Toxicol.*, **37**: 949-962; 1999.
- [79] - Di Biase A, Di Benedetto R, Fiorentini C, Travaglione S, Salvati S, Attorri L, Pietraforte D. Free radical release in C6 glial cells enriched in hexacosanoic acid: implication for X-linked adrenoleukodystrophy pathogenesis. *Neurochem. Int.*, **44**: 215-221; 2004.
- [80] - Nam DT, Arseneault M, Murthy V, Ramassamy C. Potential role of acrolein in neurodegeneration and in Alzheimer's disease. *Curr. Mol. Pharmacol.*, **3**: 66-78; 2010.
- [81] - Catala A. Lipid peroxidation of membrane phospholipids generates hydroxy-alkenals and oxidized phospholipids active in physiological and/or pathological conditions. *Chem. Phys. Lipids*, **157**: 1-11; 2009.
- [82] - Awasthi YC, Sharma R, Cheng JZ, Yang Y, Sharma A, Singhal SS, Awasthi S. Role of 4-hydroxynonenal in stress-mediated apoptosis signaling. *Mol. Aspects Med.*, **24**: 219-230; 2003.
- [83] - Vejux A, Lizard G. Cytotoxic effects of oxysterols associated with human diseases: Induction of cell death (apoptosis and/or oncosis), oxidative and inflammatory activities, and phospholipidosis. *Mol. Aspects Med.*, **30**: 153-170; 2009.
- [84] - Garenc C, Julien P, Levy E. Oxysterols in biological systems: the gastrointestinal tract, liver, vascular wall and central nervous system. *Free Radic. Res.*, **44**: 47-73; 2010.
- [85] - Saito Y, Yoshida Y, Niki E. Cholesterol is more susceptible to oxidation than linoleates in cultured cells under oxidative stress induced by selenium deficiency and free radicals. *FEBS Lett.*, **581**: 4349-4354; 2007.
- [86] - Engels F, Kessels GC, Schreurs AJ, Nijkamp FP. Production of arachidonic acid and linoleic acid metabolites by human bronchoalveolar lavage cells. *Prostaglandins*, **42**: 441-450; 1991.

RESULTATS

- [87] - Kawajiri H, Hsi LC, Kamitani H, Ikawa H, Geller M, Ward T, Eling TE, Glasgow WC. Arachidonic and linoleic acid metabolism in mouse intestinal tissue: evidence for novel lipoxygenase activity. *Arch. Biochem. Biophys.*, **398**: 51-60; 2002.
- [88] - Fournel S, Genestier L, Rouault JP, Lizard G, Flacher M, Assossou O, Revillard JP. Apoptosis without decrease of cell DNA content. *FEBS Lett.*, **367**: 188-192; 1995.
- [89] - Singh I, Pujol A. Pathomechanisms underlying X-adrenoleukodystrophy: a three-hit hypothesis. *Brain Pathol.*, **20**: 838-844; 2010.

LEGENDS

Figure 1. Effects of VLCFA on cell proliferation, cell viability and mitochondrial status of 158N murine oligodendrocytes. Murine oligodendrocytes (158N) were cultured for 24 to 48 h in the absence (control) or in the presence of alpha-cyclodextrine (vehicle: 1 mg/ml) or VLCFA (C24:0 or C26:0: 5, 10, 20, 40 μ M). Cell proliferation was determined by cell counting (A, B), cell viability was evaluated with propidium iodide (C,D) and mitochondrial transmembrane potential was determined with JC-1 only at 24 h. Data shown are mean $\pm$ SD from three separate experiments performed in triplicate. Significance of the difference between control and vehicle, C24:0 or C26:0 (Mann Whitney test; * P < 0.05 or less).

Figure 2. Effects of VLCFA on ROS and RNS production on 158N murine oligodendrocytes. Murine oligodendrocytes (158N) were cultured for 24 h in the absence (control) or in the presence of alpha-cyclodextrine (vehicle: 1 mg/ml) or VLCFA (C24:0 or C26:0: 5, 10, 20 μ M). The effects of C24:0 and C26:0 on the production of intracellular superoxide anion ($O_2^{\cdot-}$) (A), mitochondrial superoxide anion (B), hydrogen peroxide (H_2O_2) (C) and nitric oxide (NO) (D) were measured by flow cytometry with DHE, Mitosox, DHR123, and DAF-FM, respectively. The dark horizontal dotted lines represent the threshold of control cells. Data shown are mean $\pm$ SD from three separate experiments performed in triplicate. Significance of the difference between control and vehicle, C24:0 or C26:0 (Mann Whitney test; * P < 0.05 or less).

Figure 3. Effects of C24:0 and C26:0 on glutathione level, superoxide dismutase and catalase activities on 158N murine oligodendrocytes. Murine oligodendrocytes (158N) were cultured for 24 h in the absence (control) or in the presence of alpha-cyclodextrine (vehicle: 1 mg/ml) or VLCFA (C24:0 or C26:0: 5, 10, 20 μ M). At the end of the incubation time, total glutathione level was measured by colorimetry (A), the percentage of cells containing reduced glutathione was determined by flow cytometry with monochlorobimane (MCB) (B), superoxide dismutase (SOD) (C) and catalase (D) activities were biochemically determined. Data shown are mean $\pm$ SD from two separate experiments performed in triplicate. Significance of the difference between control and vehicle, C24:0 or C26:0 (Mann Whitney test; * P < 0.05 or less).

Figure 4. Effects of C24:0 and C26:0 on lipid peroxidation on 158N murine oligodendrocytes. Murine oligodendrocytes (158N) were cultured for 24 h in the absence (control) or in the presence of alpha-cyclodextrine (vehicle: 1 mg/ml) or VLCFA (C24:0 or C26:0: 10, 20 μ M). The effects of C24:0 and C26:0 on lipid peroxidation were determined by the intracellular level of 4-hydroxynonenal (4-HNE) evaluated by fluorescence microscopy and flow cytometry (A), and by the intracellular levels of total 7-hydroxycholesterols (B) and HODEs (C) determined by gas chromatography and liquid chromatography, respectively, coupled with mass spectrometry. The dark horizontal dotted lines represent the threshold of control cells. Data shown are mean $\pm$ SD from two separate experiments performed in triplicate. Significance of the difference between control and vehicle, C24:0 or C26:0 (Mann Whitney test; * P < 0.05 or less).

Figure 5. Effects of C24:0 and C26:0 on DNA degradation and protein carbonylation on 158N murine oligodendrocytes. Murine oligodendrocytes (158N) were cultured for 24 h in the absence (control) or in the presence of alpha-cyclodextrine (vehicle: 1 mg/ml) or VLCFA (C24:0 or C26:0: 10, 20 μ M). The effects of C24:0 and C26:0 on DNA degradation was determined by flow cytometry on propidium iodide stained cells by the percentage of hypodiploid cells (DNA degradation) and by the percentage of Sub G1 cells (inter-nucleosomal DNA fragmentation) (A). The effects of C24:0 and C26:0 on protein carbonylation was biochemically evaluated by the quantity of carbonyl content per quantity of protein (B). Data shown are mean $\pm$ SD from two separate experiments performed in triplicate. Significance of the difference between control and vehicle, C24:0 or C26:0 (Mann Whitney test; * P < 0.05 or less).

Figure 6. Inactivation of *Abcd1* and *Acox1* expression by siRNA on 158N murine oligodendrocytes. Murine oligodendrocytes (158N) were transfected with scrambled (Sr) siRNA, with various *Abcd1* siRNAs (*Abcd1* 1, *Abcd1* 2, *Abcd1* 3), or with various *Acox1* siRNAs (*Acox1* 1, *Acox1* 2, *Acox1* 3) in order to identify the most appropriated siRNAs. Silencing was quantified by RT-qPCR at the mRNA level (A) and by Western Blotting at the protein level (B). Data shown (A) are mean $\pm$ SD from for separate experiments performed in triplicate. Significance of the difference between non transfected 158N cells (Wt), Scrambled (Scr) and siRNA transfected cells (Mann Whitney test; * P < 0.05 or less). Data shown (B) are representative of the data obtained on four separate experiments.

Figure 7. Effects of *Abcd1* and *Acox1* silencing by siRNA on ROS and RNS production in the absence and in the presence of C24:0 or C26:0 on 158N murine oligodendrocytes.

Murine oligodendrocytes (158N) transfected with scrambled (Scr) siRNA or with siRNA against *Abcd1* or *Acox1* (siRNA *Abcd1* 2; siRNA *Acox1* 2) were further cultured for 24 h in the absence (control) or in the presence of alpha-cyclodextrine (vehicle: 1 mg/ml) or VLCFA (C24:0 or C26:0: 5, 10, 20 μ M). The intracellular production of superoxide anion ($O_2^{\cdot-}$) (A), hydrogen peroxide (H_2O_2) (B), and nitric oxide (NO) (C) were measured by flow cytometry with DHE, DHR123, and DAF-FM, respectively. The dark horizontal dotted lines represent the threshold of control cells. Data shown are mean $\pm$ SD from three separate experiments performed in triplicate. Significance of the difference between control (non transfected untreated 158N cells) and non transfected 158N cells treated with vehicle, C24:0 and C26:0 (Mann Whitney test; * $P < 0.05$ or less). Significance of the differences between transfected versus non transfected cells (Mann-Whitney test, # $P < 0.05$ or less).

Figure 8. Measurement of lipid peroxidation in the plasma of patients with various forms of X-ALD. VLCFA (C24:0 and C26:0), and lipid peroxidation products including total 7-hydroxycholesterols (7 α -hydroxycholesterol + 7 β -hydroxycholesterol + 7-ketocholesterol) and HODEs (9-hydroxy-octadecadienoic acid + 13-hydroxy-octadecadienoic acid) were quantified by gas or liquid chromatography, respectively, coupled with mass spectrometry in the plasma of patients with different forms of X-ALD (8 CCALD; 3 ACALD; 10 AMN; 4 Addison disease) and in the plasma of 10 healthy subjects. Significance of the difference between healthy subjects and patients with different forms of X-ALD (Wilcoxon test; * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$).

FIGURES

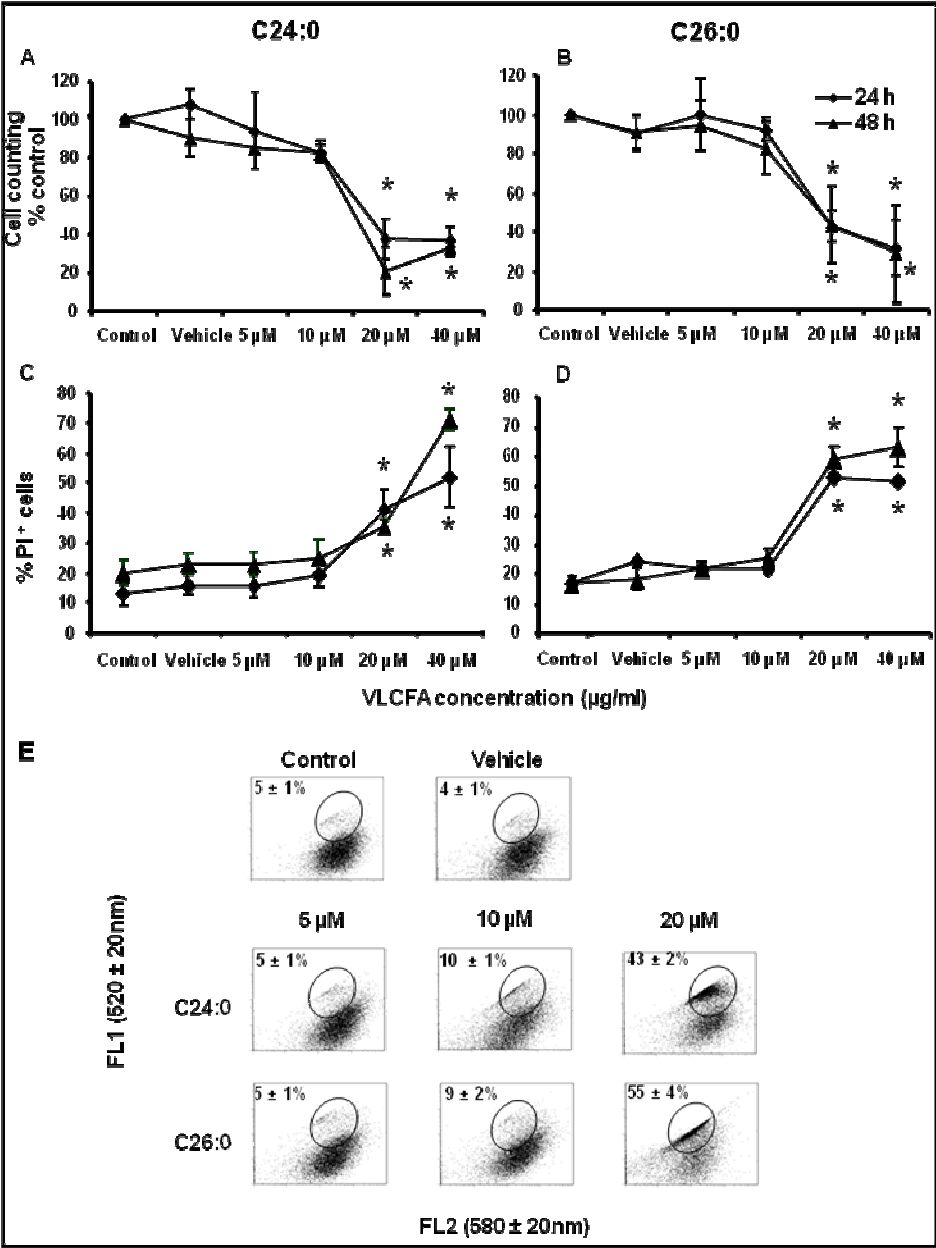


Figure 1. Effects of VLCFA on cell proliferation, cell viability and mitochondrial status.

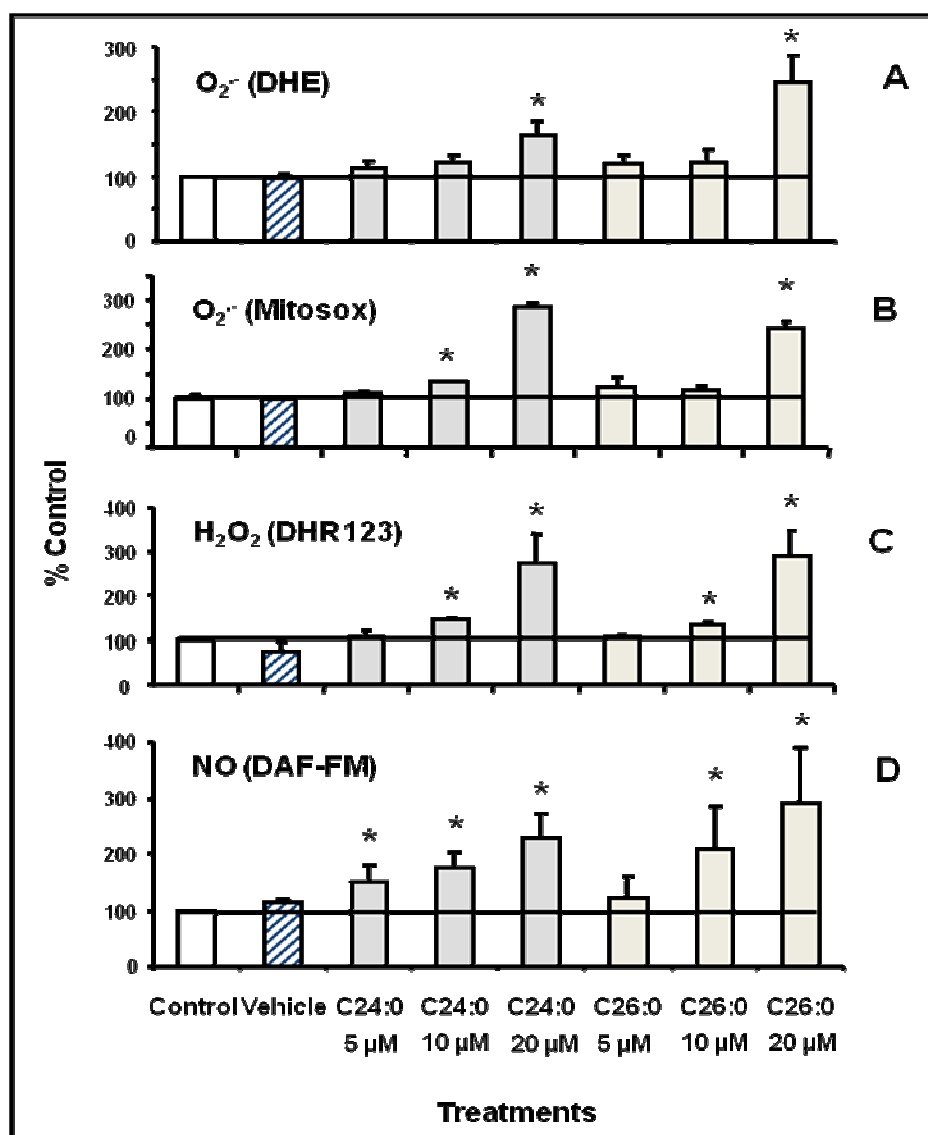


Figure 2. Effects of VLCFA on ROS and RNS production.

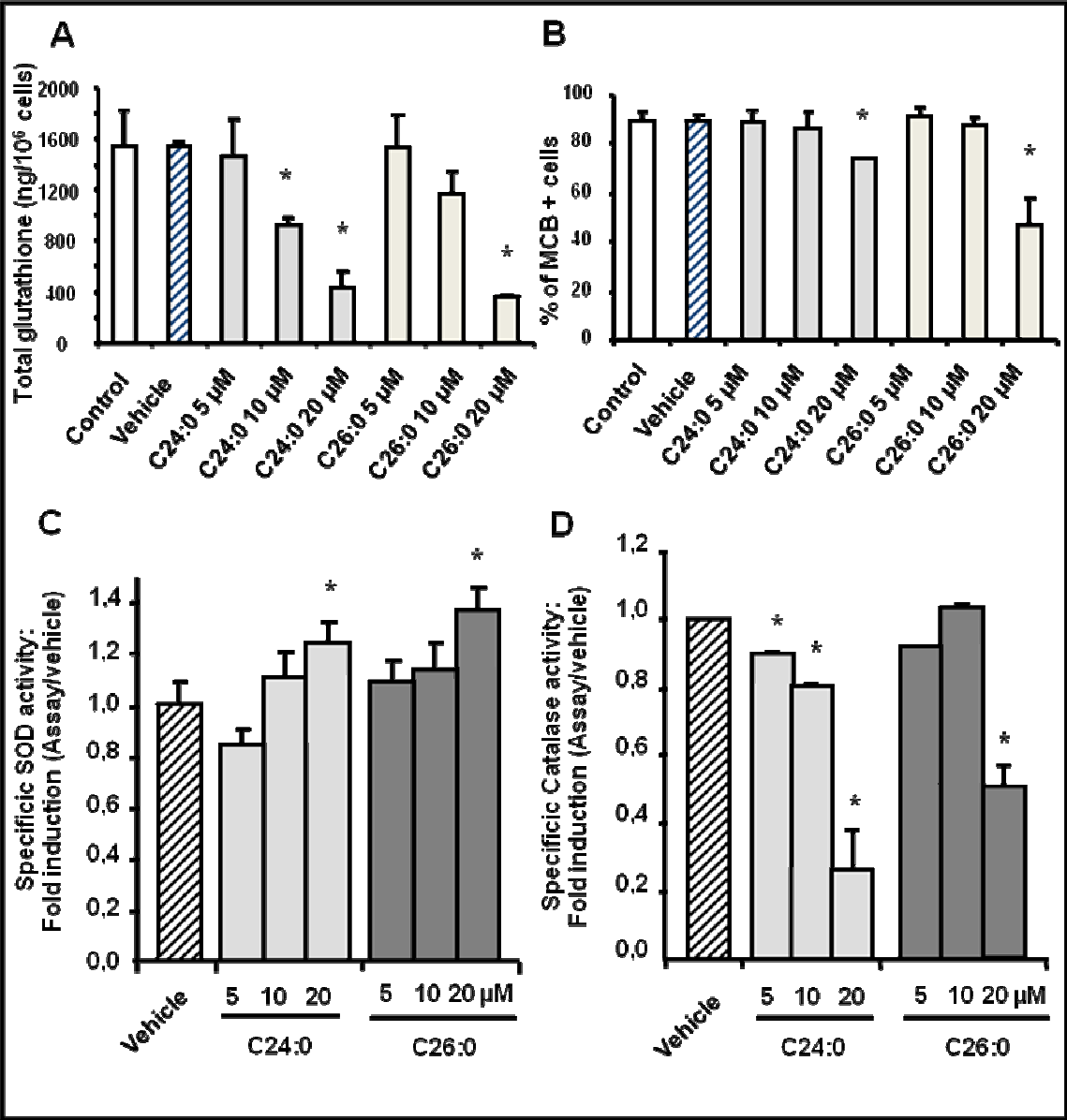


Figure 3. Effects of C24:0 and C26:0 on glutathione level, superoxide dismutase and catalase activities.

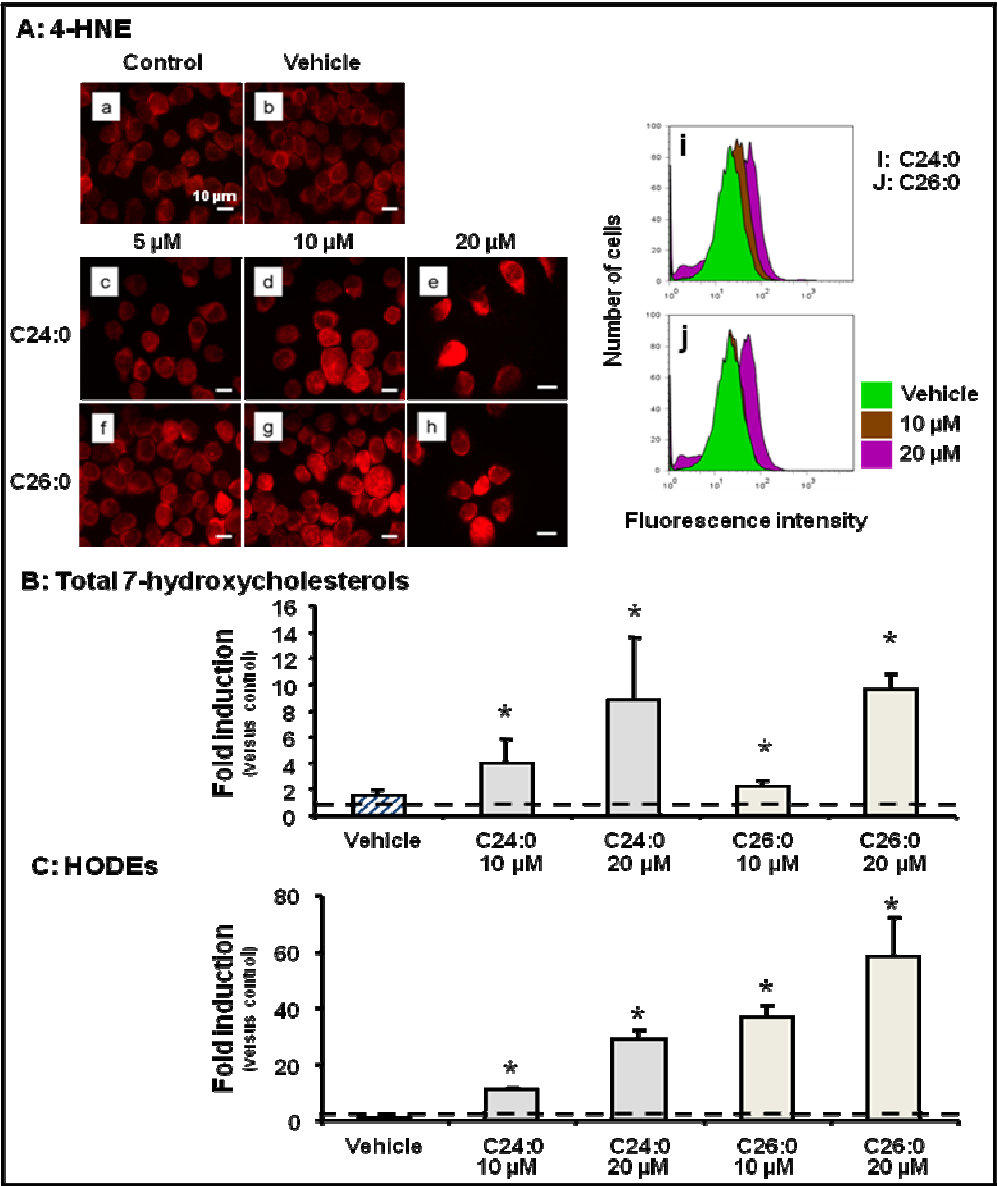


Figure 4. Effects of C24:0 and C26:0 on lipid peroxidation.

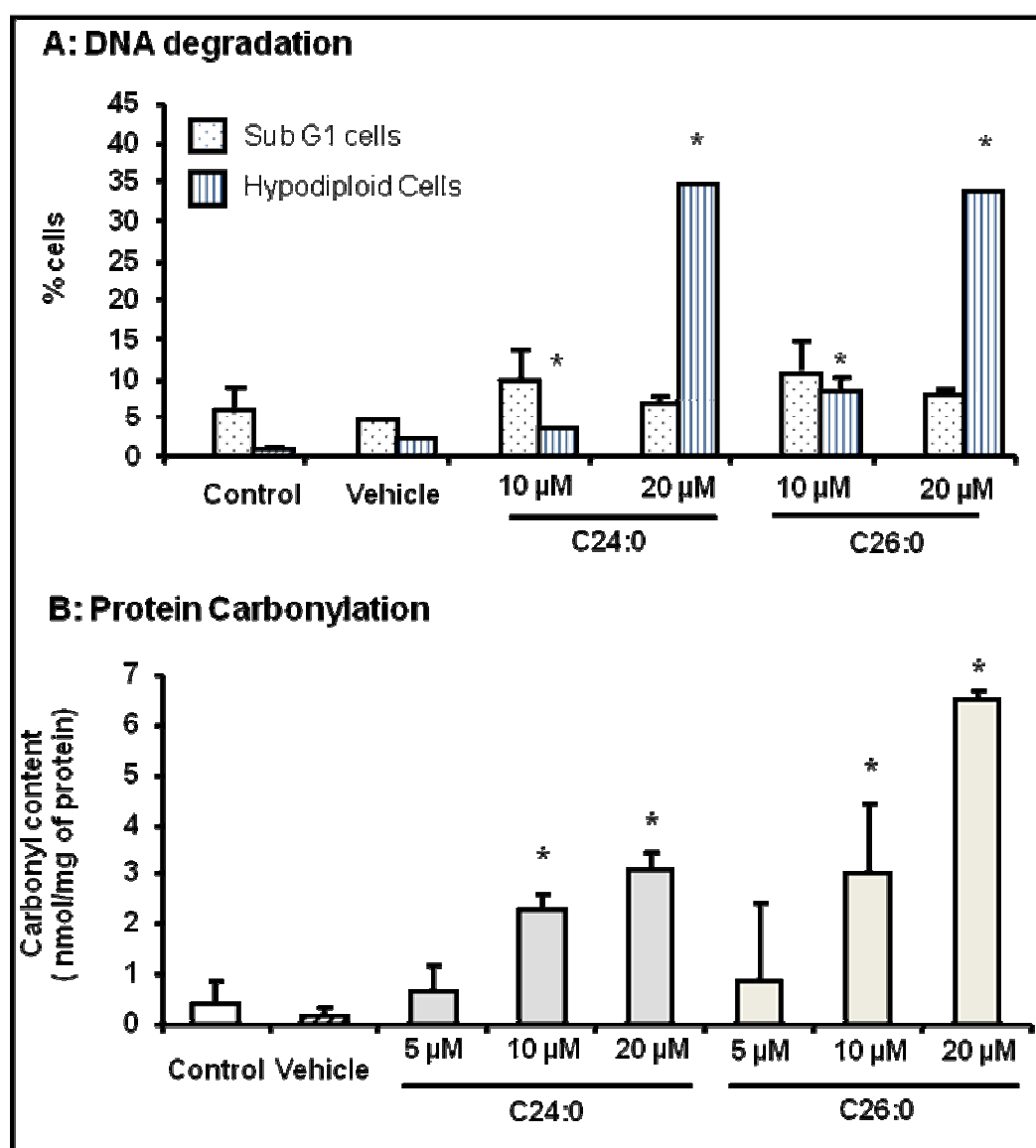


Figure 5. Effects of C24:0 and C26:0 on DNA degradation and protein carbonylation.

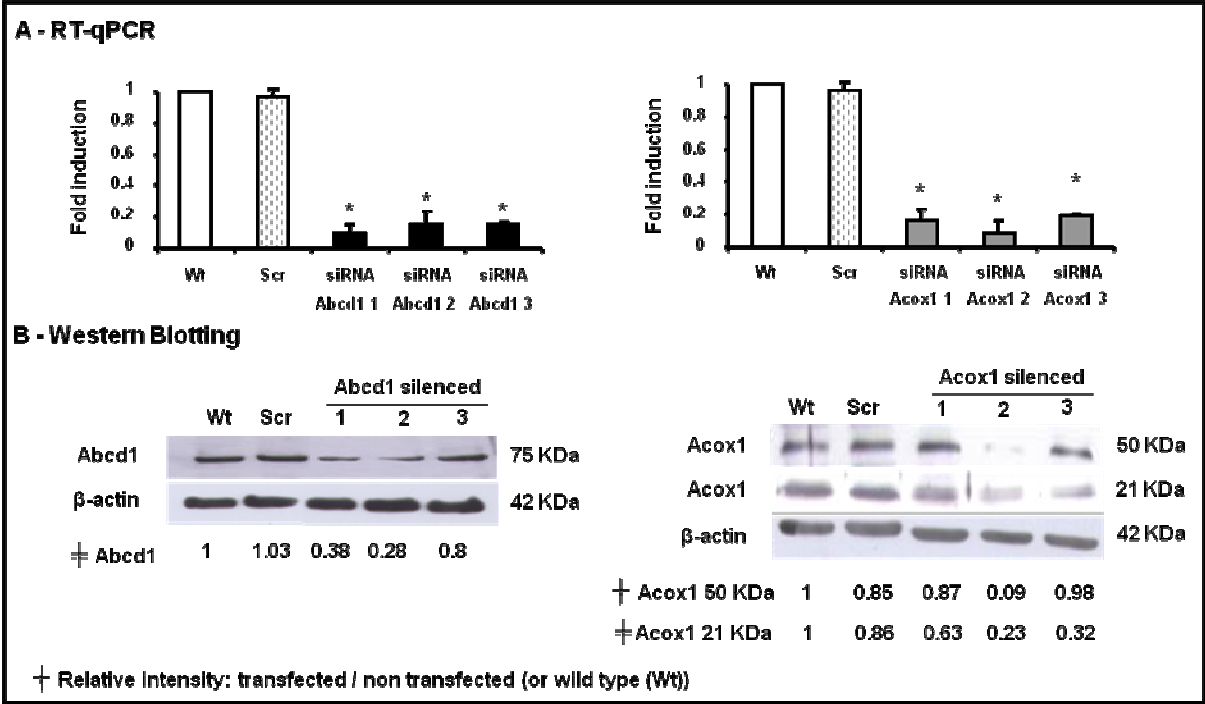


Figure 6. Inactivation of *Abcd1* and *Acox1* expression by siRNA.

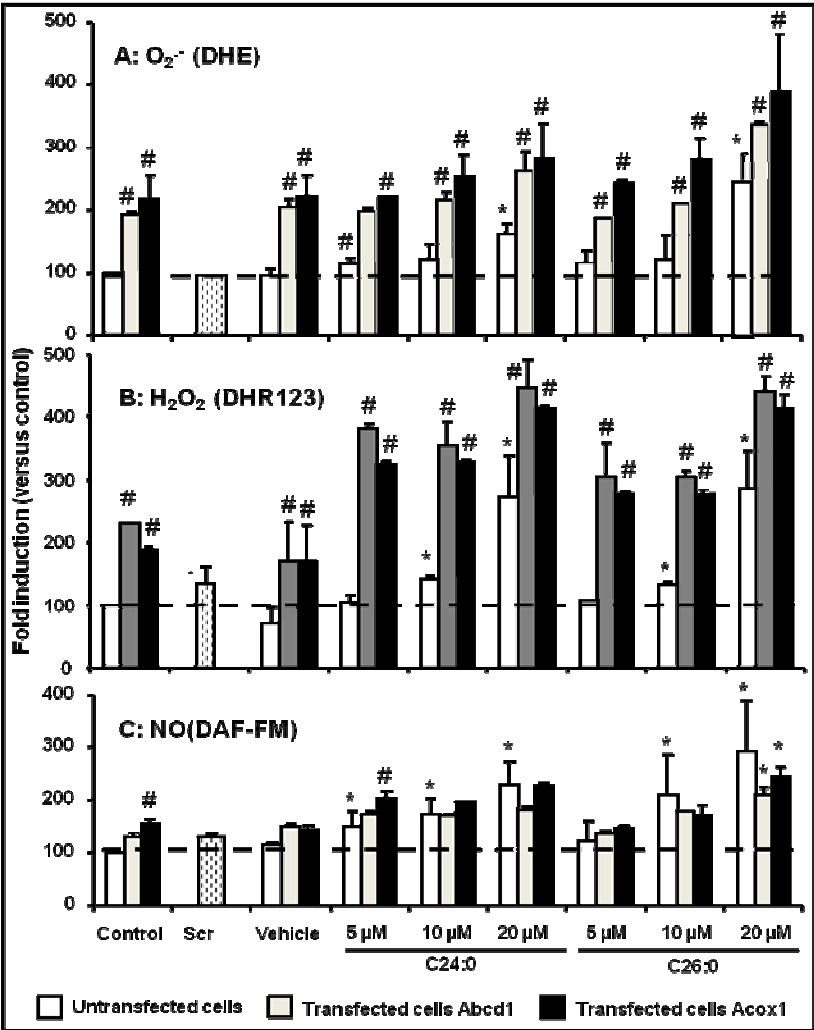


Figure 7. Effects of *Abcd1* and *Acox1* silencing by siRNA on ROS and RNS production in the absence and in the presence of C24:0 or C26:0.

RESULTATS

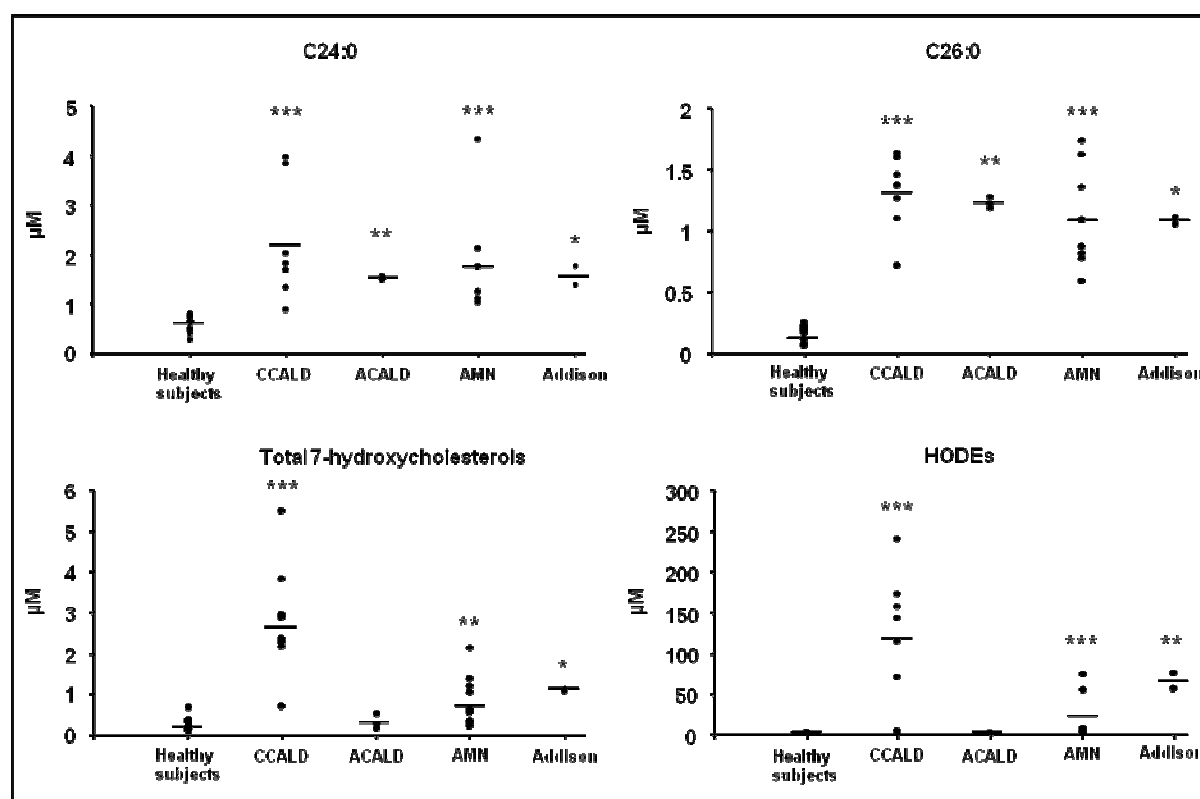


Figure 8. Measurement of lipid peroxidation in the plasma of patients with various forms of X-ALD.

RESULTATS

TABLE

	Treatments							
	Untreated cells (control)	Alpha- cyclodextrine (vehicle)	C24:0 (5 µM)	C24:0 (10 µM)	C24:0 (20 µM)	C26:0 (5 µM)	C26:0 (10 µM)	C26:0 (20 µM)
C24:0 (ng/10 ⁶ cells) (fold increase)	62.0 ± 13.1	91.0 ± 29.7 (1.5)	247.4 ± 4.7 * (4)	1452.0 ± 310.4 * (23.4)	8458.0 ± 1212.4 * (136.4)	60.1 ± 1.1 (0.9)	156.0 ± 31.2 * (2.5)	166.0 ± 37.4 * (2.7)
C24:0 repartition by lipid sub-classes: % versus C24:0 * <i>Neutral sterols</i> * <i>Phospholipids</i> * <i>FFA</i> (ng/10 ⁶ cells)	25% (15.5) 55% (34.1) 20% (12.4)	16% (14.6) 65% (59.1) 19% (17.3)	20% (49.5) 49% (121.2) 31% (76.7)	13% (188.8) 31% (450.1) 56% (813.1)	4% (338.3) 21% (1776.2) 75% (6343.5)	14% (8.4) 68% (40.9) 18% (10.8)	14% (21.8) 67% (104.5) 19% (29.7)	23% () 32% () 46% ()
C26:0 (ng/10 ⁶ cells) (fold increase)	9.0 ± 4.2	9.0 ± 3.3 (1)	7.3 ± 0.6 (0.8)	26.0 ± 16.0 * (2.9)	49.0 ± 23.0 * (5.4)	57.8 ± 0.2 * (6.4)	506.0 ± 134.8 * (56.2)	2058.0 ± 311.2 * (228.6)
C26:0 repartition by lipid sub-classes: % versus C26:0 * <i>Neutral sterols</i> * <i>Phospholipids</i> * <i>FFA</i> (ng/10 ⁶ cells)	35% (3.1) 40% (3.6) 25% (2.3)	21% (1.9) 52% (4.7) 27% (2.4)	26% (1.9) 54% (3.9) 21% (1.5)	22% (5.7) 47% (12.2) 31% (8.1)	23% (11.3) 52% (25.5) 25% (12.2)	24% (13.9) 37% (21.4) 39% (22.5)	15% (76) 34% (172) 51% (258)	2% (41.2) 4% (82.3) 94% (1934.5)

Table 1: C24:0 and C26:0 accumulation in 158N murine oligodendrocytes after 24 h of treatment with different concentrations of C24:0 or C26:0. Data shown are mean ± SD of two to three independent experiments performed in duplicate. (*) $P < 0.05$ or less: comparison of treated versus untreated-cells.

III Article 3 : Characterization of cell death and myelin protein expression (PLP, MBP) in wild type and *Abcd1* inactivated 158N Murine Oligodendrocytes treated with C24:0 or C26:0

(Manuscrit en préparation)

Mauhamad Baarine, Franck Ménétrier, André Bouchot, and Gérard Lizard

1 Introduction

L’X-ALD est une maladie peroxysomale démyélinisante résultant d’un dysfonctionnement de l’hémitransporteur peroxysomal ABCD1 conduisant à une accumulation cytoplasmique et tissulaire d’AGTLC (C24:0 et C26:0). Cette maladie, pour laquelle aucune relation génotype-phénotype n’a encore été établie pourrait être déclenchée au niveau du SNC par différents évènements impliqués dans la démyélinisation. En raison de l’identification de cellules mortes (en particulier apoptotiques) au niveau des lésions cérébrales d’X-ALD, il a été suggéré que la mort des oligodendrocytes (cellules synthétisant la myéline) pouvait constituer un évènement important de la neurodégénérescence ([Cimini *et al.*, 2003](#); [Eichler *et al.*, 2008](#); [Singh & Pujol, 2010](#)).

Pour aborder cet aspect de la physiopathologie de l’X-ALD, des oligodendrocytes murins 158N ont été traités par différentes concentrations d’AGTLC (C24:0 et C26:0 : 5, 10, 20 et 40 μ M) pendant 24 à 48 h. Dans ces conditions, nous avons caractérisé : 1) le type de mort cellulaire induite par les AGTLC, 2) l’impact des AGTLC au niveau des mitochondries et des lysosomes, 3) les effets des AGTLC sur les taux de calcium et sur le pH intracellulaire, 4) les effets de l’accumulation d’AGTLC sur la synthèse des protéines majeures de la myéline (PLP et MBP).

Les conséquences de l’inactivation de l’expression d’*Abcd1* réalisée à l’aide de siRNA ont aussi été abordées sur des cellules 158N cultivées en absence ou en présence d’AGTLC. Dans ces conditions, et comparativement à des cellules 158N non transfectées, la mort cellulaire a été quantifiée et caractérisée et l’expression des protéines majeures de myéline (PLP et MBP) a été mesurée.

Ce travail a permis de montrer que les AGTLC induisaient essentiellement un type de mort cellulaire non apoptotique évoquant la nécrose avec des caractéristiques d’autophagie (coloration à la

RESULTATS

monodansylcadavérine). Ce type de mort cellulaire est aussi associé à une dépolarisation des mitochondries (chute du potentiel membranaire mitochondrial ($\Delta\Psi_m$)) et à une déstabilisation des lysosomes montrée par coloration à l'acridine orange (AO) et au LysoTracker Red. En repérant les mitochondries par identification du cytochrome c et les lysosomes par identification de l'antigène Lamp1, une redistribution de ces deux organelles dans le cytoplasme a été observée. Ces événements sont précédés par une augmentation rapide de calcium intracellulaire, en accord avec les résultats obtenus par d'autres équipes (Hein *et al.*, 2008), et par une alcalinisation du cytoplasme dès l'introduction des AGTLC dans le milieu de culture. L'accumulation des AGTLC n'induit pas une diminution de l'expression de protéines majeures de la myéline (PLP et MBP).

Dans leur ensemble, les résultats obtenus montrent que les AGTLC induisent rapidement des modifications cellulaires (taux de calcium, pH). Par ailleurs, ils révèlent que les AGTLC agissent non seulement sur les mitochondries mais aussi sur les lysosomes qui pourraient largement contribuer à la mort cellulaire en re-largant dans le cytoplasme différentes enzymes protéolytiques. Par ailleurs, l'inactivation d'Abcd1 semble rendre plus sensible les cellules aux AGTLC et augmenter la proportion de cellules mourant par apoptose. Les effets de l'extinction d'Abcd1 provoquent une diminution de l'expression de PLP qui n'est pas potentialisée par les AGTLC.

L'implication du lysosome dans la mort cellulaire induite par les AGTLC est une piste qui mérite d'être approfondie en raison des applications pharmacologiques sur lesquelles elle pourrait aboutir dans le cadre du traitement de l'X-ALD.

Characterization of cell death and myelin protein expression (PLP, MBP) in wild type and Abcd1 inactivated 158N Murine Oligodendrocytes treated with C24:0 or C26:0

Abstract

In X-linked adrenoleukodystrophy (X-ALD) characterized by a genetic deficiency of the ABCD1 peroxisomal protein, the identification of dead cells in brain lesions suggested that the death of oligodendrocytes, which are myelin synthesizing cells, might contribute to the demyelination process observed in severe forms of X-ALD. As very long chain fatty acids (VLCFA) are increased in the plasma and tissues, including brain, of X-ALD patients, the aim of the present study was to characterize the impact of VLCFA (C24:0 and C26:0) on wild type or Abcd1 deficient murine oligodendrocytes 158N. In this context, the ability of VLCFA (5, 10, 20, and 40 μ M) to induce cell death of 158N cells and to modulate the expression of the major myelin proteins (PLP and MBP) was studied. On 158N cells, under treatment with VLCFA, cell proliferation was inhibited in a dose dependent manner. At 10 and 20 μ M, important morphological changes were revealed by transmission electron microscopy: mitochondria of various sizes and shapes, and smaller than in untreated cells; presence of numerous vacuoles containing cellular debris. At these concentrations, a strong staining was observed with monodansylcadaverine on VLCFA-treated cells suggesting the involvement of autophagic processes. In addition, a loss of transmembrane potential was observed with Rhodamine 123 associated with a cytoplasmic redistribution of mitochondria as well as lysosomal modifications: enhanced permeability revealed by staining with Acridine Orange, and cytoplasmic redistribution of lysosomes shown with Lysotracker and LAMP1. The different methods used to characterize cell death (Hoechst staining, FLICA, TUNEL, presence of active caspase-3) support that the mode of cell death induced by C24:0 and C26:0 is not an apoptotic process. Interestingly, this mode of cell death is immediately associated with an increase of intracellular calcium and with a decrease of intracellular pH which can be related to lysosomal destabilisation. Inactivation of Abcd1 only slightly increases the cytotoxic effects of VLCFA measured by staining with propidium iodide. In addition, Abcd1 inactivation was associated with a decrease of MBP. However, on wild type or Abcd1 deficient cells, VLCFA have mainly no effect on PLP and MBP expression.

Introduction

X-linked adrenoleukodystrophy (X-ALD, OMIM 300100) is the most frequent peroxisomal leukodystrophy of childhood, affecting approximately 1/20,000 boys (Berger and Gärtner, 2006). It is characterized by axonopathy in the spinal cord, demyelination in the cerebral hemispheres, and adrenal insufficiency associated with an accumulation of saturated (C24:0 and C26:0), and to a lesser extent monounsaturated (C26:1) very long chain fatty acids (VLCFA) in the plasma and tissues of patients, especially in the brain and adrenal cortex (Valianpour *et al.*, 2003; Kemp and Wanders, 2007). This disease is caused by defects of the *ABCD1* gene (located at the end of the long arm of the X-chromosome (Xq28)), which encodes for the ATP-binding cassette (ABC) transporter adrenoleukodystrophy protein (ALDP, ABCD1) located in the peroxisomal membrane (Mosser *et al.*, 1993; Dubois-Dalcq *et al.*, 1999). To date, more than 500 different mutations have been reported in the *ABCD1* gene (Kemp *et al.*, 2001; see also X-ALD database: www.x-ald.nl). The exact function of ALDP, which is widely expressed in oligodendrocytes, astrocytes, microglia, and endothelial cells but only sparsely in neurons (Höftberger *et al.*, 2007), remains still unclear whereas it seems to play crucial in transport of VLCFA, or their Coenzyme A derivatives, into peroxisomes (Wanders and Waterham, 2006). Thus, it is well established that the impairment of the functions of ALDP leads to a disturbed degradation of VLCFA via peroxisomal beta-oxidation resulting in the plasmatic and tissular accumulation of VLCFA, especially C24:0 and C26:0 in X-ALD patients (Baes and Aubourg, 2009). Currently, data obtained with transgenic mice demonstrated that the loss of peroxisomes in the oligodendrocytes, which are myelin synthesising cells (Baumann and Pham-Dinh, 2001), is sufficient to lead to demyelination in central nervous system. Indeed, in *CNP-Pex5* knockout mice (Kassmann *et al.*, 2007), the absence of functional peroxisome caused progressive demyelination. At the opposite, when peroxisomes were deleted from astrocytes in GFAP-Pex5(-/-) mice or from neurons in NEX-Pex5(-/-) mice, the absence of peroxisomal metabolism in these cells did not provoke the neurodegenerative phenotype observed after deleting peroxisomes from oligodendrocytes whereas a marked accumulation of VLCFA was observed in brain (Bottelbergs *et al.*, 2010). Thus, these data underline that peroxisome need to be present within oligodendrocytes for the preservation of axonal integrity and for the formation and maintenance of myelin (Baes and Aubourg, 2009).

So, whereas the genetic basis of most peroxisomal disorders are well characterized (Gould and Valle, 2000; Weller *et al.*, 2003), and whereas the predominant role of peroxisomes in oligodendrocytes is well established for myelination (Kassmann *et al.*, 2007; Baes and

RESULTATS

Aubourg, 2009; Bottelbergs *et al.*, 2010), the consequences of the accumulation of VLCFA in oligodendrocytes and the associated molecular mechanisms capable to activate dys- or demyelination are still not well known. It is possible that the incorporation of VLCFA might destabilize cell membranes (Ho *et al.*, 1995) or stimulate the synthesis of TNF- α in macrophages and astrocytes in brain lesions of X-ALD patients (Paintlia *et al.*, 2003) capable to further induce dysfunctions or cell death in oligodendrocyte progenitor cells or in oligodendrocytes (Cimini *et al.*, 2003; Eichler *et al.*, 2008; Hein *et al.*, 2008; Singh and Pujol, 2010). Therefore, as VLCFA accumulation in oligodendrocytes may induce a cell death process, contributing at least in part, to the demyelination and to the progression of X-ALD (Feigenbaum *et al.*, 2000), it is important to study the effects of tetracosanoic acid (C24:0) and hexacosanoic acid (C26:0), (two main VLCFA enhanced in the plasma and tissues of X-ALD patients (Takemoto *et al.*, 2003)) on oligodendrocyte viability and on the synthesis of main myelin proteins, proteolipid protein (PLP) and myelin basic protein (MBP), which have not only important roles in myelin structure and function for the transmission of the nerve impulse (Taylor *et al.*, 2004; Hörster *et al.*, 2005) but also on various oligodendrocytes and neurons activities (Campagnoni and Skoff, 2001).

So, as the consequence of VLCFA accumulation in oligodendrocytes of X-ALD patients are still questionable (Eichler *et al.*, 2008), we used wild type murine oligodendrocytes 158N and siRNA inactivated *Abcd1* 158N cells to characterize the impact of intracellular increase of C24:0 and C26:0 on the induction of cell death, and on the expression of PLP and MBP. The immortalized 158N murine oligodendrocytes were chosen since they contain functional peroxisomes, and express the proteolipid protein (PLP) and the myelin basic protein (MBP) as well as main markers of well differentiated oligodendrocytes (CNPase and myelin oligodendrocyte glycoprotein (MOG)) (Baarine *et al.*, 2009), allowing thus to study the relationships between peroxisomal defects, and oligodendrocyte functions.

Materials and Methods

Cells, cell cultures, and cell treatments

Normal murine oligodendrocytes (158N) immortalized with the SV40 large T-antigen derive from Tabby male (Ta/Y) control mice (Feutz *et al.*, 2001; Ghandour *et al.*, 2002). These cells, which have some characteristics of well differentiated oligodendrocytes (Baarine *et al.*, 2009), were seeded at 5,000–10,000 cells/cm² either in 75-cm² culture flasks or in Petri dishes (100 mm in diameter) and cultured in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) supplemented with 5% (v/v) heat inactivated fetal bovine serum. Cells were incubated at 37°C in a

RESULTATS

humidified atmosphere containing 5% CO₂, trypsinized (0.05% trypsin-0.02% EDTA solution) and passaged twice a week .

C24:0 and C26:0 were from Sigma-Aldrich (St Louis, MO, USA). They were solubilized in alpha-cyclodextrin (Sigma-Aldrich) as previously described (Singh and Kishimoto, 1983). Final concentration of alpha-cyclodextrine (vehicule) in the culture medium was 1 mg/ml (Hein *et al.*, 2008). For the different experiments, the conditions of treatment with VLCFA (tetracosanoic acid C24:0; hexacosanoic acid C26:0) were the followings. After plating 158N cells in 6 or 12 wells plates for 48 h, the cells were further treated for 24 or 48 h with various VLCFA concentrations (5, 10, 20, 40 μ M) in HAM's-F10 medium. For transfected cells, cells were plated for 24 h in 12 well plates, transfected with Abcd1 siRNAs for 24 h in DMEM medium supplemented with 10% SVF, and then treated for 24 h with different VLCFA concentrations (5, 10, 20 μ M) in HAM's-F10 medium.

Cell Counting and cell morphology

The total number of cells (adherent and non-adherent cells) was determined on 158N oligodendrocytes cultured in the absence or in the presence of VLCFA (C24:0 and C26:0 used at 5, 10, 20, and 40 μ M for 24 h and 48 h) in 6-well plates by using a hemacytometer under an inverted phase contrast microscope Diaphot (Nikon, Tokyo, Japan) which was also used to evaluate cell morphology. Digitalized images were obtained with a Coolpix P5100 camera (Nikon).

Transmission electron microscopy

Transmission electron microscopy was used to visualize the ultrastructural modifications induced by VLCFA (C24:0 and C26:0 used at 10 or 20 μ M for 24 h) on 158N oligodendrocytes. Briefly, the samples were fixed for 1 h at 4°C in 2.5% (w/v) glutaraldehyde diluted in cacodylate buffer (0.1 M, pH 7.4), washed twice in cacodylate buffer (0.1 M, pH 7.4), post-fixed in 1% (w/v) osmium tetroxide diluted in cacodylate sodium (0.1 M, pH 7.4) for 1 h at room temperature in the dark, and rinsed twice in cacodylate buffer (0.1 M, pH 7.4). The preparations were then dehydrated in graded ethanol solutions and embedded in Epon. Ultra-thin sections were cut with a diamond knife on an ultramicrotome, contrasted with uranyl acetate and lead citrate, and examined under an H7500 electron microscope (Hitachi, Tokyo, Japan).

RESULTATS

Nuclei staining with Hoechst 33342

Nuclear morphology of control and VLCFA-treated cells was characterized by fluorescence microscopy after staining with Hoechst 33342 used at 2 µg/ml: normal cells are characterized by round and regular nuclei, apoptotic cells by condensed and/or fragmented nuclei, necrotic cells by irregular and diffuse nuclei (Lizard et al., 1995). Cell deposits of about 40,000 cells were applied to glass slides by cytocentrifugation (5 min, 1,500 rpm) with a cytospin 2 (Shandon, Cheshire, UK), mounted in Dako fluorescent mounting medium (Dako, Copenhagen, Denmark), and stored in the dark at 4°C until observation. The morphological aspect of cell deposits was determined with an Axioskop fluorescent microscope (Zeiss, Jena, Germany) by using UV light excitation. For each sample, 300 cells were examined.

Evaluation of transmembrane mitochondrial potential with Rhodamine 123

Variations of the mitochondrial transmembrane potential ($\Delta\Psi_m$) were measured with Rhodamine 123 (Rh 123) (Sigma-Aldrich) used at 10 µM final concentration as previously described (Lizard et al., 1995). Flow cytometric analyses were performed on a Galaxy flow cytometer (Partec), the green fluorescence of Rh123 was collected through a 520/20 nm band pass filter and fluorescent signals were measured on a logarithmic scale. For each sample, 10,000 cells were acquired and the data were analyzed with Flomax software (Partec).

Labelling of lysosomal compartment with LysoTracker and measurement of lysosomal membrane integrity with acridine orange

The aspect and the cellular distribution of lysosomes, which can be evaluated by using LysoTracker (Yoon *et al.*, 2010), was evaluated on 158N cells cultured on glass coverslips by staining with LysoTracker Red (Invitrogen, Cergy-Pontoise, France) used at 1 µM final concentration in the culture medium (5 min, 37 °C). After labelling, the coverslips were washed in PBS, mounted in Dako fluorescent mounting medium (Dako, Copenhagen), and stored in the dark at 4°C until observation under blue light. Observation were realized under an Axioskop fluorescent microscope (Zeiss) using green excitation, and digitalized images were obtained with an Axiocam Zeiss camera (Zeiss)

Integrity of lysosomal membrane was determined with the lysosomotropic weak base acridine orange (AO) (Invitrogen) used at 5-10 µg/ml after 15 min of incubation at 37°C as previously described (Lemaire-Ewing *et al.*, 2005). AO is a metachromatic fluorophore that accumulates in normal lysosomes, turning orange-red under blue light excitation. When AO-loaded lysosomes are damaged, AO is then released into the cytosol, turning yellow-green under blue

RESULTATS

light excitation. Flow cytometric analyses were performed on a Galaxy flow cytometer (Partec); the green and red fluorescence of AO were collected through a 520/20 nm band pass filter, and a 630 nm long pass filter, respectively. Fluorescent signals were measured on a logarithmic scale. For each sample, 10,000 cells were acquired and the data were analyzed with Flomax software (Partec). After staining with AO, cell deposits (40,000 cells per slide) were also applied to glass slides by cytocentrifugation (5 min, 1,500 rpm) with a cytospin 2 (Shandon), coverslipped, examined under an Axioskop fluorescent microscope (Zeiss) using blue excitation, and digitalized images were obtained with an AxioCam Zeiss camera (Zeiss).

Identification of autophagic vacuoles after staining with monodansylcadaverine

The presence of autophagic vacuoles was analyzed by fluorescence microscopy after staining with monodansylcadaverine (MDC) (Biederbick *et al.*, 1995; Nieman *et al.*, 2001). MDC was prepared at 0.1 M in DMSO and added to the culture medium at a final concentration of 5 μ M as previously described (Miguet-Alfonsi *et al.*, 2002). After 30 min of incubation at 37°C, cells were collected by centrifugation, resuspended in the culture medium, applied to glass slides by cytocentrifugation (5 min, 1,500 rpm) with a cytospin 2 (Shandon), coverslipped and immediately examined under an Axioskop fluorescent microscope (Zeiss) by using UV light excitation.

In situ detection of internucleosomal DNA fragmentation

In situ visualization of internucleosomal DNA fragmentation at the single-cell level was performed by using the kit: DeadEnd™ Fluorometric TUNEL System (Promega, Charbonnières-les-Bains, France) (Bedner *et al.*, 2000). Briefly, cells were trypsinized, washed twice in PBS, mixed with non-adherent cells, and applied to glass slides (40,000 cells per slide) by centrifugation (5 min, 1,500 rpm) with a cytospin 2 (Shandon). After fixation with 2% paraformaldehyde diluted in PBS (pH 7.4) (5 min, room temperature), the cells were permeabilized with a 0.2% Triton X-100 solution diluted in PBS (5 min, room temperature), washed 3 times with PBS, and incubated with 100 μ l of equilibration Buffer (5 min, room temperature). Cells were then incubated with 30 μ l of TdT solution (1 h, 37°C) in a humidified atmosphere. The signal of TUNEL was then detected by incubation (15 min, room temperature) with SSC 2X buffer. After washing in PBS, cells were counterstained with Hoechst 33342 (2 μ g/ml, 5 min), the slides were mounted in Dako fluorescent mounting medium (Dako), coverslipped, and stored at 4°C. Observations were performed under an

RESULTATS

Axioskop fluorescent microscope (Zeiss) by using blue and UV light excitations. For each sample, 300 cells were examined.

In situ detection of caspase and serine protease activities

Total caspase activities were measured with fam-VAD-fmk (Trevigen, Gaithersburg, MD) and total serine protease activities were measured with fluorescent inhibitor of serine protease (FLISP) using specifically dedicated kits according to manufactural procedures. Fluorochrome-labeled inhibitors of caspase (FLICA) reagents, such as fam-VAD-fmk, and FLISP are cell permeant and non cytotoxic compounds used to investigate in situ caspase activities during apoptosis and in situ serine protease activities during cell death, respectively (Grabarek *et al.*, 2002).

Fam-VAD-fmk is a carboxyfluorescein derivative of VAD-fmk. This fluorescent inhibitor of caspases (FLICA) reagent was dissolved in DMSO to obtain a X150 concentrated solution. Prior to use, a X3 working solution was prepared by dilution 1:5 in PBS. Furthermore, 10^6 cells were distributed into 300 μ l aliquots culture medium, and fam-VAD-fmk working solutions were added to obtain a X1 final concentration. After 1 h of incubation in a 5% CO₂ / 95% air-humidified atmosphere at 37°C, cells were washed twice in PBS. The cells were resuspended in 400 μ l of PBS and immediately analyzed by flow cytometry on a GALAXY flow cytometer (Partec).

FLISP was also dissolved in DMSO to obtain a 1 mM concentrated solution. Furthermore, 10^6 cells were distributed into 490 μ l PBS, and FLISP was added to obtain a 20 μ M final concentration. After 1 h of incubation in a 5% CO₂ / 95% air-humidified atmosphere at 37°C, cells were washed twice in PBS. The cells were resuspended in 400 μ l of PBS and immediately analyzed by flow cytometry on a GALAXY flow cytometer (Partec).

The green fluorescence of fam-VAD-fmk or FLISP were collected through a 520/20 nm band pass filter and measured on a logarithmic scale. For each sample, 10,000 cells were acquired and data were analyzed with Flomax software (Partec).

Immunostaining procedures for flow cytometry and fluorescence microscopy

For flow cytometric analyses, cells collected by trypsinization were mixed with non-adherent cells, washed in PBS, and fixed in 2% paraformaldehyde diluted in PBS (pH 7.4) (10 min, room temperature). Furthermore, the cells were treated with the FACS permeabilizing solution (BD-Biosciences, San Jose, CA, USA) for 10 min. After washing in PBS, cells were incubated for 20 min with blocking buffer (PBS, 0.05% saponine, 10% goat serum), washed

RESULTATS

in PBS, and incubated (1 h, room temperature) with the appropriate primary antibody (rabbit polyclonal antibody raised against MBP (ab53294, Abcam, Paris, France) used at 1/60; rabbit polyclonal antibody raised against PLP (ab28486, Abcam) used at 1/200) diluted in blocking buffer. Cells were then washed with PBS and incubated for 1 h at room temperature with a 488-Alexa goat anti-rabbit (Invitrogen) diluted in PBS used 1/300. A conjugated control was simultaneously realized. Finally, cells were washed and resuspended in PBS, and analyzed on a GALAXY flow cytometer (Partec). The green fluorescence of 488-Alexa was collected with a 520/10-nm band pass filter. The fluorescent signals were measured on a logarithmic scale. For each sample, 10,000 cells were acquired (dead cells and debris were excluded from the analysis by gating on living cells with the size/structure density plots). Data were analyzed with FlowMax (Partec) and FlowJo (FlowJo Inc) softwares.

Fluorescence microscopy was realized either on cells seeded at 10,000 cells/cm² on 12-mm glass coverslips or on cell deposits obtained by cytocentrifugation with a cytospin 4 centrifuge (Shandon). To this end, cells were fixed in 2% paraformaldehyde diluted in PBS (pH 7.4) (10 min, room temperature). Furthermore, the cells were treated with the FACS permeabilizing solution (BD-Biosciences) (5 min, room temperature), washed in PBS, and incubated (20 min, room temperature) with blocking buffer (PBS, 0.05% saponine, 10% goat serum). After washing in PBS, cells were incubated (1 h, room temperature) with an anti-LAMP1 primary rabbit polyclonal antibody used at 1:300, or with a rabbit polyclonal antibody directed against Abcd1 used at 1/100 diluted in blocking buffer. Cells were then washed with PBS and incubated for 1 h at room temperature with a 594-Alexa (Invitrogen) diluted in PBS used 1:300. Nuclei were counterstained with Hoechst 33342 used at 2 µg/ml. After washing with PBS, slides were mounted in Dako fluorescent mounting medium (Dako), coverslipped, and stored at 4°C. Observations were performed under an Axioskop fluorescent microscope (Zeiss) by using green light excitation, and digitalized images were obtained with an Axiocam Zeiss camera (Zeiss).

Video-microscopic measurement of intracellular Ca²⁺

To measure intracellular calcium, 158N cells were cultured in 60 mm diameter Petri dishes. When the cells were subconfluent, alpha-cyclodextrine, C24:0 or C26:0 were added into the culture medium and the effects on cytosolic calcium concentration were immediately quantified by video microscopy. Cytosolic calcium concentration of calcium ([Ca²⁺]_c) was followed by using the cell permeable fluorescent indicator Fura2-AM (Invitrogen) (Siver, 1998). In brief, subconfluent 158N cells cultured in Petri dishes were washed in PBS buffer,

RESULTATS

and loaded with 5 μ M Fura2-AM for 30 min at 37°C. After washing, cells were put in fresh culture medium and after addition of C24:0 or C26:0 (20 μ M final concentration) or alpha-cyclodextrin (1 mg/ml final concentration), $[Ca^{2+}]$ was followed as 340/380 nm excitation wavelength ratio at 530 nm wavelength emission using a Cell Observer Station composed of an Axiovert 200M microscope (Leica), a digital camera (Axiocam HRm, Leica). A field of cells was imaged at 340 nm excitation and 380 nm excitation, and emission was collected at 530 nm, each image was acquired over 5 s, and a couple of images was acquired every 16 s over 50 min.

Video-microscopic measurement of intracellular pH

To measure intracellular pH, 158N cells were cultured in 60 mm diameter Petri dishes. When the cells were subconfluent, with alpha-cyclodextrine (1 mg/ml final concentration), C24:0 or C26:0 (20 μ M final concentration) were added into the culture medium and their effects on intracellular pH was followed using the cell permeable fluorescent indicator BCECF-AM Invitrogen) (Boyer and Hedley, 1994). Briefly, cells were washed, loaded with 5 μ M BCECF-AM for 30 min at 37°C. After a final wash, cells were put in fresh culture medium, and after addition of C24:0, C26:0 (20 μ M final concentration) or alpha-cyclodextrin (1 mg/ml final concentration), the intracellular pH was followed as 450/490 nm excitation wavelength ratio at 530 nm wavelength emission using Cell Observer Station composed of an Axiovert 200M microscope (Leica), a digital camera (Axiocam HRm, Leica). Each image was acquired over 25 ms, and a couple of images was acquired every 2 min for 45 min.

Inactivation of Abcd1 with SiRNAs

Abcd1 siRNAs were from Ambion (Applied Biosystems, Courtaboeuf, France). These siRNAs were used at 30 nM and transfected in 158N cells by means of the INTERFERin transfection reagent according to the manufacturer's instructions (Polyplus / Ozyme, St Quentin en Yvelines, France). For Abcd1 inactivation, three siRNAs were tested:

siRNA 1 (1D s62233), 5'-CACUGUCGUUUUAAGAGGAtt-3'(sense) and 5'-UCCUCUUA AAAACGACAGUGtt-3'(antisense);

siRNA 2 (1D s62234), 5'-CCAACAGACUUACUACCGAtt-3'(sense) and 5'-UCGGUAGUAAGUCUGUUGGga-3'(antisense);

A negative control siRNA (Ambion) directed against gene sequences with no significant homology to any known genes from mouse, rat, or human were simultaneously used. Twenty-

RESULTATS

four hours after siRNA transfection, cells were collected by trypsinization and used to analyze the expression of *Abcd1* mRNA and protein by RT-qPCR and western blotting, respectively.

Quantification of Abcd1 mRNAs by RT-qPCR

Cells were harvested with trypsin/EDTA and washed with PBS. Total RNA isolation from control, Scrambled RNA, *Abcd1* SiRNAs treated-158N cells was extracted using the RNeasy Mini kit (Qiagen, Courtaboeuf, France) following the manufacturer's instructions. cDNA was generated by reverse transcription using QuantiTect Rev. Transcription Kit (Qiagen) according to the manufacturer's protocol and analyzed by quantitative PCR using the SYBR Green (BioScience Technology, Rockaway, NJ, USA) real-time PCR technology, and an iCycler iQ Real-Time Detection System (Bio-Rad laboratories, Marne la Coquette, France). The primer sequences are: (*Abcd1*: forward 5'-acatccctatcatcacaccactg-3' and reverse 5'-gagaactcttgccacagccattg-3'; *L27*: forward 5'-ctcatgcccacaagggtactctgtg-3' and reverse 5'-tgtatcgctcctcaaacttgacct-3') were chosen using the Beacon Designer Software (Bio-Rad laboratories). Thermal cycling conditions were as follows: activation of DNA polymerase at 95°C for 10 min, followed by 40 cycles of amplification at 95°C for 15 s, 60°C for 30 s, and 72°C for 30 s, followed by a melting curve analysis to control the absence of nonspecific products. Gene expression was quantified using cycle to threshold (Ct) values and normalized by the *L27* reference gene. The quantitative expression of *Abcd1*, and β -actin, was determined according to $2^{-\Delta Ct}$ with $\Delta Ct = (Ct \text{ of the gene studied}) - (Ct \text{ of the } L27)$, or as fold induction of the control.

Characterization and quantification of Abcd1 protein by western blotting

After 24 h of transfection (2 days of culture), cells were trypsinized, washed with PBS, harvested and lysed in a 10 mM Tris/HCl buffer, pH 8, containing 10 mM EDTA, 1% Triton X100, 100 mM NaCl and a protease inhibitor cocktail (Roche Diagnostics Inc.) for 20 min on ice. After centrifugation at 17,000 g for 20 min at 4°C, the total protein concentrations of supernatants were determined using bovine serum albumin as a standard (Bio-Rad Laboratories). A total protein (30 µg) was run on SDS-polyacrylamide gels (10%) according to Laemmli (Laemmli, 1970), and transferred onto a PVDF membrane (Bio-Rad Laboratories) as previously described (Towbin *et al.*, 1979). The membrane was blocked in TBS with 0.1% Tween containing 1% skim milk (blocking buffer) and incubated overnight at 4°C. Primary antibodies, anti *Abcd1* 1/5,000 (rabbit polyclonal, serum 925029) described elsewhere (Baarine *et al.*, 2009), and anti β -actin 1/10,000 (mouse monoclonal, Sigma-Aldrich) were

RESULTATS

diluted in blocking buffer and applied to sections for 1 h at room temperature. The membranes were washed TBS with 10% Tween 20 (TBST). Bands were detected using anti-IgG polyclonal antibody conjugated to peroxidase 1/10,000 (Santa Cruz, CA, USA) for 1 h at room temperature. The membranes were washed in TBST and revealed using an enhanced chemiluminescence detection kit (Santa Cruz Biotechnology Inc, Santa Cruz, CA, USA) and autoradiographed.

Statistical analysis

Statistical analyses were performed on at least three independent experiments with Prism 5 software, version 5.01 (Prism Software Corporation, Irvine, CA, USA) with the Mann and Whitney test. Data were considered to be statistically different at a *p*-value of 0.05 or less.

Results

Impact of C24:0 and C26:0 on the proliferation of 158N oligodendrocytes

The effects of C24:0 and C26:0 (5, 10, 20, and 40 μ M) on 158N murine oligodendrocytes proliferation was studied after a 24 and 48 h period of treatment on sub-confluent cells. As shown in Figure 1A, at 5 and 10 μ M, there was no or slight effects on cell proliferation (quantified by counting on a hemacytometer). However, at 20 and 40 μ M, cell proliferation was strongly inhibited (up to 60 %). As the effects of C24:0 and C26:0 on cell proliferation were in the same range of order at 24 and 48 h, further investigations realised to characterize the type of cell death were only performed at 24 h. In these conditions, observations performed by phase contrast microscopy, did not revealed the presence of floating cells in the culture medium of 158N cells treated with C24:0 or C26:0 used at 5 and 10 μ M for 24 h, whereas some non adherent cells were found at 20 and 40 μ M (Fig. 1B). With alpha-cyclodextrine, used as vehicle to solubilized C24:0 and C26:0, no effects on cell proliferation were observed when compared to untreated cells.

Ultrastuctural modifications induced by C24:0 and C26:0 on 158N oligodendrocytes

The ultraructural modification induced by C24:0 and C26:0 (10, 20, and 40 μ M) on 158N murine oligodendrocytes were determine at 24 h of treatment on sub-confluent cells (Fig. 2). When compared to untreated cells, no ultrastructural modifications were induced by alpha cyclodextrine (Fig. 2A-B). In control cells, the mitochondrial cristae were clearly distinguishable (Fig. 2C) and their aspects were similar in alpha-cyclodextrine treated cells (data not shown). With C24:0 and C26:0 used at 10 μ M, no ultrastructural changes were

RESULTATS

detected (data not shown). However, with C24:0 and C26:0 used at 20 and 40 μ M (Fig. 2D-E, G-H, J-K), numerous cytoplasmic changes were observed, and especially the presence of vacuoles of various shapes and sizes containing various types of materials. In addition, comparatively to untreated and alpha-cyclodextrine-treated cells, mitochondria smaller in sizes and with abnormal shapes were observed in C24:0 and C26:0 – treated cells (Fig. 2 F, 2L) as well as lipid droplets (Fig. 2I) and multilamellar cytoplasmic structures, named myelin figures (Fig. 2K).

The absence of cell with fragmented and/or condensed nuclei, characteristic of an apoptotic mode of cell death, does not support that C24:0 and C26:0 induce apoptosis on 158N cells (Lizard *et al.*, 1995). As the vacuoles can be tightly associated with cellular organelles such as mitochondria (Fig. 2E), these ultrastructural features evoke mitophagic and/or autophagic processes. Therefore, in order to evaluate whether C24:0 and C26:0 may activate autophagic processes, cells were stained with monodansylcadaverine, which has been described to accumulate in autophagic vacuoles (Niemann *et al.*, 2001) (Fig. 3). Interestingly, whereas only small and tightly fluorescent spots were detected in the cytoplasm of untreated and alpha-cyclodextrine-treated 158N cells, a strong fluorescence was observed in the cytoplasm of C24:0 and C26:0 – treated cells as soon as 20 μ M.

Characterization of the mode of cell death induced by C24:0 and C26:0 by complementary methods: Hoechst staining, TUNEL method, FLICA method, and detection of active caspase-3 by immunofluorescence

In order to precise the mode of cell death induced by C24:0 and C26:0, additional tests were used (Fig. 4 A-B). The absence of cells with fragmented and/or condensed nuclei observed by fluorescence microscopy after staining with Hoechst 33342 were in agreement with data obtained by transmission electron microscopy, and support that C24:0 and C26:0 (10 and 20 μ M) do not induce apoptosis on 158N cells (Fig. 4A). In addition with C24:0 and C26:0 used at 10 μ M, no internucleosomal DNA fragmentation was found with the TUNEL method, no activated caspases were detected with the FLICA method, and no activated caspase-3 were found by immunofluorescence staining (Fig. 4A). Altogether, this data support the induction of a non apoptotic mode of cell death. However, with C24:0 and C26:0 used at 20 μ M, around 15% of cells with inter-nucleosomal fragmented DNA were detected with the TUNEL method, and on C26:0 treated cells similar percentages of cells with activated caspases detected with the FLICA method were found. As serine protease dependent activation of caspases have been reported (Stenson-Cox *et al.*, 2003), the activation of these enzymes was

RESULTATS

determined by FLISP method (Fig 4B). Interestingly, especially in C26:0 (20 μ M) treated 158N cells, a marked and significant activation of serine protease was observed.

Effects of C24:0 and C26:0 on transmembrane mitochondrial potential and cytochrome c repartition

As important morphological changes (sizes and shapes) of mitochondria were observed by transmission electron microscopy in C24:0 and C26:0 – treated 158N cells, the impact of these VLCFA on the transmembrane mitochondrial potential and on the cytoplasmic repartition of cytochrome c were investigated (Fig. 5). Noteworthy, a loss of transmembrane mitochondrial potential was observed at 5, 10, and 20 μ M with C24:0, and at 10 and 20 μ M with C26:0 (Fig. 5A). By immunofluorescence staining, important modifications of the repartition of the cytochrome c were observed in the cytoplasm of VLCFA-treated cells at 10 and 20 μ M (Fig. 5B).

Implication of lysosome in C24:0 and C26:0 induced cell death

In addition to mitochondria, lysosomes are also important organelles capable to play important roles in caspase-dependent and independent cell death (Yamashima and Oikawa, 2009). Therefore, we precised the part taken by lysosomes in VLCFA-induced cell death by various approaches (Fig. 6). By using the lysosomotropic dye, acridine orange (AO), and flow cytometry, we analyzed the effects of C24:0 and C26:0 (5, 10 and 20 μ M; 24 h) on lysosomal membrane integrity of 158N murine oligodendrocytes (Fig. 6A). No effects were detected at 5 μ M, whereas as early as 10 μ M a destabilization of lysosomal integrity was observed as shown by lower percentages of acridine orange red negative cells. By fluorescent microscopy, on AO stained cells, only small red fluorescent spots were revealed in untreated and alpha-cyclodextrine-treated cells (Fig. 6B). At the opposite, on C24:0 or C26:0 (20 μ M)-treated cells, mainly large or aggregated red spots were present. By using LysoTracker Red, allowing to evaluate the size and distribution of lysosomes, we obtained similar results (Fig. 6B). In addition, the identification of LAMP1 (a lysosomal associated membrane protein (Eskelinen *et al.*, 2003)) by immunostaining also show that C24:0 and C26:0 induce an aggregation and a redistribution of the lysosomes into the cytoplasm (Fig. 6B). With alpha-cyclodextrine no effects on lysosomal integrity, size and distribution were found.

Effects of C24:0 and C26:0 on intracellular pH

RESULTATS

The ability of VLCFA to induce lysosomal modifications led us to investigate the effects of C24:0 and C26:0 on intracellular pH. To this end, we analyzed whether addition of C24:0 or C26:0 (20 μ M) in the culture medium causes changes of intracellular pH measured every 2 min for 45 min with BCECF-AM by video microscopy. Figure 7A, which displays the representative traces of the kinetics of C24:0 and C26:0, shows that these two VLCFA very rapidly decrease the intracellular pH suggesting a very rapid effect of these VLCFA on membrane integrity. With alpha-cyclodextrine (1 mg/ml), no modification of intracellular pH was observed.

Effects of C24:0 and C26:0 on intracellular calcium level

As VLCFA are able to induce deregulation of Ca^{2+} in rat oligodendrocytes primary cultures (Hein *et al.*, 2008), it was of interest to precise the mechanism of the early changes associated with cytotoxic effects of VLCFA on 158N murine oligodendrocytes (Fig. 7B). To this end, we analyzed whether application of C24:0 (20 μ M) and C26:0 (20 μ M) causes changes of intracellular Ca^{2+} measured every 16 s for 50 minutes with Fura-2 by video microscopy. Figure 4, which displays the representative traces of the kinetics of C24:0 and C26:0, shows that these two VLCFA trigger very early intracellular increase of Ca^{2+} when they were added to the culture medium, and that this increase was higher with C26:0 than with C24:0. For comparison, we give the stable control trace obtained with vehicle solution containing alpha-cyclodextrine (1 mg/ml).

Incidence of Abcd1 silencing on C24:0 and 26:0 - induced cell death

To precise the incidence of Abcd1 expression on the sensitivity of 158N murine oligodendrocytes to C24:0 and C26:0 – induced cell death, the effects of C24:0 and C26:0 (10 and 20 μ M; 24 h) were studied on wild type and Abcd1 knockdown 158N murine oligodendrocytes (Fig. 8). Abcd1 silencing was performed either with siRNA Abc1 (1) or Abc1 (2) which have similar efficiency. In these conditions, when compared to untransfected cells, slight increase of cell death were observed in C24:0 and C26:0 treated cells excepted in the condition C26:0 (20 μ M) wild type 158N cells versus transfected Abcd1 (2) transfected cells.

Incidence of Abcd1 silencing on PLP and MBP expression

As VLCFA-induced oligodendrocyte cell death has been suggested to contribute to demyelination in X-ALD (Eichler *et al.*, 2008), the effects of C24:0 and C26:0 (5, 10 and 20

RESULTATS

μM ; 24 h) were studied on wild type and *Abcd1* knockdown 158N murine oligodendrocytes to determine the effects on the two major myelin proteins: PLP and MBP (Fig. 9). Interestingly, *Abcd1* silencing (siRNA *Abcd1* (2)) decreases MBP expression whereas it has no effect on PLP expression (Fig. 9A). When added on wild type or *Abcd1* inactivated 158N cells, C24:0 and C26:0 have either no effects or slight effects (positive or negative) on PLP and MBP expression (Fig. 9B).

Acknowledgements

This work was supported by grants from the INSERM, the Université de Bourgogne, and the Conseil Régional de Bourgogne. The authors acknowledge Dr Zilal Kattan (Ph.D), Mr Kevin Ragot (MS) and Mr Thomas Nury (BS) for their excellent technical assistance.

References

- Baarine M, Ragot K, Genin EC, El Hajj H, Trompier D, Andreoletti P, Ghandour MS, Menetrier F, Cherkaoui-Malki M, Savary S, Lizard G (2009) Peroxisomal and mitochondrial status of two murine oligodendrocytic cell lines (158N, 158JP): potential models for the study of peroxisomal disorders associated with dysmyelination processes. *J Neurochem.* 111: 119-131.
- Baes M, Aubourg P (2009) Peroxisomes, myelination, and axonal integrity in the CNS. *Neuroscientist* 15: 367-379.
- Baumann N, Pham-Dinh D (2001) Biology of oligodendrocyte and myelin in the mammalian central nervous system. *Physiol Rev* 81: 871-927.
- Bedner E, Smolewski P, Amstad P, Darzynkiewicz Z. (2000) Activation of caspases measured in situ by binding of fluorochrome-labeled inhibitors of caspases (FLICA): Correlation with DNA fragmentation. *Exp Cell Res* 259: 308-313.
- Berger J, Gärtner J (2006) X-linked adrenoleukodystrophy: clinical, biochemical and pathogenetic aspects. *Biochim Biophys Acta* 1763: 1721-1732.
- Biederbick A, Kern HF and Elsässer HP (1995) Monodansylcadaverine (MDC) is a specific *in vivo* marker for autophagic vacuoles. *Eur. J. Cell. Biol.* 66: 3–14.
- Bottelbergs A, Verheijden S, Hulshagen L, Gutmann DH, Goebbels S, Nave KA, Kassmann C, Baes M (2010) Axonal integrity in the absence of functional peroxisomes from projection neurons and astrocytes. *GLIA* 58: 1532-1543.

RESULTATS

- Boyer MJ, Hedley DW (1994) Measurement of intracellular pH, *Methods in Cell Biology* 41: 135-148.
- Campagnoni AT, Skoff RP (2001) The pathobiology of myelin mutants reveal novel biological functions of the MBP and PLP genes. *Brain Pathol.* 11: 74-91.
- Cimini A, Bernardo A, Cifone G, Di Muzio L, Di Loreto S (2003) TNF α downregulates PPAR δ expression in oligodendrocytes progenitor cells: implication for demyelinating diseases. *GLIA* 41: 3-14.
- Dubois-Dalcq M, Feigenbaum V, Aubourg P (1999) The neurobiology of X-linked adrenoleukodystrophy, a demyelinating peroxisomal disorder. *Trends Neurosci* 22: 4-12.
- Eichler FS, Ren JQ, Cossoy M, Rietsch AM, Nagpal S, Moser AB, Frosch MP, Ransohoff RM (2008) Is microglial apoptosis an early pathogenic change in cerebral X-linked adrenoleukodystrophy? *Ann Neurol.* 63: 729-742.
- Eskelinen EL, Tanaka Y, Saftig P (2003) At the acidic edge: emerging functions for lysosomal membrane proteins. *Trends Cell Biol.* 13: 137-145.
- Feigenbaum V, Gélot A, Casanova P, Daumas-Duport C, Aubourg P, Dubois-Dalcq M (2000) Apoptosis in the central nervous system of cerebral adrenoleukodystrophy patients. *Neurobiol Dis.* 7(6 Pt B): 600-612.
- Feutz AC, Pham-Dinh D, Allinquant B, Mieh M, Ghandour MS (2001) An immortalized jimpy oligodendrocyte cell line: defects in cell cycle and cAMP pathway. *GLIA* 34: 241-252.
- Ghandour S, Feutz AM, Jalabi W, Taleb O, Bessert D, Cypher M, Carlock L, Skoff RP (2002) Trafficking of PLP/DM20 and cAMP signalling in immortalized jimpy oligodendrocytes. *GLIA* 40: 300-311.
- Gould SJ, Valle D (2000) Peroxisome biogenesis disorders: genetics and cell biology. *Trends Genet.* 16: 340-345.
- Grabarek J, Du L, Johnson GL, Lee BW, Phelps DJ, Darzynkiewicz Z (2002) Sequential activation of caspases and serine proteases (serpases) during apoptosis. *Cell Cycle* 1: 124-131.
- Hein S, Schönfeld P, Kahlert S, Reiser G (2008) Toxic effects of X-linked adrenoleukodystrophy-associated, very long chain fatty acids on glial cells and neurons from rat hippocampus in culture. *Hum Mol Genet.* 17: 1750-1761.
- Ho JK, Moser H, Kishimoto Y, Hamilton JA (1995) Interactions of a very long chain fatty acid with model membranes and serum albumin. Implications for the pathogenesis of adrenoleukodystrophy. *J Clin Invest.* 96: 1455-1463.
- Höftberger R, Kunze M, Weinhofer I, Aboul-Enein F, Voigtländer T, Oezen I, Amann G, Bernheimer H, Budka H, Berger J (2007) Distribution and cellular localization of

RESULTATS

adrenoleukodystrophy protein in human tissues: implications for X-linked adrenoleukodystrophy. *Neurobiol Dis* 28: 165-174.

- Hörster F, Surtees R, Hoffmann GF (2005) Disorders of intermediary metabolism: toxic leukoencephalopathies. *J Inherit Metab Dis* 28: 345-356.

- Kassmann C, Lappe-Siefke C, Baes M, Brügger B, Mildner A, Werner HK, Natt O, Michaelis T, Prinz M, Frahm J, Nave KA (2007) Axonal loss and neuroinflammation caused by peroxisome-deficient oligodendrocytes. *Nat. Genet.* 39: 969-976.

- Kemp S, Wanders RJ (2007) X-linked adrenoleukodystrophy: very long-chain fatty acid metabolism, ABC half-transporters and the complicated route to treatment. *Mol Genet Metab.* 90: 268-276.

- Laemmli UK. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227: 680–685.

- Lemaire-Ewing S, Prunet C, Montange T, Vejux A, Berthier A, Bessède G, Corcos L, Gamber P, Néel D, Lizard G (2005) Comparison of the cytotoxic, pro-oxidant and pro-inflammatory characteristics of different oxysterols. *Cell Biol Toxicol.* 21: 97-114.

- Lizard G, Fournel S, Genestier L, Dhedin N, Chaput C, Flacher M, Mutin M, Panaye G, Revillard JP (1995) Kinetics of plasma membrane and mitochondrial alterations in cells undergoing apoptosis. *Cytometry.* 21: 275-283.

- Miguet-Alfonsi C, Prunet C, Monier S, Bessède G, Lemaire-Ewing S, Berthier A, Ménétrier F, Néel D, Gamber P, Lizard G (2002) Analysis of oxidative processes and of myelin figures formation before and after the loss of mitochondrial transmembrane potential during 7 β -hydroxycholesterol and 7-ketocholesterol-induced apoptosis: comparison with various pro-apoptotic chemicals. *Biochem Pharmacol.* 64: 527-541.

- Mosser J, Douar AM, Sarde CO, Kioschis P, Feil R, Moser H, Poustka AM, Mandel JL, Aubourg P (1993) Putative X-linked adrenoleukodystrophy gene shares unexpected homology with ABC transporters. *Nature* 361: 726-730.

- Niemann A, Baltes J, and Elsässer HP (2001) Fluorescence properties and staining behavior of monodansylpentane, a structural homologue of the lysosomotropic agent monodansylcadaverine. *J. Histochem. Cytochem.* 49: 177–185.

- Paintlia AS, Gilg AG, Khan M, Singh AK, Barbosa E, Singh I (2003) Correlation of very long chain fatty acid accumulation and inflammatory disease progression in childhood X-ALD: implications for potential therapies. *Neurobiol. Dis.* 14: 425-439.

RESULTATS

- Singh I, Kishimoto Y. Effect of cyclodextrins on the solubilization of lignoceric acid, ceramide, and cerebroside, and on the enzymatic reactions involving these compounds. *J Lipid Res.* 1983; 24: 662-665.
- Singh I, Pujol A (2010) Pathomechanisms underlying X-adrenoleukodystrophy: a three-hit hypothesis. *Brain Pathol.* 20: 838-44.
- Stenson-Cox C, Fitzgerald U, Samali A (2003) In the cut and thrust of apoptosis, serine proteases come of age. *Biochem Pharm* 66: 1469-1474.
- Takemoto Y, Suzuki Y, Horibe R, Shimozaawa N, Wanders RJ, Kondo N (2003) Gas chromatography/mass spectrometry analysis of very long chain fatty acids, docosahexaenoic acid, phytanic acid and plasmalogen for the screening of peroxisomal disorders. *Brain Dev.* 25: 481-487.
- Taylor CM, Marta CB, Claycomb RJ, Han DK, Rasband MN, Coetzee T, Pfeiffer SE (2004) Proteomic mapping provides powerful insights into functional myelin biology. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101: 4643-4648.
- Valianpour F, Selhorst JJ, van Lint LE, van Gennip AH, Wanders RJ, Kemp S (2003) Analysis of very long-chain fatty acids using electrospray ionization mass spectrometry. *Mol Genet Metab.* 79: 189-196.
- Wanders RJ, Waterham HR (2006) Biochemistry of mammalian peroxisomes revisited. *Annu Rev Biochem.* 75: 295-332.
- Weller S, Gould SJ, Valle D (2003) Peroxisome biogenesis disorders. *Annu Rev Genomics Hum Genet.* 4: 165-211.
- Yamashima T, Oikawa S (2009) The role of lysosomal rupture in neuronal death. *Prog Neurobiol.* 89: 343-358.
- Yoon J, Kim KJ, Choi YW, Shin HS, Kim YH, Min J (2010) The dependence of enhanced lysosomal activity on the cellular aging of bovine aortic endothelial cells. *Mol Cell Biochem* 340: 175-178.

Legends to Figures

Figure 1: Effects of very long chain fatty acids (C24:0 and C26:0) on cell growth of 158N murine oligodendrocytes. Sub-confluent murine oligodendrocytes (158N) were cultured in the absence or in the presence of C24:0 and C26:0 (5, 10, 20 or 40 μ M) for 24 and 48 h. C24:0 and C26:0 were diluted in α -cyclodextrine (vehicle: 1 mg/ml). Cell proliferation was determined by cell counting (A). Phase contrast microscopy of untreated, α -cyclodextrine and C24:0 or C26:0 – treated 158N cells (B). Data shown are mean $\pm$ SD from five separate experiments performed in triplicate. Significance of the difference between control and vehicle, C24:0 or C26:0 (Mann Whitney test; * $P < 0.05$ or less).

Figure 2: Ultrastructural features of 158N murine oligodendrocytes treated with very long chain fatty acids (C24:0 and C26:0). Sub-confluent murine oligodendrocytes (158N) were cultured in the absence or in the presence of C24:0 and C26:0 (5, 10, 20 or 40 μ M) for 24 h. C24:0 and C26:0 were diluted in α -cyclodextrine (vehicle: 1 mg/ml). **A:** untreated cells; **B:** vehicle-treated 158N cells; **C:** morphological aspects of mitochondria (dark arrows) in untreated cells; mitochondrial cristae are clearly distinguishable (mitochondria with similar aspects were observed in vehicle-treated cells, our data not shown); **D:** in C24:0 (20 μ M)-treated cells large vacuoles (V) are observed; **E:** enhanced magnification of area delineated by a rectangle in D; cellular debris are found inside the vacuole which is tightly connected with two mitochondria evocating a mitophagy process; mitochondria observed (dark arrows) are smaller than in untreated cells and mitochondrial cristae are hardly distinguishable; **F:** morphological aspects of mitochondria in C24:0 (20 μ M)-treated cells; mitochondria observed (dark arrows) are smaller than in untreated cells and mitochondrial cristae are hardly distinguishable; **G:** in C24:0 (40 μ M)-treated cells the cytoplasm contains some large vacuoles (V) with cellular debris; **H:** enhanced magnification of area delineated by a rectangle in G; cellular debris and membrane sequestration are detected inside the vacuoles; **I:** in C26:0 (20 μ M)-treated cells vacuoles of various size and shapes are also identified as well as some lipid droplets (LD); **J:** enhanced magnification of area delineated by a square in I; the dark arrow point towards a small mitochondria; in the vacuole (V) some cellular debris are detected; **K:** in C26:0 (40 μ M)-treated cells, the cytoplasm is strongly disorganized, numerous vacuoles are present and some of them contain sometimes multilamellar structures evocating myelin figures (MF); **L:** morphological aspects of mitochondria (dark arrows) in C26:0 (40

RESULTATS

μM)-treated cells; mitochondria are smaller than in untreated cells and mitochondrial cristae are hardly distinguishable.

Figure 3: Identification of monodansylcadaverine positive structures in 158N murine oligodendrocytes treated with very long chain fatty acids (C24:0 and C26:0). Sub-confluent murine oligodendrocytes (158N) were cultured in the absence or in the presence of C24:0 and C26:0 (20 μM) for 24 h. C24:0 and C26:0 were diluted in α -cyclodextrine (vehicle: 1 mg/ml). Whereas a slight staining with monodansylcadaverine (MDC) was observed in control (untreated) (A) and vehicle – treated cells (B), MDC positive structures of various sizes, evocating an autophagic process, were observed in the cytoplasm of C24:0 (20 μM) and C26:0 (20 μM) – treated 158N cells (C-D).

Figure 4: Characterization of cell death induced by C24:0 and C26:0 on 158N murine oligodendrocytes. Sub-confluent murine oligodendrocytes 158N cells were cultured in the absence or in the presence of α -cyclodextrin (vehicle: 1 mg/ml), C24:0 and C26:0 (10 and 20 μM) for 24 h. Effects of vehicle, C24:0 and C26:0 on 158N cells were evaluated by: A: fluorescence microscopy after nuclei staining with Hoechst 33342 allowing to distinguish between normal, apoptotic, and necrotic cells, flow cytometric determination of the percentage of TUNEL positive cells (cells with inter-nucleosomal DNA fragmentation), FLICA positive cells (cells containing activated caspases) and caspase-3 positive cells (cells containing activated caspase-3); B: flow cytometric evaluation of FLISP positive cells (cells with activated serine proteases). The values reported are means $\pm$ SD of three independent experiments * $p < 0.05$; comparison between untreated (control) and α -cyclodextrin, C24:0 or C26:0-treated 158N cells.

Figure 5: Effects of very long chain fatty acids (C24:0 and C26:0) on mitochondrial status. Sub-confluent murine oligodendrocytes (158N) were cultured in the absence or in the presence of C24:0 and C26:0 (20 μM) for 24 h. C24:0 and C26:0 were diluted in α -cyclodextrine (vehicle: 1 mg/ml). A: flow cytometric evaluation of transmembrane mitochondrial potential measured after staining with Rh123. Data shown are mean $\pm$ SD from three separate experiments performed in triplicate. Significance of the difference between control and vehicle, C24:0 or C26:0 (Mann Whitney test; * $P < 0.05$ or less). B: impact of

RESULTATS

C24:0 and C26:0 on mitochondrial repartition evaluated by staining with an antibody raised against cytochrome c.

Figure 6: Effects of very long chain fatty acids (C24:0 and C26:0) on lysosomal status.

Sub-confluent murine oligodendrocytes (158N) were cultured in the absence or in the presence of C24:0 and C26:0 (5, 10, 20 μ M) for 24 h. C24:0 and C26:0 were diluted in α -cyclodextrine (vehicle: 1 mg/ml). **A:** flow cytometric evaluation of lysosomal membrane integrity by staining with acridine orange (AO); **B:** evaluation by fluorescence microscopy of the number, repartition, and size of lysosomes after staining with acridine orange (AO) or LysoTracker Red (LysoTracker), or after immunofluorescence staining with an anti-LAMP1 (lysosomal associated membrane protein 1) primary antibody.

Figure 7: Effects of very long chain fatty acids (C24:0 and C26:0) on intracellular pH and calcium level.

Sub-confluent murine oligodendrocytes (158N) were cultured in the absence or in the presence of C24:0 and C26:0 (5, 10, 20 μ M) for 24 h. C24:0 and C26:0 were diluted in α -cyclodextrine (vehicle: 1 mg/ml). **A:** cells were loaded with BCECF allowing to measure intracellular pH value. At T0, very long chain fatty acids (VLCFA: C24:0 or C26:0) or α -cyclodextrine (vehicle) were introduced in the culture medium and variation of intracellular pH was measured every 2 min by video microscopy. **B:** cells were loaded with Fura-2 allowing to measure intracellular Ca^{2+} level. At T0, very long chain fatty acids (VLCFA: C24:0 or C26:0) or α -cyclodextrine (vehicle) were introduced in the culture medium and variation of intracellular Ca^{2+} level was measured every min by video microscopy.

Figure 8: Incidence of Abcd1 silencing on C24:0 and C26:0 - induced cell death.

Murine oligodendrocytes (158N) transfected with scrambled (Scr) siRNA or with Abcd1 siRNA (siRNA Abcd1 (1) or siRNA Abcd1 (2)) were further cultured for 24 h in the absence (control) or in the presence of alpha-cyclodextrine (vehicle: 1 mg/ml) or VLCFA (C24:0 or C26:0: 10, 20 μ M). The percentages of dead cells were determined by flow cytometry after staining with propidium iodide. Data shown are mean $\pm$ SD from one experiment performed in triplicate.

RESULTATS

Figure 9: Incidence of Abcd1 silencing on C24:0 and C26:0 - induced PLP and MBP expression. Murine oligodendrocytes (158N) transfected with scrambled (Scr) siRNA or with Abcd1 siRNA (siRNA Abcd1 (2)) were further cultured for 24 h in the absence (control) or in the presence of alpha-cyclodextrine (vehicle: 1 mg/ml) or VLCFA (C24:0 or C26:0: 5, 10, 20 μ M). The expression of PLP and MBP was determined by flow cytometry. The arrows point towards the curves associated with the expression of PLP or MBP. CC: conjugated control; NT: non transfected; T: transfected with siRNA Abcd1 (2); α : alpha-cyclodextrine (1 mg/ml); Scr: transfected with scramble siRNA. Data shown are the results of one experiment.

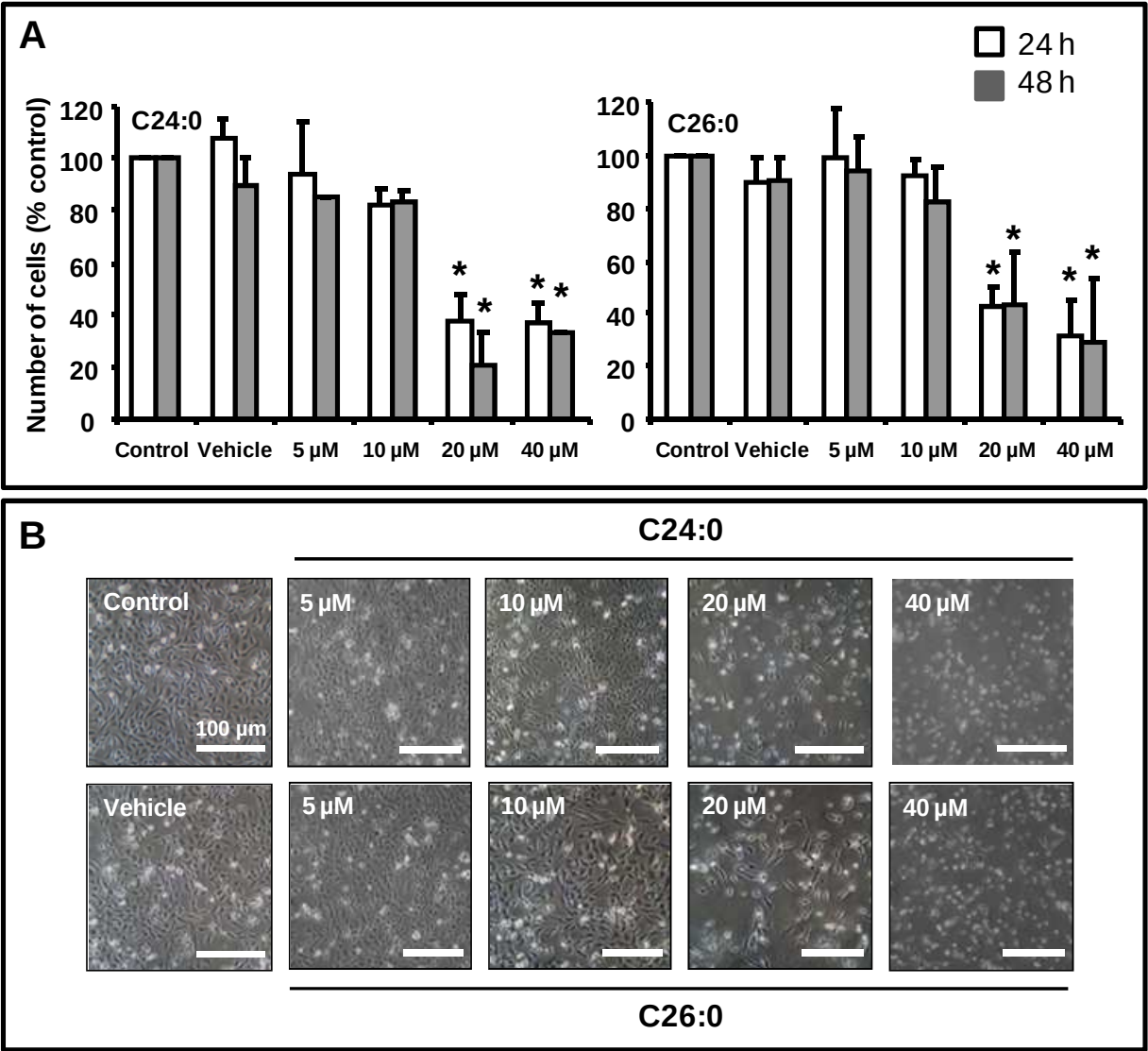


Figure 1: Effects of very long chain fatty acids (C24:0 and C26:0) on cell growth of 158N murine oligodendrocytes.

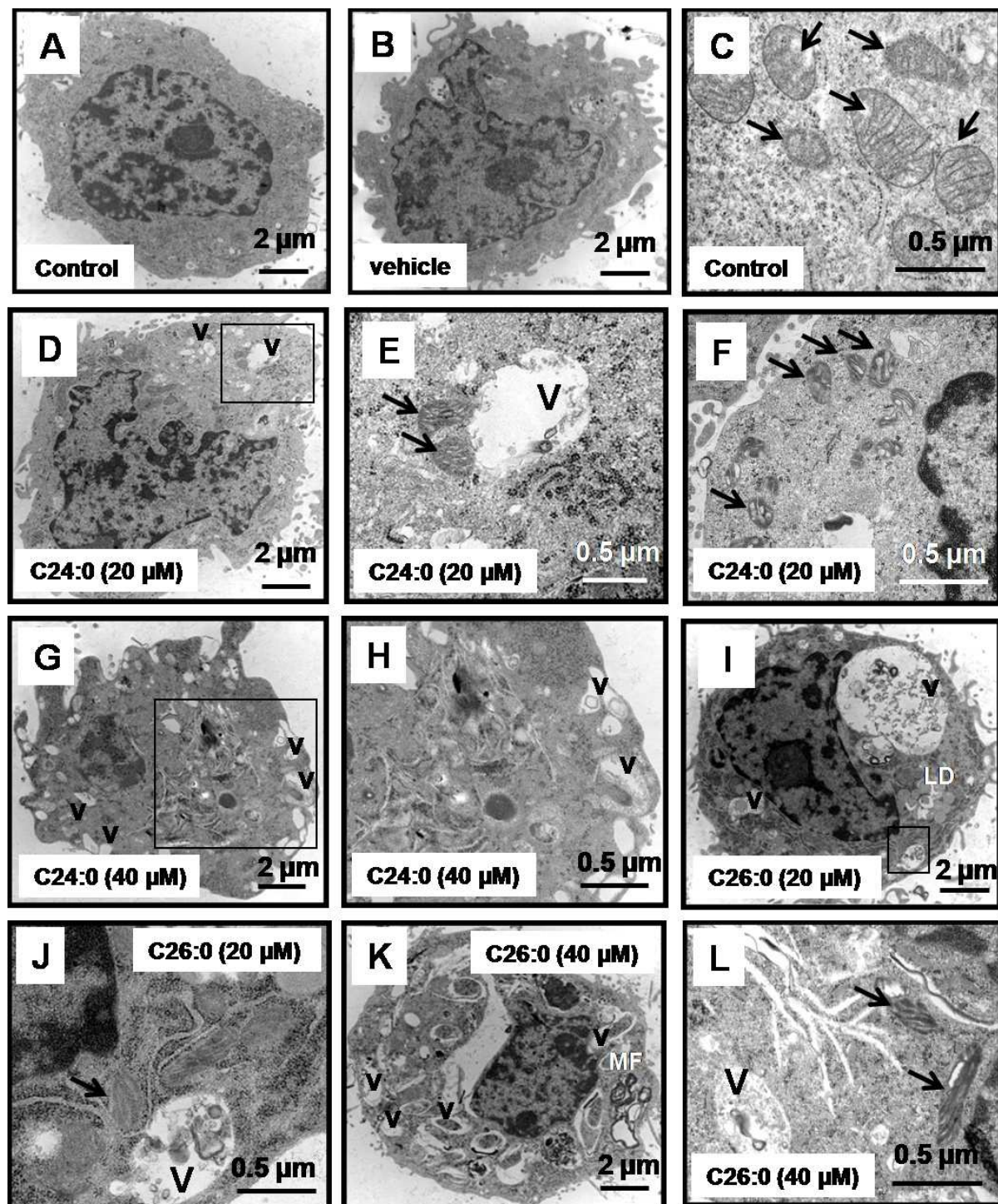


Figure 2: Ultrastructural features of 158N murine oligodendrocytes treated with very long chain fatty acids (C24:0 and C26:0).

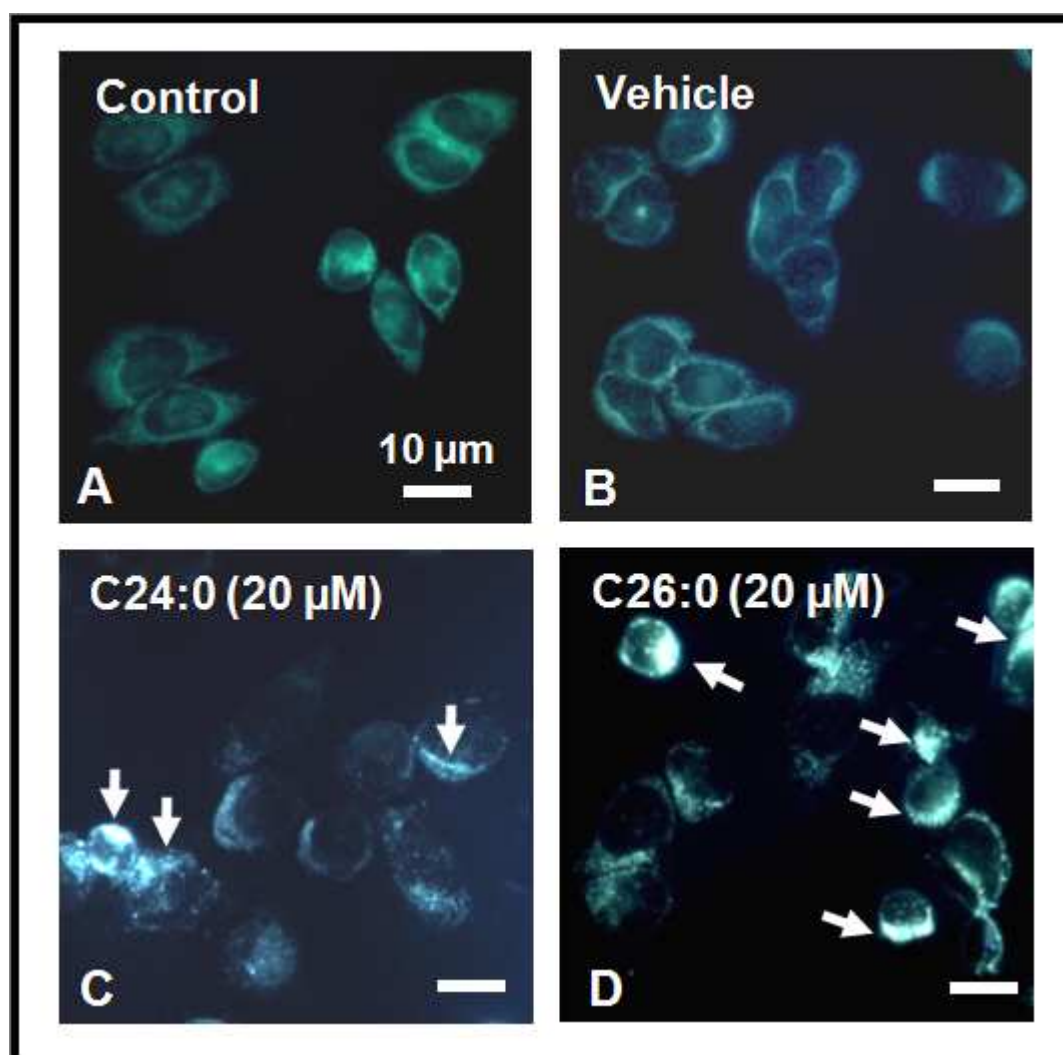


Figure 3: Identification of monodansylcadaverine positive structures in 158N murine oligodendrocytes treated with very long chain fatty acids (C24:0 and C26:0).

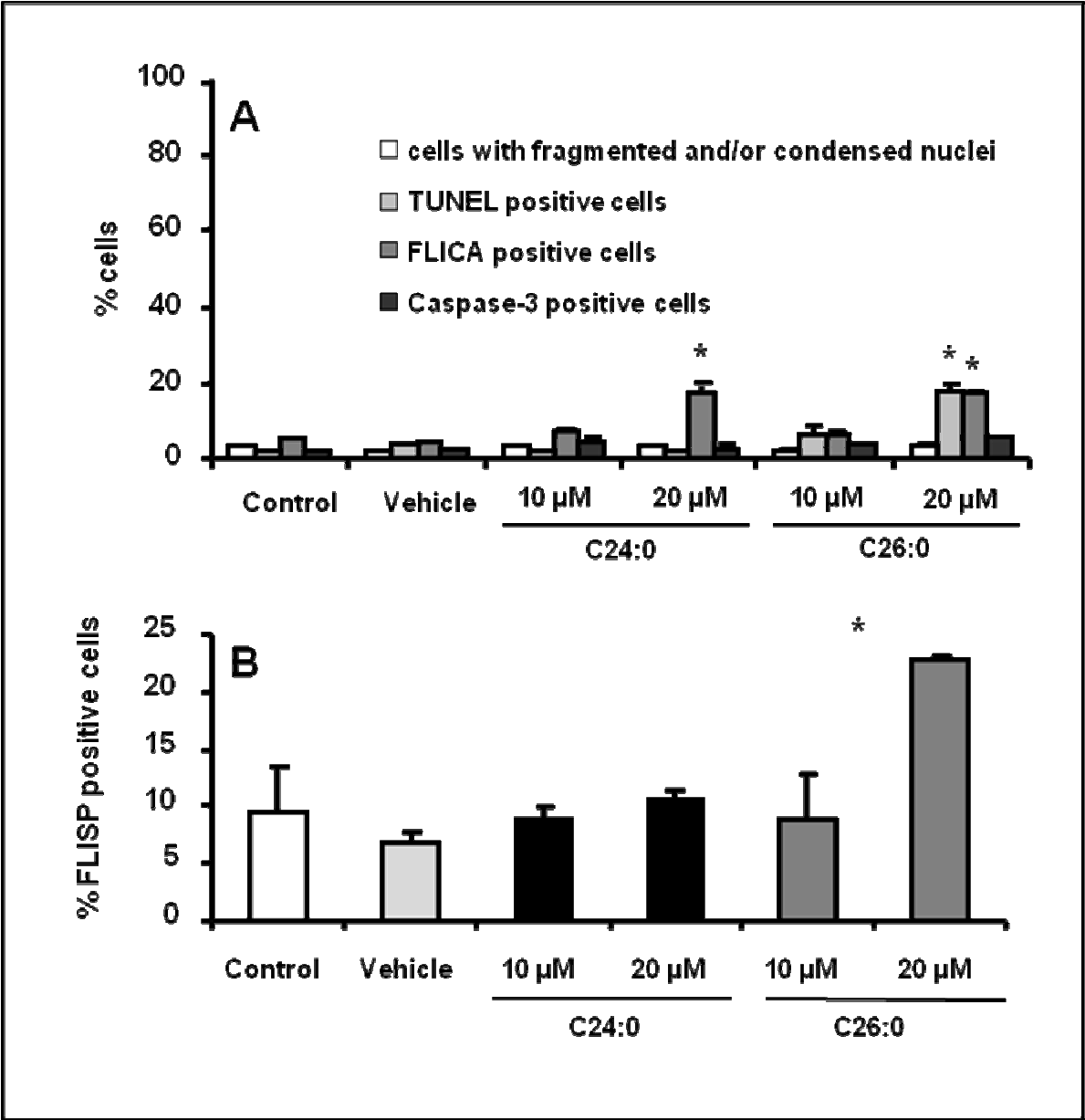


Figure 4: Characterization of cell death induced by C24:0 and C26:0 on 158N murine oligodendrocytes.

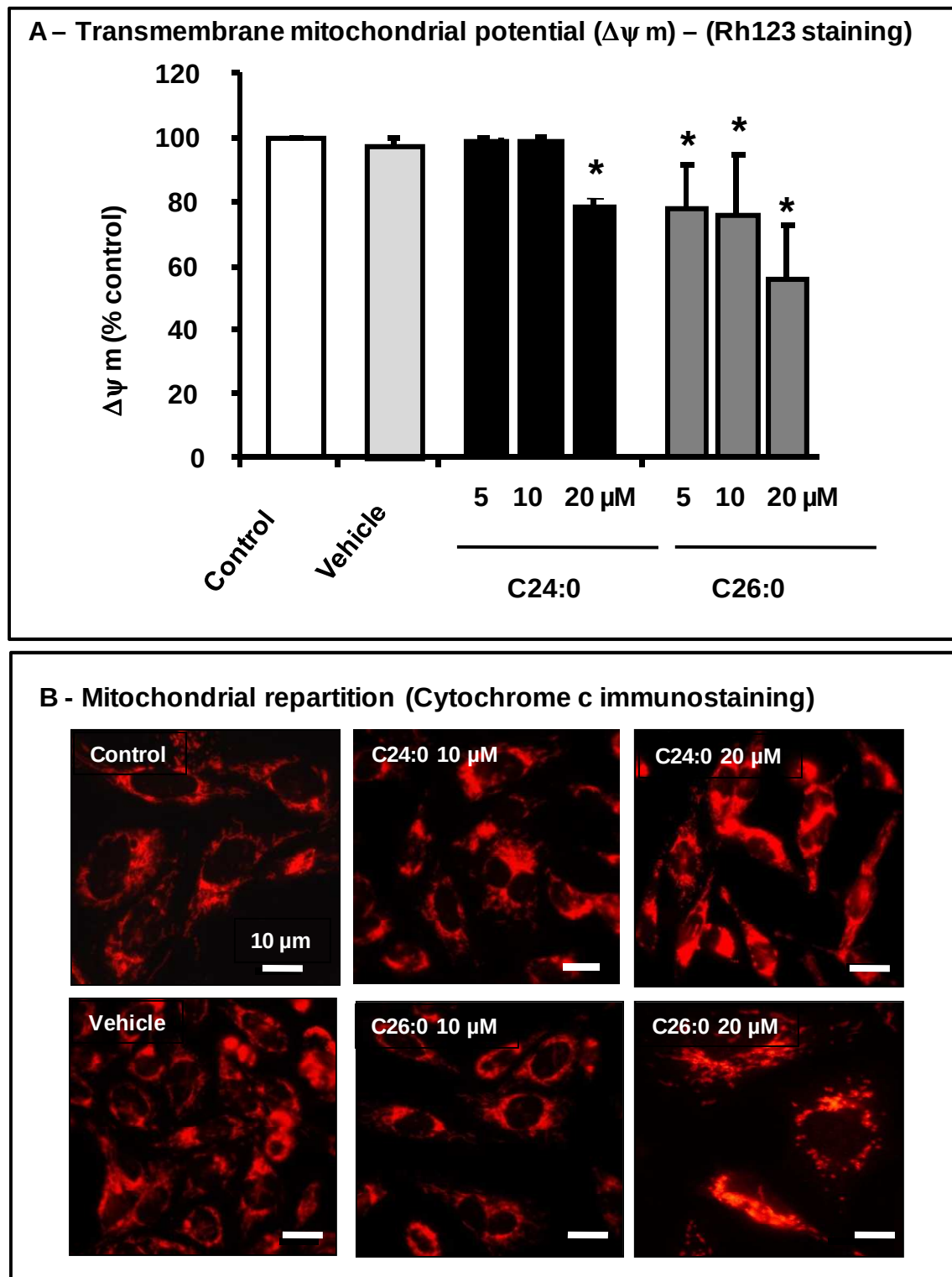


Figure 5: Effects of very long chain fatty acids (C24:0 and C26:0) on mitochondrial status.

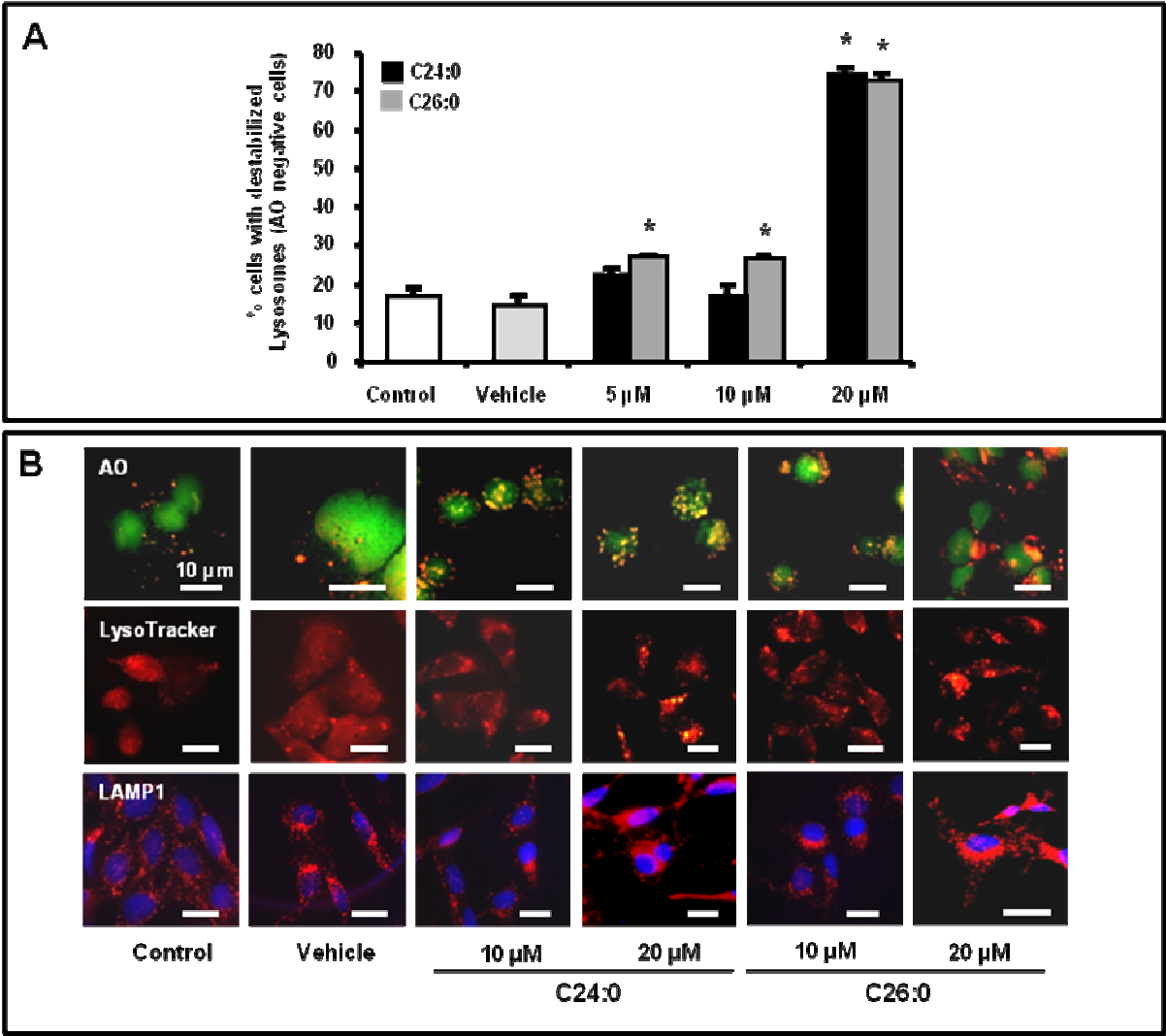


Figure 6: Effects of very long chain fatty acids (C24:0 and C26:0) on lysosomal status.

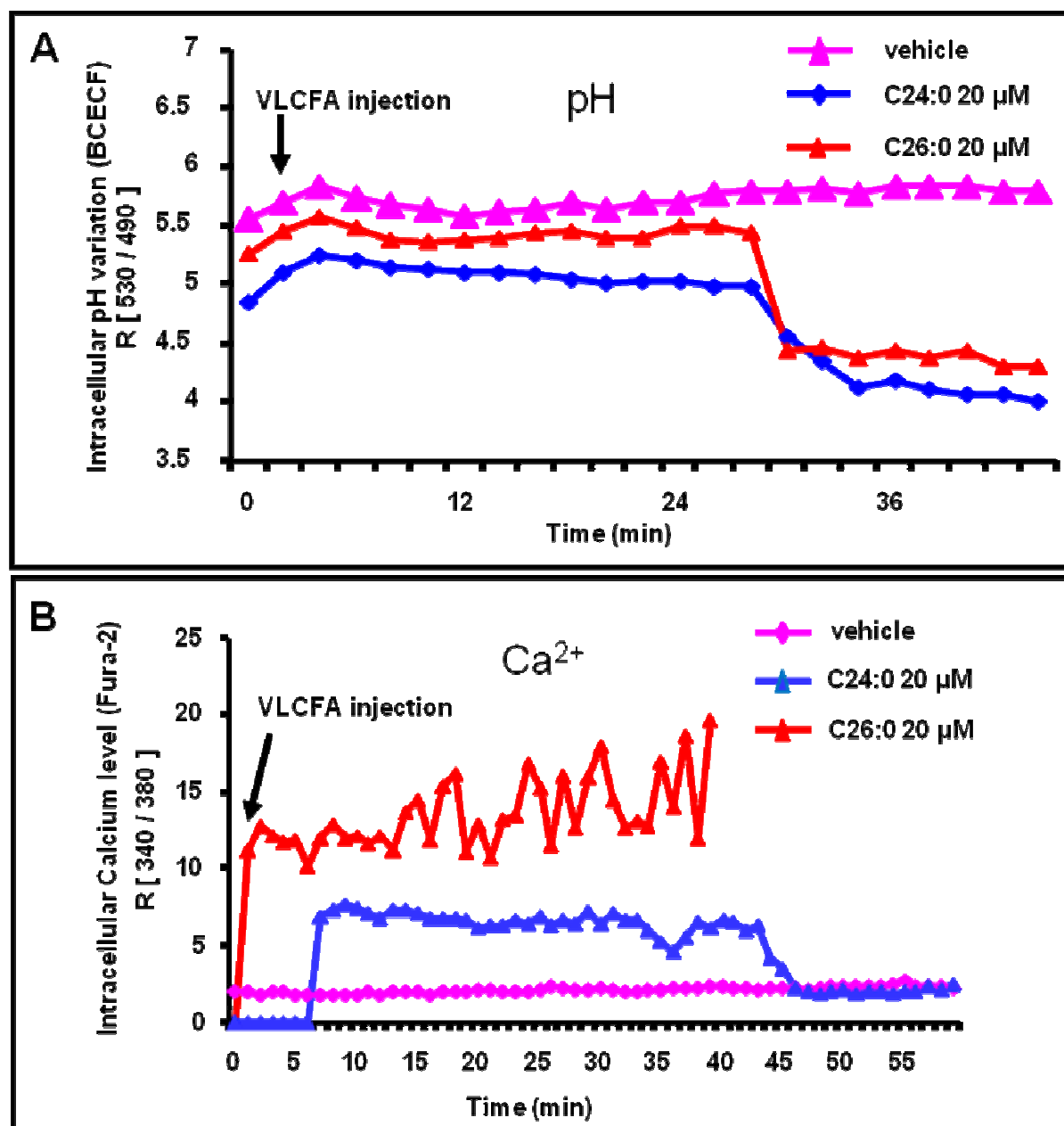


Figure 7: Effects of very long chain fatty acids (C24:0 and C26:0) on intracellular pH and calcium level.

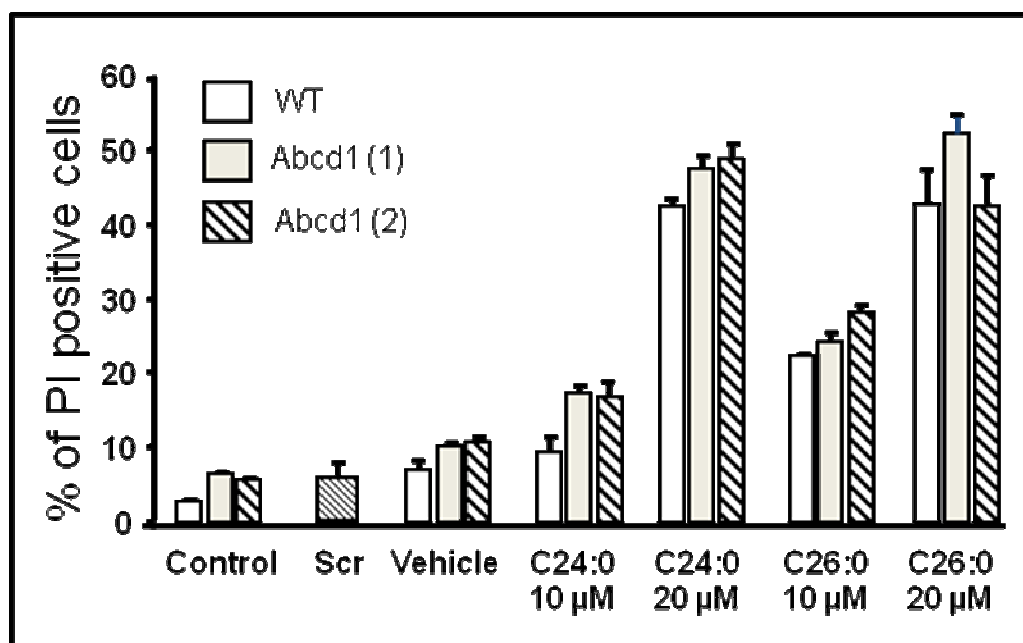


Figure 8: Incidence of Abcd1 silencing on C24:0 and C26:0 - induced cell death.

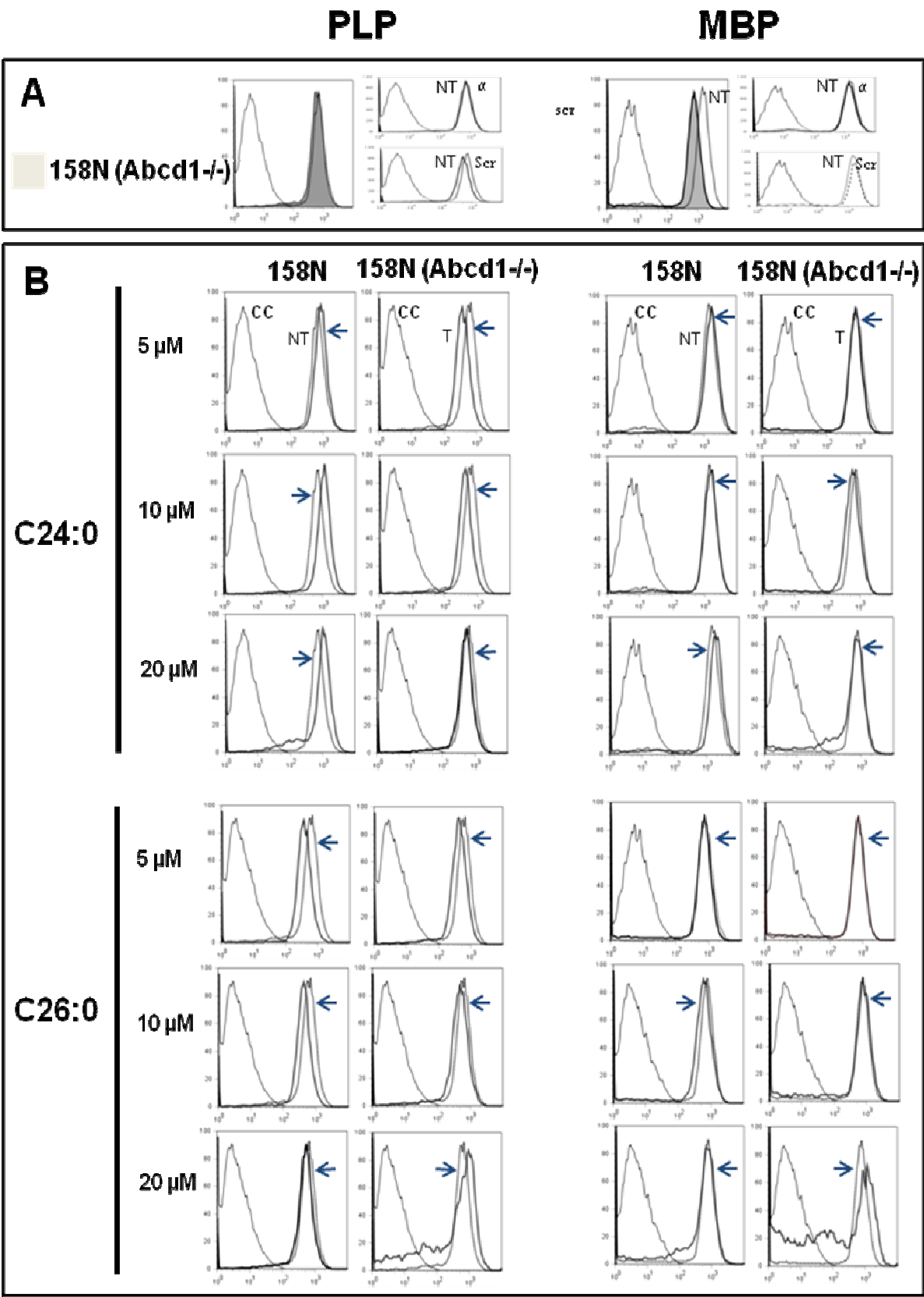


Figure 9: Incidence of Abcd1 silencing on C24:0 and C26:0 - induced PLP and MBP expression

IV Article 4 : Impact of 7-ketocholesterol and very long chain fatty acids on oligodendrocyte lipid membrane organization: evaluation via LAURDAN and FAMIS spectral image analysis.

Soumis à Cytometry Part A

Edmond Kahn, **Mauhamad Baarine**, Aurélien Dauphin, Kévin Ragot, Nicolas Tissot, Alix Seguin, Franck Ménétrier, Zilal Kattan, Claude-Marie Bachelet, Frédérique Frouin, Gérard Lizard

1 Introduction

Les activités pro-oxydantes associées aux AGTLC sur les cellules 158N s'accompagnent d'une augmentation intracellulaire de 7-hydroxycholestérols (7-cétocholestérol, 7bêta-hydroxycholestérol et 7alpha-hydroxycholestérol) (Article 2). Ces oxystérols, et en particulier le 7-cétocholestérol, pourraient modifier les propriétés des membranes cellulaires en entrant en compétition avec le cholestérol ([Wang et al., 2004](#)). Par ailleurs, au cours de la mort cellulaire induite par les AGTLC, les images de microscopie électronique à transmission ont montré l'accumulation dans le cytoplasme de gouttelettes lipidiques (constituées de lipides neutres) et de structures multilamellaires (constituées majoritairement de phospholipides) dans les oligodendrocytes 158N (Article 3). La lipotoxicité induite par les AGTLC pourrait donc s'accompagner de modifications lipidiques intracellulaires.

En raison de ces observations, nous avons cherché à savoir si la toxicité des AGTLC pouvait aussi s'accompagner de modifications des caractéristiques lipidiques membranaires. Pour cela la fluidité membranaire (ou microviscosité membranaire) a été évaluée par coloration à la mérocyanine 540 (MC540) ([McEvoy et al., 1988](#)). La coloration au LAURDAN a aussi été utilisée car elle permet d'évaluer la désorganisation de la bicouche lipidique et, en particulier, celle concernant les radeaux lipidiques d'où partent de nombreux signaux cellulaires ([Bagatolli, 2006](#)).

Dans ce quatrième article, sur des cellules 158N traitées par des AGTLC (C24:0 et C26:0), la mort cellulaire induite a aussi été caractérisée en faisant appel à différentes méthodes de microscopie (microscopie à fluorescence, microscopie électronique) et de cytométrie en flux :

RESULTATS

il s'agit d'une mort cellulaire non apoptotique évoquant la nécrose. A la concentration cytotoxique de 20 μ M, les effets des AGTLC sur les lipides membranaires ont été caractérisés.

A cette concentration, une augmentation de la fluidité membranaire a été révélée avec la MC540 indiquant une désorganisation de la bicouche lipidique.

En revanche avec le LAURDAN (émettant une fluorescence bleue dans une phase lipidique organisée qui se déplace dans le vert lorsque la phase lipidique est désorganisée), seule une fluorescence bleue a été détectée par microscopie confocale monophotonique et biphotonique. En revanche, avec le 7-cétocholestérol connu pour déstabiliser la bicouche lipidique et pour se substituer au cholestérol dans les radeaux lipidiques ([Royer et al., 2009](#)), un important déplacement de l'émission de fluorescence du LAURDAN dans le vert a été identifié.

Les résultats obtenus sur les oligodendrocytes murins 158N montrent que le C24:0 et le C26:0 augmentent la fluidité membranaire sans toutefois induire de modifications structurales de la membrane cytoplasmique. Toutefois, *in vivo*, les AGTLC pourraient induire indirectement des modifications structurales membranaires *via* les produits d'oxydation du cholestérol, comme le 7-cétocholestérol qui est l'un des produits d'oxydation majeur du cholestérol.

RESULTATS

Impact of 7-ketocholesterol and very long chain fatty acids on oligodendrocyte lipid membrane organization: evaluation via LAURDAN and FAMIS spectral image analysis.

Edmond Kahn^{1*}, Mauhamad Baarine², Aurélien Dauphin³, Kévin Ragot², Nicolas Tissot³, Alix Seguin², Franck Ménétrier⁴, Zilal Kattan², Claude-Marie Bachelet³, Frédérique Frouin¹, Gérard Lizard^{2*}

1 - INSERM U678/UMR-S UPMC, IFR 14, CHU Pitié-Salpêtrière, 75634 Paris Cedex 13, France,

2 - Centre de Recherche INSERM U866, Equipe Biochimie Métabolique et Nutritionnelle - Université de Bourgogne, Faculté des Sciences Gabriel, 6 Bd Gabriel, 21000 Dijon, France

3 - Plateforme d'Imagerie cellulaire, UPMC, 75634 Paris Cedex 13, France,

4 - INRA, UMR Centre des Sciences du Goût et de l'Alimentation (CSGA), Equipe Développement et dynamique des préférences et du comportement alimentaire, 21065 Dijon Cedex, France

Runing title : Lipid membrane organization during 7-ketocholesterol and VLCFA induced cell death in oligodendrocytes

Address correspondence to: Dr Edmond Kahn, INSERM U678/UMR-S UPMC, CHU Pitié-Salpêtrière, 75634 Paris Cedex 13, France. (kahn@imed.jussieu.fr) or Dr Gérard Lizard, Centre de Recherche INSERM 866, Faculté des Sciences Gabriel, 6 Bd Gabriel, 21000 Dijon (gerard.lizard@u-bourgogne.fr)

* Edmond Kahn and Gérard Lizard contributed equally.

ABSTRACT

In the context of multiple sclerosis and X-linked adrenoleukodystrophy, 7-ketocholesterol (7KC) and very long chain fatty acids (C24:0, C26:0) are supposed to induce side effects respectively on oligodendrocytes which are myelin (which is a lipoproteic complex) synthesizing cells. The effects of 7KC (25, 50 μ M), C24:0 and C26:0 (10, 20 μ M) on cell viability and lipid membrane organization were investigated on 158N murine oligodendrocytes. Concerning 7KC and fatty acids (at 20 μ M only): 1) cell growth was strongly inhibited; 2) marked induction of cell death was revealed with propidium iodide (PI); 3) no apoptotic cells were found with C24:0 and C26:0 (absence of cells with condensed and/or fragmented nuclei, of FLICA positive cells and of PI negative/SYTO16 negative cells); 4) some apoptotic cells were detected with 7KC. Fatty acids (at 20 μ M only) and 7KC also induced a disorganization of lipid membranes revealed with Merocyanine 540. So, to point out the effects of 7KC (25 μ M), C24:0 and C26:0 (20 μ M) on the lateral organization of lipid membranes, we used LAURDAN, which gives simultaneous information about morphology and phase state of lipid domains: its emission is blue in the ordered lipid phase, green in the disordered lipid phase. To overcome the qualitative filtering settings of blue and green emission colors, data obtained by mono- and bi-photon confocal microscopy were analyzed by spectral analysis. Sequences of emission images were obtained on both mono- and bi-photon confocal microscopes and processed by means of Factor Analysis of Medical Image Sequences (FAMIS), which is a relevant tool to unmix emission spectra and provide pure color images. Only 7KC was capable to induce a green emission with LAURDAN. Thus, at concentrations inducing oligodendrocyte cell death, 7KC (25 μ M) is more efficient than C24:0 and C26:0 (20 μ M), to trigger lateral lipid membrane disorganization.

Key words: 7-ketocholesterol, FAMIS, LAURDAN, very long chain fatty acids, mono- and bi-photon confocal microscopy.

INTRODUCTION

Myelin is a complex of lipids and proteins. Thus, myelin is constituted of about 70% lipids, mainly unesterified cholesterol, phospholipids (such as sphingomyelin and plasmalogen), and glycosphingolipids (particularly galactocerebroside) in molar ratios of about 4:4:2, and 30% proteins especially, proteolipid protein and myelin basic protein (1, 2, 3, 4). In the central nervous system (CNS), the myelin sheath is formed of membranes that extend from oligodendrocytes and that wrap concentrically (up to a hundred times) around nerve fibres of the neurons, thereby insulating them and facilitating rapid transmission of nerve impulses (2). Consequently, alteration of myelin is detrimental to the development and functions of the nervous system.

Because cholesterol is a major component of myelin sheath, and cholesterol oxidation products are well known to exhibit cytotoxic effects towards neurons (5), the concentration of 7-ketocholesterol (7KC), a major cholesterol oxide derivative (6, 7), has been measured in the cerebrospinal fluid (CSF) of patients with multiple sclerosis (MS), and detected in high concentrations (8). Whereas concentrations of KC can vary from one laboratory to another, significant higher levels of 7KC were found in the CSF of patients with MS (8, 9). Thus, in MS, 7KC may play critical parts in demyelination (8, 9).

In peroxisomal disorders, including the disorders of peroxisome biogenesis and the single peroxisomal enzyme deficiencies (10, 11), patients display more or less rapidly myelin abnormalities in the CNS (12), and it has been demonstrated that peroxisomes from oligodendrocytes are necessary to the preservation of axonal integrity and to the formation and maintenance of myelin (13). Peroxisomes are single cell membrane organelles present in nearly all eukaryotic cells, and they are essential to some cellular functions such as lipid metabolism (14). These organelles are mainly involved in the β -oxidation process of long-chain fatty acids (LCFA), very-long-chain fatty acids (VLCFA) and branched-chain fatty acids (15). Among peroxisomal disorders, X-linked adrenoleukodystrophy (X-ALD) is the most frequent leukodystrophy and affects either young boys (Cerebral Childhood ALD, CCALD, 40% of the cases) leading to a vegetative state or death, or adults (adrenomyeloneuropathy, AMN, 50% of the cases) (16). X-ALD is caused by mutations in the *ABCD1* gene located in Xq28 (17, 18) encoding a peroxisomal ATP binding cassette (ABC) half-transporter, named adrenoleucodystrophy protein (ALDP), which participates to the entry of VLCFA-CoA into the peroxisome. Consequently, alteration of peroxisomal

RESULTATS

functions in X-ALD patients induces plasmatic and tissular accumulation of VLCFA (C24:0 and C26:0) (19).

In the context of MS and X-ALD, understanding the mechanism of demyelination constitutes a major challenge to further develop efficient treatments and/or improve the quality of life of patients. As oligodendrocytes are myelin synthesizing cells, as lipids are major myelin components, and as 7KC and VLCFAs (C26:0 and C24:0) are environmental factors capable to modify lipid membranes properties (7) and to induce cell death of oligodendrocytes in the brain of patient with MS and X-ALD (8 , 20), the aim of the present investigation was to determine whether, at concentrations inducing cell death on murine oligodendrocyte 158N cells, 7KC and VLCFA (C26:0 and C24:0) were able to induce cellular lipid disorganization evaluated by mono- and bi-photon confocal microscopy after staining with LAURDAN which is reported to be excited with the UV light (360 nm) and emits a blue fluorescence (440 nm) in the ordered lipid phase and a green fluorescence (490 nm) in the disordered lipid phase (21).

To obtain visual information of the physical properties of lipid membranes, LAURDAN was chosen for the following reasons: when it is inserted in lipid membranes, LAURDAN displays unique characteristics compared to other fluorescent probes, namely: (i) it shows a phase-dependent emission spectral shift, *i.e.*, blue in the ordered lipid phase and green in the disordered lipid phase (this effect is attributed to the reorientation of water molecules present at the lipid interface near LAURDAN fluorescent moiety, *i.e.*, water dipolar relaxation process); (ii) it distributes equally into the ordered and disordered like lipid phases; (iii) the electronic transition moment of LAURDAN is aligned parallel to the hydrophobic lipid chains allowing the use of the photo-selection effect in the microscopic images to discriminate qualitatively between different lipid phases; (iv) LAURDAN is negligibly soluble in water. Thus, LAURDAN homogeneous distribution in membranes (even when different lipid phases coexist) and its lipid phase-dependent emission spectral shift offer a great advantage over fluorescent probes (such as DPH, pyrene and parinaric acid) that show preferential partitioning to particular regions of the membrane and whose fluorescence intensities and spectral maxima are generally insensitive to the lipid phase state (22).

Data were obtained by sequences of emission images from mono- and bi-photon confocal microscopes and were processed by means of Factor Analysis of Medical Image Sequences (FAMIS), which has proved to be a relevant tool to unmix emission spectra and provide pure color images. As a result, a green color shift can be observed on 7KC treated-158N cells. C24:0 and C26:0 do not induce a green color shift on damaged-158N cells. These

RESULTATS

results were obtained whatever mono- or bi-photon excitation is used (405 nm and 785 nm, respectively), considering the fact that mono-photon confocal images with the UV light (360 nm) are reported to be difficult to get in good conditions and are usually obtained with the widely available 405 nm light, and that the 785 nm light of the bi-photon confocal microscope provides a better emission signal. Indeed, preliminary experiments were performed (405 nm, 755 nm, 785 nm, 805 nm), leading to the selection of 405 nm and 785 nm excitation lines, respectively.

MATERIALS AND METHODS

Cell Culture and Treatments

Normal murine oligodendrocytes (158N) immortalized with the SV40 large T-antigen derive from Tabby male (Ta/Y) control mice (23, 24). These cells have some characteristics of well differentiated oligodendrocytes (25). They were seeded at 50,000–100,000 cells/cm² either in 75-cm² culture flasks, in Petri dishes (100 mm in diameter), or on glass coverslips in 6 well-microplates and cultured in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) supplemented with 5% (v/v) heat inactivated fetal bovine serum (PANTM Biotech GmbH). Cells were incubated at 37°C in a humidified atmosphere containing 5% CO₂.

The conditions of treatments with 7-ketocholesterol (7KC) and VLCFA (C24:0 and C26:0) were the followings. 7KC, C24:0, and C26:0 were provided by Sigma-Aldrich (L'Isle d'Abeau Chesnes, France). Stock solution of 7KC was prepared at 800 µg/ml (26). Briefly, 800 µg of 7KC were dissolved in 50 µL of absolute ethanol, 950 µL of culture medium were added, and the solution was sonicated. To obtain a 20 or 40 µg/ml final 7KC concentration (25 or 50 µM), 25 or 50 µL of the initial solution was added per ml of culture medium on sub-confluent cells. C24:0 and C26:0 were solubilized in α -cyclodextrin (1 mg/ml) as previously described (27). When treated with 7KC, sub-confluent 158N murine oligodendrocytes were further cultured for 24 or 48 h. When treated with VLCFA, after plating 158N cells in 6 wells plates for 48 h, sub-confluent cells were further treated for 24 to 48 h with different VLCFA concentrations (10, 20 or 40 µM) diluted in HAM's-F10 medium.

Cell counting

After trypsinization with a 0.05% trypsin-0.02% EDTA solution, cells were centrifuged, and resuspended in culture medium. The total number of cells was determined under a light microscope (Axioskop right microscope, Zeiss, Jena, Germany) using a hemocytometer.

RESULTATS

Flow cytometric evaluation of cell viability by staining with propidium iodide

At the end of the incubation times in the absence or in the presence of 7KC (25 or 50 μ M), C24:0, or C26:0 (10 or 20 μ M), 158N cells were stained with propidium iodide (PI), which enters cells with permeable cytoplasmic membrane and stains dead cells only (28). Fluorescence of PI was collected using a 590/10 nm bandpass filter and measured on a logarithmic scale. Flow cytometric analyses were performed on a Galaxy flow cytometer (Partec, Münster, Germany). Ten thousand cells were acquired for each sample. Data were analyzed with FlowMax software (Partec).

Microscopic characterization of nuclear morphology by staining with Hoechst 33342

Nuclear morphology was analyzed after staining with Hoechst 33342 (5 μ g/ml): normal cells were characterized by round and regular nuclei, apoptotic cells by condensed and/or fragmented nuclei, and necrotic cells by nuclei with various sizes and shapes (29). Cell deposits obtained by cytocentrifugation were observed under ultraviolet light by fluorescence microscopy with an Axioskop right microscope (Zeiss). For each sample, 300 cells were examined.

Flow cytometric characterization of cell death by dual staining with SYTO16 and propidium iodide

In order to distinguish between viable, apoptotic, and primary or secondary necrotic cells, dual staining with SYTO16 and propidium iodide (30 , 31) was performed on 158N cells cultured in the absence or in the presence of 7KC (25 or 50 μ M), α -cyclodextrin (1 mg/ml), C24:0 or C26:0 (10 and 20 μ M) for 48 h. At the end of the incubation time, adherent and non-adherent 158N cells were pooled, washed with PBS and 1×10^6 cells were stained with 20 μ M of Syto 16 (Invitrogen) for 30 min at 37°C. After incubation, cells were stained with 5 μ g/ml of propidium iodide (PI). Fluorescence of Syto 16 and PI were collected using a 515/15 nm bandpass filter and a 590/10 nm bandpass filter, respectively, and were measured on a logarithmic scale. Flow cytometric analyses were performed on a Galaxy flow cytometer (Partec). Ten thousand cells were acquired for each sample, and data were analyzed with FlowMax software (Partec).

RESULTATS

***In situ* detection of activated Caspases with Fluorochrome-Labeled Inhibitors of Caspases (FLICA)**

Caspase total activity was measured with fam-VAD-fmk (Trevigen Inc, Gaithersburg, MD, USA) using a specifically dedicated kit according to the manufacturer's procedures. This FLICA reagent was dissolved in DMSO to obtain a 150X concentrated solution. Prior to use, a 30× working solution of fam-VAD-fmk was prepared by diluting the stock solution 1:5 in phosphate buffer saline (PBS). In the present investigation, fam-VAD-fmk working solutions were added to 158N cells cultured for 48 h in 24-well plates in the absence or presence of 7KC (25 or 50 µM), C24:0, or C26:0 (10 or 20 µM) to obtain a 1× final concentration. After 1 h of incubation in the dark in a 5%CO₂/95% air-humidified atmosphere at 37°C, non adherent cells and adherent cells (obtained by trypsinization with a 0.05% trypsin-0.02% EDTA solution) were collected, mixed, and washed twice in 1× wash buffer, resuspended in 1 ml of PBS, and analyzed by flow cytometry. Flow cytometric analyses were performed on a GALAXY flow cytometer (Partec). The green emission of fam-VAD-fmk was collected through a 520/10 nm band pass filter, and measured on a logarithmic scale. Ten thousand cells were acquired for each sample, and data were analyzed with the FlowMax software (Partec).

Staining conditions with LAURDAN

6-lauroyl-2-dimethylaminonaphthalene (LAURDAN) was provided by Invitrogen (Cergy-Pontoise, France). At the end of the incubation time (24 h) in the absence or in the presence of 7KC (25 µM), C24:0 or C26:0 (10 and 20 µM), 158N cells cultured on glass coverslips in 12 well plates were washed twice in PBS and fixed with 4% paraformaldehyde (Sigma-Aldrich) for 24 h at 4°C. Paraformaldehyde was discarded, and cells were washed three times in PBS. Then, cells were stained with LAURDAN (10 µM) for 15 min at 37°C, and washed twice with PBS. The slides were mounted with Dako fluorescent mounting medium (Dako, Copenhagen, Denmark), and stored in dark at 4°C prior to microscopic observations.

Transmission electron microscopy

Transmission electron microscopy was used to visualize the possible ultrastructural modifications induced by 7KC (25 µM for 24 h), VLCFA (C24:0 and C26:0 used at 40 µM for 24 h), and α-cyclodextrin (1 mg/ml for 24 h, used as vehicle to dissolve VLCFA) on 158N murine oligodendrocytes. Briefly, the samples were fixed for 1 h at 4°C in 2.5% (w/v) glutaraldehyde diluted in cacodylate buffer (0.1 M, pH 7.4), washed twice in cacodylate buffer (0.1 M, pH 7.4), post-fixed in 1% (w/v) osmium tetroxide diluted in cacodylate sodium

RESULTATS

(0.1 M, pH 7.4) for 1 h at room temperature in the dark, and rinsed twice in cacodylate buffer (0.1 M, pH 7.4). The preparations were then dehydrated in graded ethanol solutions and embedded in Epon. Ultra-thin sections were cut with a diamond knife on an ultramicrotome, contrasted with uranyl acetate and lead citrate, and examined under an H7500 electron microscope (Hitachi, Tokyo, Japan).

Staining conditions with merocyanine 540

Merocyanine 540 (MC540) (Sigma-Aldrich) is a negatively charged chromophore that binds to the outer leaflet of the cell membrane (32). The loss of asymmetry and altered packing of the membrane enhance MC540 fluorescence (32). MC540 was prepared in absolute ethanol (2 mg/ml) and added to the culture medium at 2.5 µg/ml. After 10 min of incubation at room temperature, cells were analyzed by flow cytometry (33). Flow cytometric analyses were performed on a GALAXY flow cytometer (Partec). The fluorescence of MC540 was collected through a 590/10 nm band pass filter and measured on a logarithmic scale. A total of 10,000 cells was acquired for each sample, and data were analyzed with the FlowMax software (Partec). Data were expressed by the [MC 540 bright cells]/[MC 540 dim cells] ratio.

Characterization of ordered and disordered lipid phase with LAURDAN: fluorescence analysis by mono- and bi-photon Laser Scanning Confocal Microscopy (LSCM)

Mono-photon confocal observations of untreated- and α -cyclodextrin, 7-KC (25 µM), C24:0 and C26:0 (10 and 20 µM)-treated 158N cells were carried out with a LEICA SP2 CLSM (Leica, Wetzlar, Germany) equipped with a 405 nm diode laser line. Images at 0.2 µm (x, y) pixel sizes were obtained for each case in 512 x 512 matrices at magnification x 63 (Plan-Apo, oil immersion, NA 1.4) of LSCM (excitation at 405 nm). Pinhole size was 1.0 Airy unit. Regular acquisitions resulted in band-pass filtered emissions (410-470 nm, 500-536 nm, 590-620 nm), and spectral sequences of 30 images were obtained through 10 nm band-pass filters in the 410-700 nm emission range at increments of 10 nm. The third band-pass filtered emission (590-620 nm) was maintained in the settings as control of a possible red autofluorescence.

Bi-photon confocal observations of untreated- and α -cyclodextrin, 7-KC (25 µM), C24:0 and C26:0 (10 and 20 µM)-treated 158N cells were carried out with a Zeiss LSM 710 NLO (Zeiss, Jena, Germany) equipped with a pulsed tunable laser (700-1060 nm). Images at 0.2 µm (x, y) pixel sizes were obtained for each case in 512 x 512 matrices at magnification x 20 (Plan-

RESULTATS

Apo, water immersion, NA 1.0) of LSCM (excitation at 785 nm). Regular acquisitions resulted in band-pass filtered emissions (443-473 nm, 483-513 nm), and spectral sequences of 33 images obtained through 10 nm band-pass filters in the 393-723 nm emission range at increments of 10 nm.

Image Analysis

Following general factor analysis techniques, FAMIS was developed to process biomedical image sequences (34 , 35). This development specifically required the use of constraints. It had to cope with mixtures of components characterized by their physical behaviors. Linearity and component positivity basic hypothesis were investigated. FAMIS synthesizes image sequences into a reduced number of images called factor images and curves called factor curves (36 , 37). The latter ones estimate individual behaviors in the sequence of images. Factor images correspond to spatial distribution components.

Concerning the use of FAMIS via Pixies (Apteryx, France), pixels in matrices were combined according to 4 x 4 clusters. These clusters were all investigated. Correspondence analysis (38 , 39) was performed on intensity evolution of each cluster. Then oblique analysis with positivity constraints was performed on the results of correspondence analysis (34), requiring positive factor curves and images. Factor images are recomputed in the original sampling by oblique projection, on the factor curves and the estimation is performed in the least-squares sense. Here, the factor curves correspond to the emission spectra of the fluorochromes. Factor images provide images of stained fluorescent structures.

Statistical analysis

Statistical analyses were performed on at least three independent experiments with Prism 5 software, version 5.01 (Prism Software Corporation, Irvine, CA, USA) with the Mann and Whitney test or the Kruskal-Wallis test. Data were considered to be statistically different at a *p*-value of 0.05 or less.

RESULTS

Characterization of the mode of cell death induced by 7-ketocholesterol, C24:0, and C26:0 on 158N murine oligodendrocytes

7KC was used at 20 or 40 µg/ml (25 or 50 µM, respectively), which are concentrations previously known to induce cell death on numerous cell types (40). At these concentrations (25 and 50 µM), a marked inhibition of cell growth was observed with 7KC (50-75 % after 24-48 h of culture, respectively). At 50 µM, high proportions of cells permeable to propidium iodide (PI) and corresponding to dead cells were found (Fig. 1A). By fluorescence microscopy and Hoechst staining, high percentages of cells with fragmented and/or condensed nuclei characteristic of apoptotic cells were observed. High proportions of FLICA positive cells (cells containing active Caspases) were also identified (Fig. 1A). By dual staining with SYTO16 and PI, viable cells were detected as well as some apoptotic and primary and/or secondary necrotic dying cells (Fig. 1B). At 25 µM, data obtained by staining with PI, with FLICA test, and by dual staining with SYTO16 and PI were similar than those obtained at 50 µM (our data not shown). This simultaneous presence of apoptotic and primary and/or secondary necrotic cells under treatment with 7KC is in agreement with data obtained on other cell lines (40).

C24:0 and C26:0 were used at 10 and 20 µM corresponding to the highest concentrations measured in the plasma of patients with peroxisomal leukodystrophies (19) and high proportions of cells permeable to propidium iodide (PI) corresponding to dead cells with damaged cytoplasmic membrane were identified (Fig. 1A). By fluorescence microscopy and Hoechst staining, no apoptotic cells were found (Fig. 1A), and no FLICA positive cells were observed (Fig. 1A). By dual staining with SYTO16 and PI, viable cells as well as cells evocating necrotic cells were mainly revealed (Fig. 1B).

In order to point out the mode of cell death induced by 7KC, C24:0 and C26:0, additional investigations were performed by transmission electron microscopy (Fig. 2). The ultrastructural aspects of 158N cells cultured with α-cyclodextrin (1 mg/ml) (used to dissolve C24:0 and C26:0) were similar than those of untreated cells (Fig. 2A-B). With 7KC (25 µM, 24 h of culture), cells with typical morphology of apoptotic cells (cells with fragmented and/or condensed nuclei) (Fig. 2C) were detected as well as cells evocating necrotic cells (Fig. 2D). In these apoptotic and necrotic cells, numerous vacuoles containing cellular debris were observed (Fig. 2C-D). In C24:0- and C26:0 (20 µM, 24 h of culture)-treated 158N cells, dying cells with numerous cytoplasmic vacuoles of various sizes and shapes containing some cellular debris were often observed (Fig. 2E-F).

Characterization of the effects of 7-ketocholesterol, C24:0 and C26:0 on membrane lipid organization of 158N murine oligodendrocytes with merocyanine 540

On U937 promonocytic leukemia cells, 7KC-induced cell death is associated with some modifications at the cytoplasmic membrane level: a rapid externalization of phosphatidylserine (41), and a disorganization of cytoplasmic membrane lipids shown by flow cytometry after staining with MC540 by the [MC540 bright cells]/[MC540 dim cells] ratio (42). Therefore, in the present study, the effects of 7KC (25 μ M), C26:0 and C24:0 (10 and 20 μ M) and α -cyclodextrin (1 mg/ml), used as vehicle to dissolve fatty acids, were investigated on sub-confluent 158N murine oligodendrocytes after 24 h of treatment. In these conditions, a disorganization of cytoplasmic membrane lipids (revealed by flow cytometry after staining with MC540 by the [MC540 bright cells]/[MC540 dim cells] ratio) was also observed under treatment with 7KC as well as with C24:0 and C26:0 only when they were used at 20 μ M (Fig. 3). Altogether, these observations lead us to point out the effects of 7KC, C24:0 and C26:0 on the lateral organization of cytoplasmic membrane lipid domains by using LAURDAN and various techniques of confocal microscopy.

Laser scanning confocal microscopic analysis of untreated and 7-ketocholesterol-, C24:0 or C26:0-treated 158N murine oligodendrocytes stained with LAURDAN

As characteristics of cell death observed with 7KC were similar at 25 and 50 μ M, the investigations performed with LAURDAN to point out the effects of this compound on membrane lipid organization were only performed at 25 μ M. C24:0 and C26:0 were only used at 20 μ M allowing to induce cell death of 158N cells. Therefore, the effect of 7KC, C24:0 and C26:0 on lipid membrane organization evaluated with LAURDAN were only analyzed at a concentration inducing cell death. The advantages of LAURDAN to study lipid-lipid interactions and consequently lateral organization of cytoplasmic membrane lipid domains using fluorescence experiments are well established (21). From the characteristics of this probe, the phase-dependent emission spectral shift, i.e., LAURDAN emission is blue (440 nm) in the ordered lipid phase and green (490 nm) in the disordered lipid phase, encouraged us to use various fluorescence microscopic methods to obtain images of cells exposed to 7KC (25 μ M), C24:0 and C26:0 (20 μ M) which are concentrations inducing cell death of 158N murine oligodendrocytes as soon as 24 h of treatment. Indeed, under treatment with these different compounds of 158N cells, it is important to quantify the possible color shift together with the side effects of these molecules in order to anticipate the possible consequences on

RESULTATS

myelin compaction. As mono-photon confocal images with the UV light are reported to be difficult to get in good conditions and usually obtained with the widely available 405 nm light, we decided to use bi-photon excitation to circumvent this problem and verify the pertinence of such a statement. To overcome the qualitative filtering settings corresponding to the characterization of the blue and green colors, we decided also to use spectral analysis (43). As such, sequences of emission images were obtained on both mono- and bi-photon confocal microscopes and processed by means of FAMIS, which has proved to be a relevant tool to unmix emission spectra and provide pure color images.

1) Untreated 158N cells

In the case of spectral observations of untreated cells in which emissions are collected through band-pass filters then processed before interpretation, the excitations at 405 nm (mono-photon confocal microscope) and 785 nm (bi-photon confocal microscope) were performed and emission was collected in the regular mode (410-470 nm, 500-536 nm, 590-620 nm), (443-473 nm, 483-513 nm) respectively (Fig 4A, C), and the spectral mode in 10 nm filters from blue to red (415 => 695 nm), (393 => 713 nm) respectively. The resulting spectral sequences were investigated by means of FAMIS. A blue emission (445, 448 nm) corresponding to LAURDAN is visualized in the factor images (Fig. 4B, D). No green color shift is observed.

2) 7-ketocholesterol-treated 158N cells

In the case of spectral observations of 7KC (25 μ M)-treated cells in which emissions are collected through band-pass filters then processed before interpretation, the excitation at 405 nm and 785 nm was performed and emission was collected in the regular mode (410-470 nm, 500-536 nm, 590-620 nm), (443-473 nm, 483-513 nm) respectively (Fig. 5A, C), and the spectral mode in 10 nm filters from blue to red (415 => 695 nm), (393 => 713 nm) respectively. The resulting spectral sequences were investigated by means of FAMIS. A green emission (485, 488 nm) corresponding to LAURDAN is visualized in the first factor image and a blue emission (445, 448 nm) is visualized in the second factor image (Fig. 5B, D).

3) α -cyclodextrin, C24:0 or C26:0-treated 158N cells

In the case of spectral observations of α -cyclodextrin (1 mg/ml), C24:0 (20 μ M) or C26:0 (20 μ M)-treated cells in which emissions are collected through band-pass filters then processed before interpretation, the excitation at 785 nm was performed and emission was collected in the regular mode (410-470 nm, 500-536 nm, 590-620 nm), (443-473 nm, 483-513 nm)

RESULTATS

respectively (Fig 6A, C, E, Fig 7A, C, E, respectively), and the spectral mode in 10 nm filters from blue to red (415 => 695 nm), (393 => 713 nm) respectively. When 158N cells were cultured in the presence of α -cyclodextrin only, which is used to dissolve C24:0 and C26:0, spectral observations were performed in similar conditions. The resulting spectral sequences were investigated by means of FAMIS. A blue emission (445, 448 nm) corresponding to LAURDAN is visualized in the factor images (Fig. 6B, D, F Fig7B, D, F, respectively). No green color shift is observed.

DISCUSSION

Multiple sclerosis (MS) and X-linked adrenoleukodystrophy (X-ALD) are neurodegenerative diseases associated with a demyelination of the central nervous system (CNS). In MS increased levels of 7KC were identified in the cerebrospinal fluid of patients (8, 9), and some apoptotic dying cells were identified in brain lesions (44). In X-ALD, increased levels of C24:0 and C26:0 were found in the plasma and tissue (including in the brain) of patients (45, 19), and some apoptotic or necrotic cells were identified in brain lesions (46 , 47 , 48). In the CNS, as oligodendrocytes are myelin synthesizing cells (49), the present study was realized on 158N murine oligodendrocytes expressing some characteristics of well differentiated oligodendrocytes (25) in order to characterize the mode of cell death induced by 7KC, C24:0 and C26:0 on mature oligodendrocytes and to point out the simultaneous consequence of the cytotoxic effects of these compounds on lipid membrane organization which can help to anticipate the putative impact of these molecules on myelin which is a complex lipid rich membrane (70% lipids, 30% proteins). Data obtained on 158N murine oligodendrocytes demonstrate that 7KC induces an apoptotic mode of cell death, whereas C24:0 and C26:0 do not. Interestingly, by using LAURDAN, providing information on lateral lipid membrane organization (21, 22), and various methods of confocal microscopy (mono- and bi-photon confocal observations) associated with factor analysis (FAMIS) (34, 36), we report that only 7KC was able to trigger lateral lipid membrane disorganization.

As 7KC is capable to induce apoptosis on microglial cells (8), and on 158N murine oligodendrocytes, our data provide additional evidences that 7KC can contribute to induce neuronal damages, demyelination especially, as it induces apoptosis of oligodendrocytes which are myelin synthesizing cells. Therefore, as 7KC has been found at increased concentrations in the cerebrospinal fluid (CSF) of patients with MS, our investigation support the hypothesis that increased levels of this compound can constitute a potential risk factor in these patients. In addition, in agreement with some observations realized on different types of

RESULTATS

7KC-treated cells, the identification of large vacuoles in 7KC-treated oligodendrocytes suggests that the lysosomes may contribute to 7KC-induced cell death (50, 51). As MS is the most common neurological disease among young adults, the identification of the metabolic pathways associated with 7KC-induced apoptosis on oligodendrocytes may have some interests to develop new therapies allowing to counteract demyelination in patients with MS. Indeed, demyelination of axons affects axonal conduction, and is associated with axonal loss, which results in progressive neurological handicap (52).

With the very long chain fatty acids, C24:0 and C26:0 used at 10 and 20 μ M, a marked induction of cell death was mainly observed at 20 μ M on 158N murine oligodendrocytes. As no cells with condensed and/or fragmented nuclei characteristic of apoptotic cells (29) were observed by staining with Hoechst 33342, as no active caspases were detected by FLICA, and as no apoptotic cells were identified by dual staining with PI and SYTO16, which are reliable methods to identify apoptotic cells (53 30 31), our data support that these fatty acids do not induce apoptosis on 158N murine oligodendrocytes. This variation between the mode of cell death observed in vitro and in vivo can have different origins. In vitro, free fatty may accumulate inside the cells differently than in vivo (27). In addition, the 158N cells used have normal peroxisomal status (25) and are capable to β -oxidize C26:0 and C24:0, whereas X-ALD oligodendrocytes, which are deficient in Abcd1, are unable to β -oxidize these fatty acids (18). Therefore, the part taken by Abcd1 deficiency in the mode of cell death induced by C24:0 and C26:0 cannot be excluded. Moreover, in vivo, additional factors present in the lesions such as inflammatory cytokines, reactive oxygen species, and reactive nitrous species are capable to modulate the type of cell death (54, 55). Be that as it may, and whatever the type of cell death considered, our data support the hypothesis that C24:0 and C26:0-induced cell death of oligodendrocytes may contribute to demyelination in X-ALD associated with high levels of C24:0 and C26:0 in the plasma and in the brain of patients (19, 56).

As myelin, constituted of about 70% lipids, and 30% proteins (1,2, 3 4), is synthesized by oligodendrocytes that wrap the axon of neurons, insulating them and favoring the transmission of the nervous influx, it was also important to point out the impact of 7KC, C24:0 and C26:0 on the lipids of the cytoplasmic membrane of oligodendrocytes, in order to anticipate the effects of these compounds on myelin sheath compaction. In agreement with previous investigations performed on U937 cells treated with 7KC (40), a disorganization of cytoplasmic membrane lipids shown by flow cytometry after staining with MC540 was observed on 158N. With MC540, a disorganization of cytoplasmic membrane lipids was also detected with C24:0 and C26:0. However, as MC540 is not appropriate to characterize the

RESULTATS

lateral organization of cytoplasmic membrane lipid domains and especially membrane microdomains ('rafts') that exist in the ordered lipid phase, additional investigations were performed with LAURDAN to give simultaneous information about morphology and phase state of lipid domains: its emission is blue in the ordered lipid phase, green in the disordered lipid phase (21 22). To this end, mono- and bi-photon confocal observations were made more efficient and specific by using the sequences of images that can be obtained by spectral modes, and were then processed by image analysis. Indeed, factor analysis (FAMIS) makes it possible to differentiate spectral emissions of fluorochromes in a multi-staining system and provide the corresponding images. Indeed, such observations would have been subject to subjective conclusions if regular filtering settings only would have been involved and superimposition of images performed straightforward. Overlapping of blue and possible green emission would have made it difficult to ensure that a color shift had been produced. Therefore, the use of the FAMIS image processing technique, which provides the differentiation of mixed fluorescent emissions from dyes and targets or particles, makes it possible to quantify and have an overview of a possible color shift by means of factor curves and factor images.

In conclusion, our data support that the ability of 7KC, C24:0 and C26:0 to induce cell death of oligodendrocytes may contribute to demyelination in neurodegenerative demyelinating diseases such as MS and X-ALD. Moreover, they bring new evidences that the use of laser scanning confocal microscopy (mono- or bi-photon) and subsequent spectral analysis with FAMIS provides an efficient tool to analyze the color shift of LAURDAN, and therefore to evaluate lipid disorders in cells. Thus, this approach with LAURDAN permitted to establish that at concentrations inducing oligodendrocyte cell death, 7KC was more efficient than C24:0 and C26:0 to trigger lateral lipid membrane disorganization of 158N murine oligodendrocytes, and may consequently have an impact on myelin compaction status.

RESULTATS

LITTERATURE CITED

- 1 - Björkhem I, Meaney S. Brain cholesterol : long secret life behind a barrier. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2004; 24: 806-815.
- 2 - Harauz G, Ishiyama N, Hill C, Bates IR, Libich DS, Farès C. Myelin basic protein-diverse conformational states of an intrinsically unstructured protein and its roles in myelin assembly and multiple sclerosis. *Micron* 2004, 35: 503-542.
- 3 - Taylor CM, Marta CB, ClaycombRJ, Han DK, Rasband MN, Coetzee T, Pfeiffer SE. Proteomic mapping provides powerful insights into functional myelin biology. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004; 101: 4643-4648.
- 4 - Hörster F, Surtees R, Hoffmann GF. Disorders of intermediary metabolism: toxic leukoencephalopathies. *J Inherit Metab Dis* 2005; 28: 345-356.
- 5 - Chang JY, Liu LZ. Neurotoxicity of cholesterol oxides on cultured cerebellar granule cells. *Neurochem Int* 1998, 32: 317-323.
- 6 - Schroepfer GJ. Oxysterols: modulators of cholesterol metabolism and other processes. *Physiol Rev* 2000; 80: 361-554.
- 7 - Vejux A, Lizard G. Cytotoxic effects of oxysterols associated with human diseases: Induction of cell death (apoptosis and/or oncosis), oxidative and inflammatory activities, and phospholipidosis. *Mol Aspects Med.* 2009; 30: 153-170.
- 8 - Diestel A, Aktas O, Hackel D, Hake I, Meier S, Raine CS, Nitsch R, Zipp F, Ullrich O. Activation of microglial poly(ADP-ribose)-polymerase-1 by cholesterol breakdown products during neuroinflammation: a link between demyelination and neuronal damage. *J Exp Med.* 2003; 198: 1729-1740.
- 9 - Leoni V, Lütjohann D, Masterman T. Levels of 7-oxocholesterol in cerebrospinal fluid are more than one thousand times lower than reported in multiple sclerosis. *J Lipid Res.* 2005; 46: 191-195.
- 10 - Depreter M, Espeel M, Roels F. Human peroxisomal disorders. *Microsc Res Tech.* 2003; 61: 203-223.
- 11 - Wanders RJ, Waterham HR. Biochemistry of mammalian peroxisomes revisited. *Annu. Rev. Biochem.* 2006; 75: 295-332.
- 12 - Baes M, Aubourg P. Peroxisomes, myelination, and axonal integrity in the CNS. *Neuroscientist.* 2009; 15: 367-379.

RESULTATS

- 13 - Kassmann C, Lappe-Siefke C, Baes M, Brügger B, Mildner A, Werner HK, Natt O, Michaelis T, Prinz M, Frahm J, Nave KA. Axonal loss and neuroinflammation caused by peroxisome-deficient oligodendrocytes. *Nat. Genet.* 2007; 39: 969-976.
- 14 - Wanders RJ, Waterham HR. Peroxisomal disorders: the single peroxisomal enzyme deficiencies. *Biochim. Biophys. Acta.* 2006; 1763: 1707-1720.
- 15 - Schrader M, Fahimi HD. The peroxisome: still a mysterious organelle. *Histochem Cell Biol.* 2008; 129: 421-440.
- 16 - Aubourg P, Dubois-Dalcq M. X-linked adrenoleukodystrophy enigma: how does the ALD peroxisomal transporter mutation affect CNS glia? *GLIA* 2000; 29: 186-190.
- 17 - Berger J, Gartner J. X-linked adrenoleukodystrophy: Clinical, biochemical and pathogenetic aspects. *Biochim. Biophys. Acta.* 2006; 1763: 1721-1732
- 18 - Kemp S, Wanders RJ. X-linked adrenoleukodystrophy: Very long-chain fatty acid metabolism, ABC half-transporters and the complicated route to treatment. *Mol. Genet. Metab.* 2007; 90:268-276.
- 19 - Takemoto Y, Suzuki Y, Horibe R, Shimozawa N, Wanders RJ, Kondo N. Gas chromatography/mass spectrometry analysis of very long chain fatty acids, docosahexaenoic acid, phytanic acid and plasmalogen for the screening of peroxisomal disorders. *Brain Dev.* 2003; 25: 481-487.
- 20 - Eichler FS, Ren JQ, Cossoy M, Rietsch AM, Nagpal S, Moser AB, Frosch MP, Ransohoff RM. Is microglial apoptosis an early pathogenic change in cerebral X-linked adrenoleukodystrophy? *Ann Neurol.* 2008; 63: 729-742.
- 21 - Bagatolli LA. Direct observation of lipid domains in free standing bilayers: from simple to complex lipid mixtures. *Chem Phys Lipids.* 2003; 122: 137-145.
- 22 - Bagatolli LA. To see or not to see: lateral organization of biological membranes and fluorescence microscopy. *Biochim Biophys Acta.* 2006; 1758: 1541-1556.
- 23 - Feutz AC, Pham-Dinh D, Allinquant B, Mieke M, Ghandour S. An immortalized jimpy oligodendrocyte cell line: defects in cell cycle and cAMP pathway. *GLIA* 2001; 34: 241-252.
- 24 - Ghandour S, Feutz AM, Jalabi W, Taleb O, Bessert D, Cypher M, Carlock L, Skoff RP. Trafficking of PLP/DM20 and cAMP signalling in immortalized jimpy oligodendrocytes. *GLIA* 2002; 40: 300-311.
- 25 - Baarine M, Ragot K, Genin EC, El Hajj H, Trompier D, Andreoletti P, Ghandour MS, Menetrier F, Cherkaoui-Malki M, Savary S, Lizard G. Peroxisomal and mitochondrial status of two murine oligodendrocytic cell lines (158N, 158JP): potential models for the study of

RESULTATS

peroxisomal disorders associated with dysmyelination processes. *J Neurochem.* 2009; 111: 119-131.

26 - Lizard G, Deckert V, Dubrez L, Moisan M, Gambert P, Lagrost L. Induction of apoptosis in endothelial cells treated with cholesterol oxides. *Am J Pathol.* 1996; 148: 1625-1638.

27 - Singh I, Kishimoto Y. Effect of cyclodextrins on the solubilization of lignoceric acid, ceramide, and cerebroside, and on the enzymatic reactions involving these compounds. *J Lipid Res.* 1983; 24: 662-625.

28 - Yeh, CJ., Hsi, BL., Faulk, WP., 1981. Propidium iodide as a nuclear marker in immunofluorescence. II. Use with cellular identification and viability studies. *J Immunol Methods* 1981; 43, 269-275.

29 - Lizard G, Fournel S, Genestier L, Dhedin N, Chaput C, Flacher M, Mutin M, Panaye G, Revillard JP. Kinetics of plasma membrane and mitochondrial alterations in cells undergoing apoptosis. *Cytometry* 1995; 21: 275-283.

30 - Wlodkowic D, Skommer J, Darzynkiewicz Z. SYTO probes in the cytometry of tumor cell death. *Cytometry A* 2008;73:496-507.

31 - Wlodkowic D, Skommer J, Pelkonen J. Towards an understanding of apoptosis detection by SYTO dyes. *Cytometry A* 2007;71:61-72.

32 - Schlegel RA, Stevens M, Lumley-Sapanski K, Williamson P. Altered lipid packing identifies apoptotic cells. *Immunol Lett* 1993; 36: 283-8.

33 - Laakko T, King L, Fraker P. Versatility of merocyanine 540 for the flow cytometric detection of apoptosis in human and murine cells. *J Immunol Methods* 2002; 61: 129-39.

34 - Di Paola R, Bazin JP, Aubry F, Aurengo A, Cavaillolès F, Herry JH, Kahn E. Handling of dynamic sequences in nuclear medicine. *IEEE Trans Nucl Sci* 1982; 29: 1310-1321.

35 - Frouin F, Cinotti L, Benali H, Buvat I, Bazin JP, Millet P, Di Paola R. Extraction of functional volumes from medical dynamic volumetric datasets. *Comp Med Imaging Graph* 1993; 17: 397-404.

36 - Kahn E, Lizard G, Péligrini M, Frouin F, Roignot P, Chardonnet Y, Di Paola R. Four-dimensional factor analysis of confocal images sequences (4D-FAMIS) to detect and characterize low numbers of human papillomavirus DNA by FISH in HeLa and SiHa cells. *J Microscopy* 1999; 193: 227-243.

37 - Kahn E, Frouin F, Souchier C, Bernengo JC, Bruzzoni-Giovanelli H, Clement O, Frija G, Di Paola R, Calvo F, Linares-Cruz G. Confocal multilaser focusing and single-laser characterization of UV excitable stains of cellular preparations. *Cytometry* 2000; 40: 42-49.

38 - Harman HH. Modern factor analysis, Chicago, University of Chicago Press, 1960.

RESULTATS

- 39 - Benzecri JP. L'analyse des données, Tome 2: L'analyse des correspondances. Paris: Dunod, 1973.
- 40 - Vejux A, Guyot S, Montange T, Riedinger JM, Kahn E, Lizard G. Phospholipidosis and down-regulation of the PI3-K/PDK-1/Akt signalling pathway are vitamin E inhibitable events associated with 7-ketocholesterol-induced apoptosis. *J Nutr Biochem*. 2009; 20: 45-61.
- 41 - Kahn E, Lizard G, Frouin F, Bernengo JC, Souchier C, Bessède G, Clément O, Siitari H, Gambert P, Frija G, Todd-Pokropek A. Confocal analysis of phosphatidylserine externalization with the use of biotinylated annexin V revealed with streptavidin-FITC, -europium, -phycoerythrin or -Texas Red in oxysterol-treated apoptotic cells. *Anal Quant Cytol Histol*. 2001; 23: 47-55.
- 42 - Vejux A, Malvitte L, Lizard G. Side effects of oxysterols: cytotoxicity, oxidation, inflammation, and phospholipidosis. *Braz J Med Biol Res*. 2008; 41: 545-556.
- 43 - Kahn E, Hotmar J, Frouin F, Di Paola M, Bazin JP, Di Paola R, Bernheim A. Spectral and dynamic confocal fluorescence characterization of cytogenetic preparations. *Anal Cell Pathol*. 1996; 12: 45-56.
- 44 - Barnett MH, Prineas JW. Relapsing and remitting multiple sclerosis: pathology of the newly forming lesion. *Ann Neurol*. 2004; 55: 458-468.
- 45 - Valianpour F, Selhorst JJ, van Lint LE, van Gennip AH, Wanders RJ, Kemp S. Analysis of very long-chain fatty acids using electrospray ionization mass spectrometry. *Mol Genet Metab*. 2003; 79: 189-196.
- 46 - Ito M, Blumberg BM, Mock DJ, Goodman AD, Moser AB, Moser HW, Smith KD, Powers JM. Potential environmental and host participants in the early white matter lesion of adreno-leukodystrophy: morphologic evidence for CD8 cytotoxic T cells, cytolysis of oligodendrocytes, and CD1-mediated lipid antigen presentation. *J Neuropathol Exp Neurol*. 2001; 60: 1004-1019.
- 47 - Feigenbaum V, Gélot A, Casanova P, Daumas-Duport C, Aubourg P, Dubois-Dalcq M. Apoptosis in the central nervous system of cerebral adrenoleukodystrophy patients. *Neurobiol Dis*. 2000;7(6 Pt B):600-612.
- 48 - Eichler FS, Ren JQ, Cossoy M, Rietsch AM, Nagpal S, Moser AB, Frosch MP, Ransohoff RM. Is microglial apoptosis an early pathogenic change in cerebral X-linked adrenoleukodystrophy? *Ann Neurol*. 2008; 63:729-742.
- 49 - Baumann N, Pham-Dinh D. Biology of oligodendrocyte and myelin in the mammalian central nervous system. *Physiol Rev* 2001; 81: 871-927.

RESULTATS

- 50 - Yuan XM, Li W, Brunk UT, Dalen H, Chang YH, Sevanian A. Lysosomal destabilization during macrophage damage induced by cholesterol oxidation products. *Free Radic Biol Med.* 2000 ; 28: 208-218.
- 51 - Lemaire-Ewing S, Prunet C, Montange T, Vejux A, Berthier A, Bessède G, Corcos L, Gambert P, Néel D, Lizard G. Comparison of the cytotoxic, pro-oxidant and pro-inflammatory characteristics of different oxysterols. *Cell Biol Toxicol.* 2005; 21: 97-114.
- 52 - Lassmann H. 2004. Cellular damage and repair in multiple sclerosis. In : *Myelin biology and disorders* (Ed RA Lazzarini), vol 2, pp 733-762. USA Elsevier.
- 53 - Darzynkiewicz Z, Bedner E, Smolewski P, Lee BW, Johnson GL. Detection of caspases activation in situ by fluorochrome-labeled inhibitors of caspases (FLICA). *Methods Mol Biol.* 2002; 203: 289-299.
- 54 - Paintlia AS, Gilg AG, Khan M, Singh AK, Barbosa E, Singh I. Correlation of very long chain fatty acid accumulation and inflammatory disease progression in childhood X-ALD: implications for potential therapies. *Neurobiol. Dis.* 2003; 14: 425-439.
- 55 - Singh I, Pujol A. Pathomechanisms underlying X-adrenoleukodystrophy: a three-hit hypothesis. *Brain Pathol* 2010; 20: 838-844.
- 56 - Wanders RJ, Ferdinandusse S, Brites P, Kemp S. Peroxisomes, lipid metabolism and lipotoxicity. *Biochim Biophys Acta.* 2010; 1801: 272-280

RESULTATS

FIGURES :

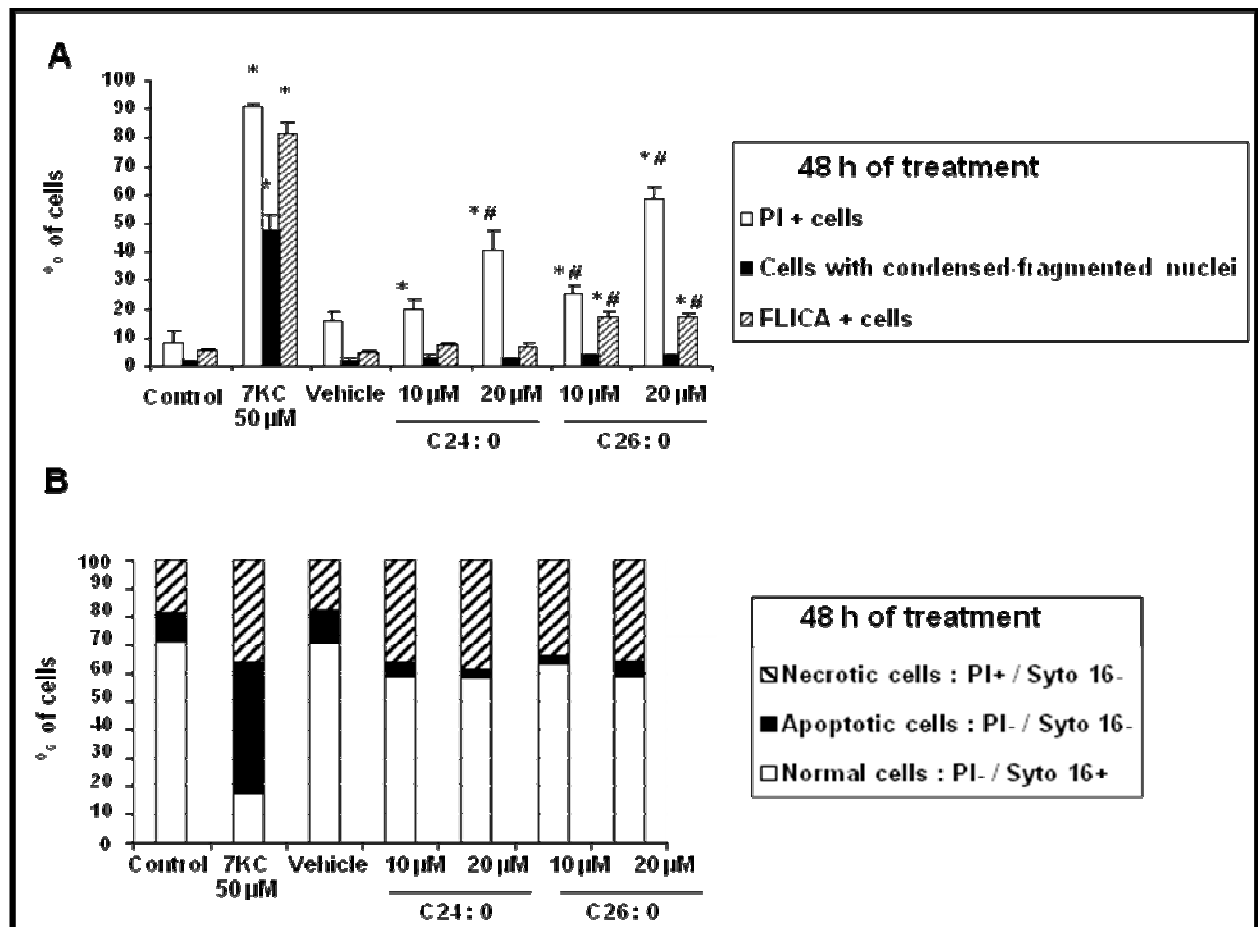


Figure 1: Characterization of cell death induced by 7-ketocholesterol, C24:0 and C26:0 on 158N murine oligodendrocytes. Sub-confluent murine oligodendrocytes 158N cells were cultured in the absence or in the presence of 7-ketocholesterol (7KC, 40 μ g/ml corresponding to 50 μ M) for 48 h, or in the absence or in the presence of α -cyclodextrin (vehicle: 1 mg/ml), C24:0 and C26:0 (10 and 20 μ M) for 48 h. Effects of 7KC, vehicle, C24:0 and C26:0 on 158N cells were evaluated by: (A) flow cytometric quantification of dead cells with propidium iodide (PI), fluorescence microscopy after nuclei staining with Hoechst 33342 allowing to distinguish between normal, apoptotic, and necrotic cells, flow cytometric determination of the percentage of FLICA positive cells (cells containing active caspases); (B) by dual staining with SYTO16 and PI allowing to distinguish between viable cells, apoptotic and secondary and/or primary necrotic dying cells. The values reported are means $\pm$ SD of three independent experiments * $p < 0.05$; comparison between untreated (control) and 7KC, α -cyclodextrin, C24:0 or C26:0-treated 158N cells; # $p < 0.05$; comparison between α -cyclodextrin and 7KC, C24:0 or C26:0-treated 158N cells.

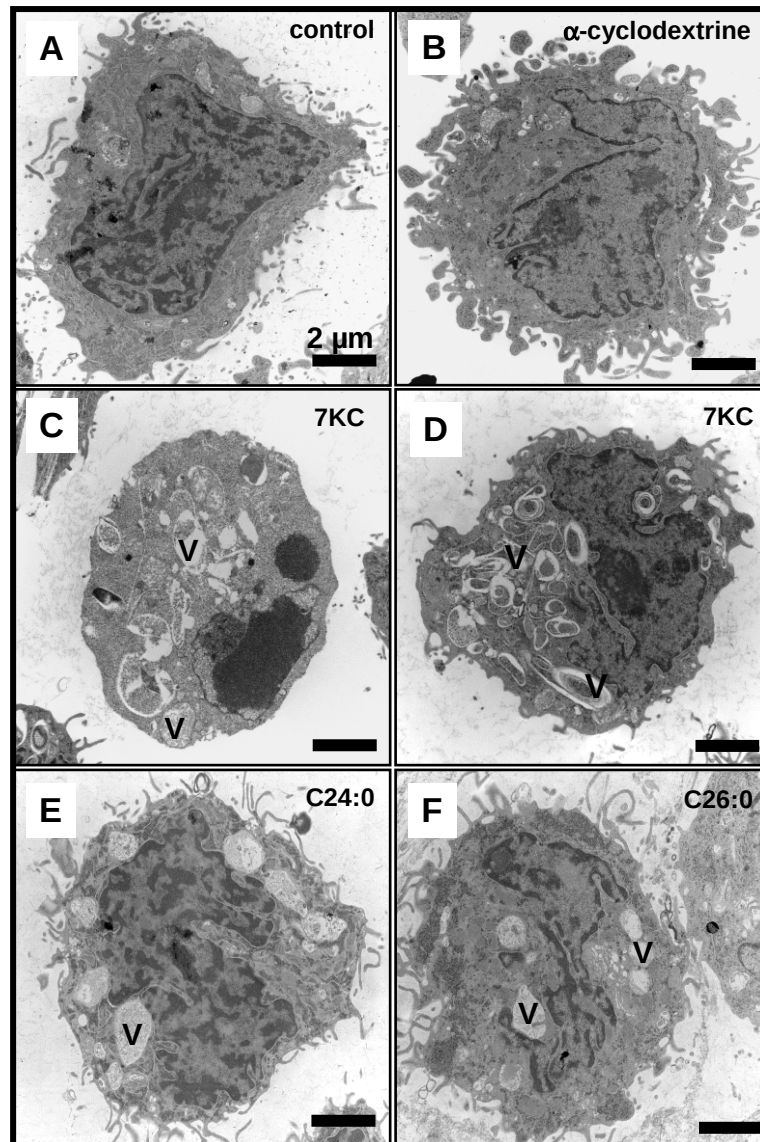


Figure 2: Ultrastructural characteristics of cell death induced by 7-ketocholesterol, C24:0 and C26:0 on 158N murine oligodendrocytes. Transmission electron microscopy of 158N cells cultured for 24 h in the absence (A: control cells) or presence (B) of α -cyclodextrin (1 mg/ml), (C-D) 7KC (25 μ M), (E) C24:0 (20 μ M), or (F) C26:0 (20 μ M). In 7KC-, C24:0- and C26:0-treated cells numerous vacuoles (V) of various sizes and shapes, containing more or less cellular debris, were observed.

RESULTATS

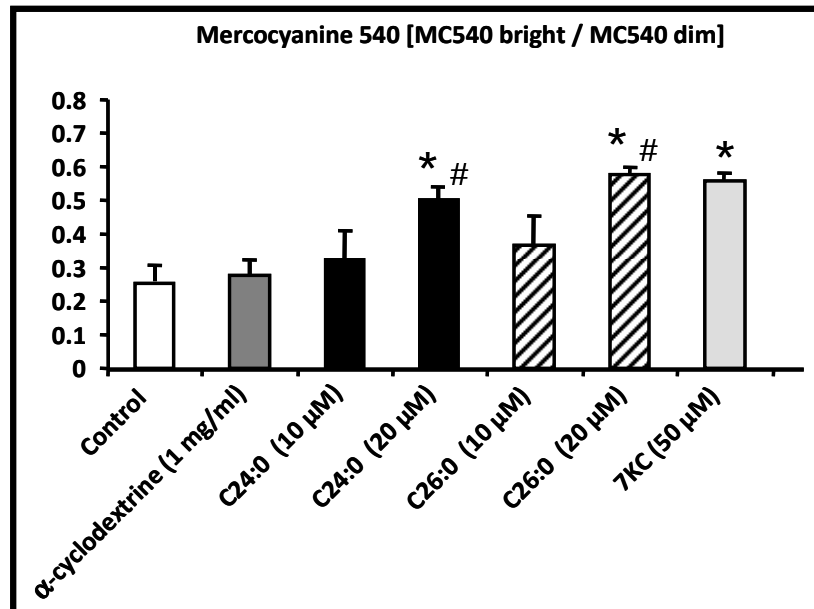


Figure 3: Effects of 7-ketocholesterol, C24:0 and C26:0 on the lipid organization of cytoplasmic membrane of 158N murine oligodendrocytes evaluated with merocyanine 540. Sub-confluent 158N murine oligodendrocytes were cultured for 24 h in the absence or in the presence of 7KC (25 μM), α-cyclodextrin (1 mg/ml), C24:0 or C26:0 (10 or 20 μM). The lipid organization of cytoplasmic membrane was determined by flow cytometry after staining with merocyanine 540 (MC540) by the [MC540 bright cells] / [MC540 dim cells] ratio. Data presented are means ± SD of three independent experiments. * $p < 0.05$; comparison between untreated (control) and 7KC, α-cyclodextrin (vehicle), C24:0 or C26:0-treated 158N cells; # $p < 0.05$; comparison between α-cyclodextrin (vehicle) and 7KC, C24:0 or C26:0-treated 158N cells.

RESULTATS

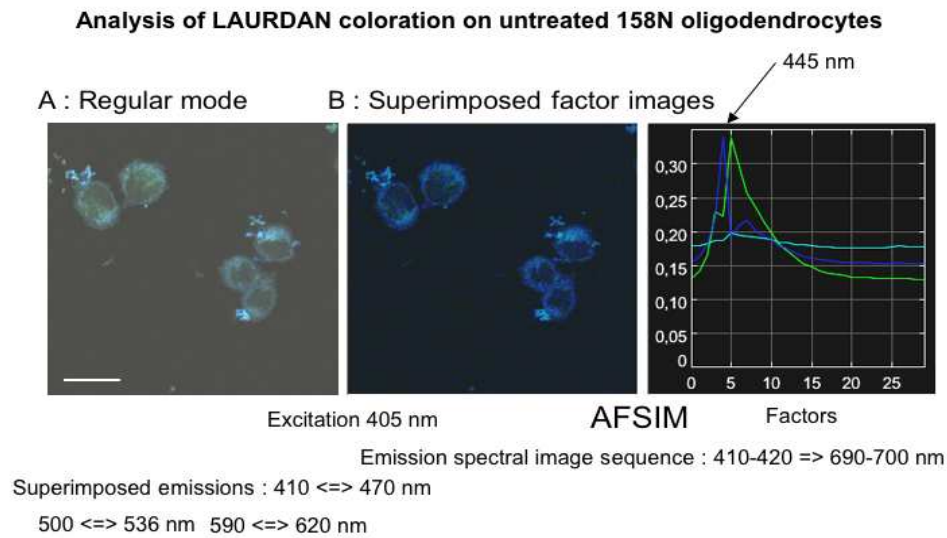


Figure 4 - Kahn et al.

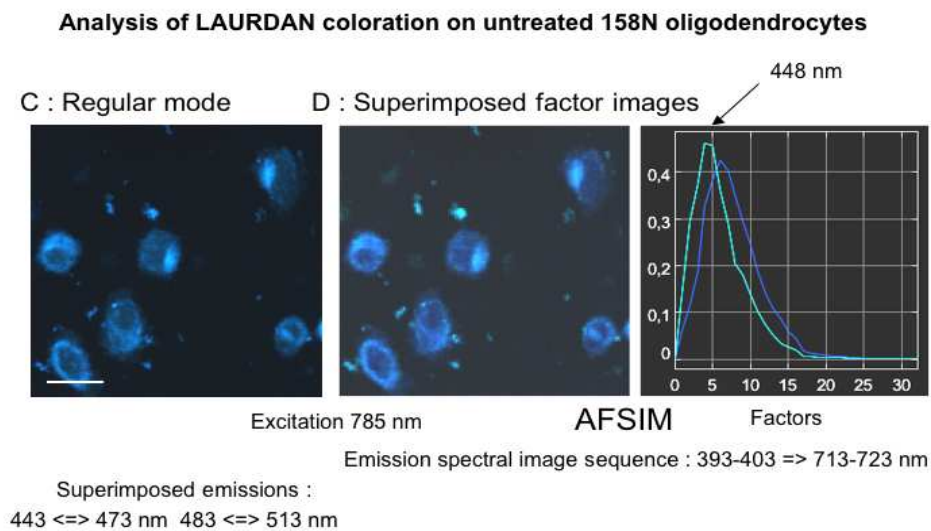


Figure 4 - Kahn et al.

Figure 4: Case of spectral observations of untreated 158N murine oligodendrocytes in which emissions are collected through band-pass filters (pixel size : 0.2 μm , scale bar : 20 μm). Sub-confluent 158N murine oligodendrocytes were used.

A: The excitation is performed at 405 nm (mono-photon confocal microscope), and the emission is collected in the regular mode through band-pass filters (410-470 nm, 500-536 nm, 590-620 nm). A blue emission corresponding to unshifted LAURDAN is visualized.

RESULTATS

B: Use of the spectral mode through 10 nm band-pass filters from blue to red (415 => 695 nm). The resulting spectral sequences are investigated by means of FAMIS. A blue emission (445 nm) corresponding to unshifted LAURDAN is visualized in the first two factors and factor images, which are superimposed in true color.

C: The excitation is performed at 785 nm (bi-photon confocal microscope), and the emission is collected in the regular mode through band-pass filters (443-473 nm, 483-513 nm). A blue emission corresponding to unshifted LAURDAN is visualized.

D: Use of the spectral mode through 10 nm band-pass filters from blue to red (398 => 718 nm). The resulting spectral sequences are investigated by means of FAMIS. A blue emission (448 nm) corresponding to unshifted LAURDAN is visualized in the first two factors and factor images, which are superimposed in true color.

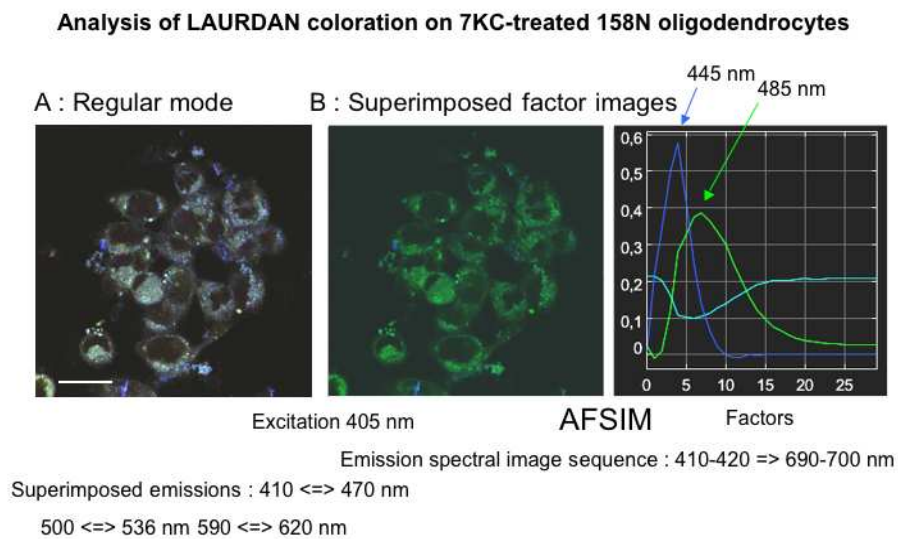


Figure 5 - Kahn et al.

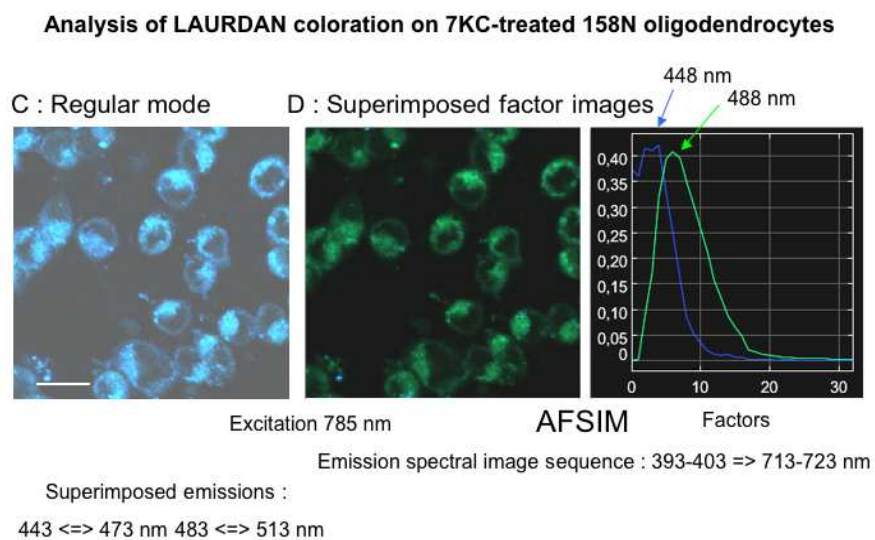


Figure 5 - Kahn et al.

Figure 5: Case of spectral observations of 7KC-treated 158N murine oligodendrocytes in which emissions are collected through band-pass filters (pixel size : 0.2 μm , scale bar : 20 μm). Sub-confluent 158N murine oligodendrocytes were cultured for 24 h in the presence of 7KC (25 μM).

A: The excitation is performed at 405 nm (mono-photon confocal microscope), and the emission is collected in the regular mode through band-pass filters (410-470 nm, 500-536 nm, 590-620 nm). A green emission corresponding to shifted LAURDAN is visualized.

RESULTATS

B: Use of the spectral mode through 10 nm band-pass filters from blue to red (415 => 695 nm). The resulting spectral sequences are investigated by means of FAMIS. A blue emission (445 nm) corresponding to unshifted LAURDAN is visualized in the first factor and factor image. A green emission (485 nm) corresponding to shifted LAURDAN is visualized in the second factor and factor image. They are superimposed in true color.

C: The excitation is performed at 785 nm (bi-photon confocal microscope), and the emission is collected in the regular mode through band-pass filters (443-473 nm, 483-513 nm). A green emission corresponding to shifted LAURDAN is visualized.

D: Use of the spectral mode through 10 nm band-pass filters from blue to red (393 => 713 nm). The resulting spectral sequences are investigated by means of FAMIS. A blue emission (448 nm) corresponding to unshifted LAURDAN is visualized in the first factor and factor image. A green emission (488 nm) corresponding to shifted LAURDAN is visualized in the second factor and factor image. They are superimposed in true color.

RESULTATS

Analysis of LAURDAN coloration on α -cyclodextrin-treated 158N oligodendrocytes

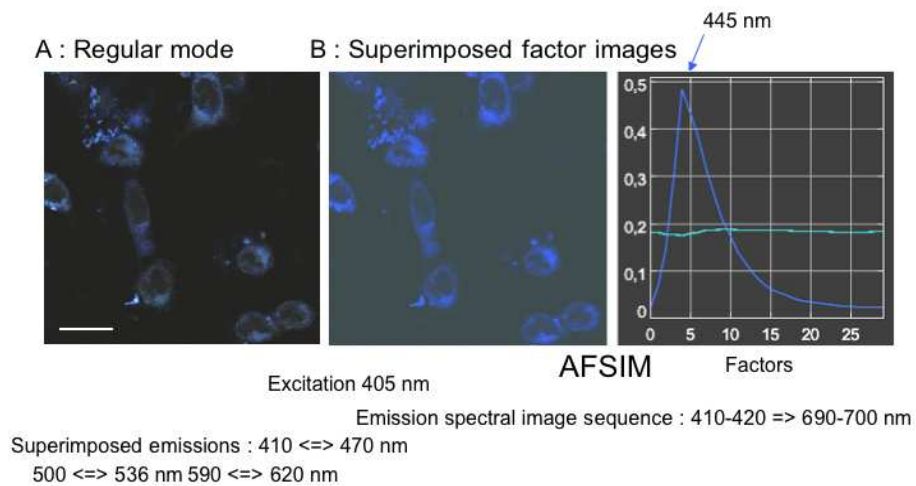


Figure 6 - Kahn et al.

Analysis of LAURDAN coloration on C24:0-treated 158N oligodendrocytes

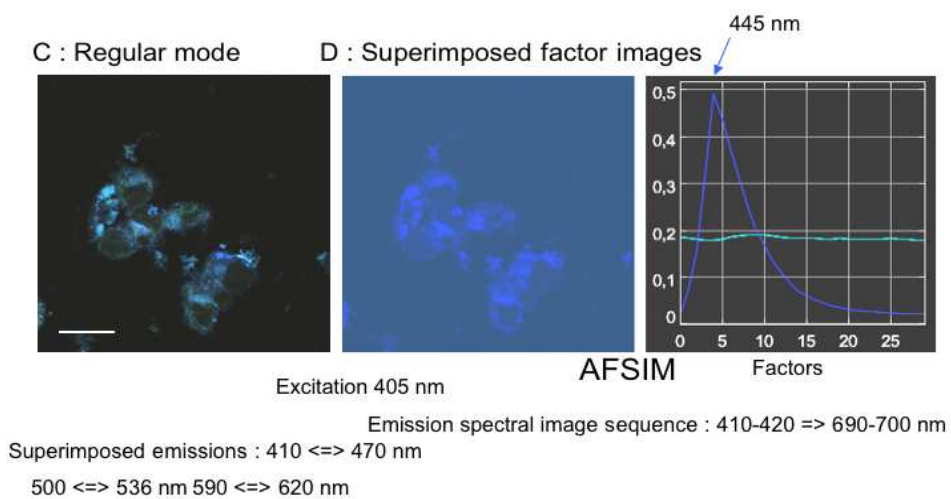


Figure 6 - Kahn et al.

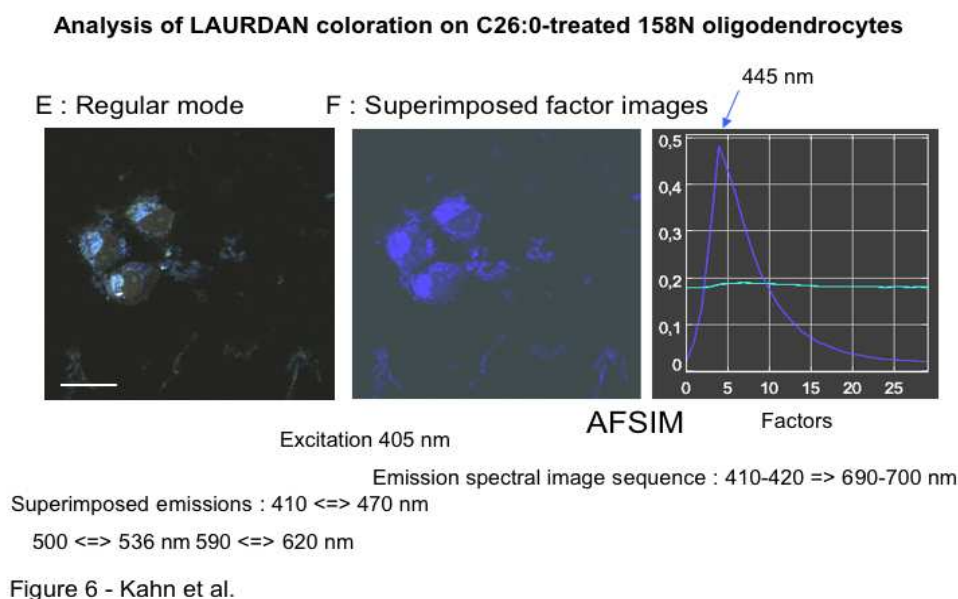


Figure 6: Case of spectral observations of α -cyclodextrin, C24:0 or C26:0 -treated 158N murine oligodendrocytes cells in which emissions are collected through band-pass filters (pixel size : 0.2 μm , scale bar : 20 μm). Sub-confluent 158N murine oligodendrocytes were cultured for 24 h in the presence of α -cyclodextrin (1 mg/ml), C24:0 or C26:0 (20 μM).

A, C, E: The excitation is performed at 405 nm (mono-photon confocal microscope), and the emission is collected in the regular mode through band-pass filters filters (410-470 nm, 500-536 nm, 590-620 nm). No obvious emission corresponding to shifted LAURDAN is visualized.

B, D, F: Use of the spectral mode through 10 nm band-pass filters from blue to red (415 => 695 nm). The resulting spectral sequences are investigated by means of FAMIS. A blue emission (445 nm) corresponding to unshifted LAURDAN is visualized in the first two factors and factor images, which are superimposed in true color. No green emission corresponding to shifted LAURDAN is visualized.

RESULTATS

Analysis of LAURDAN coloration on α -cyclodextrin-treated 158N oligodendrocytes

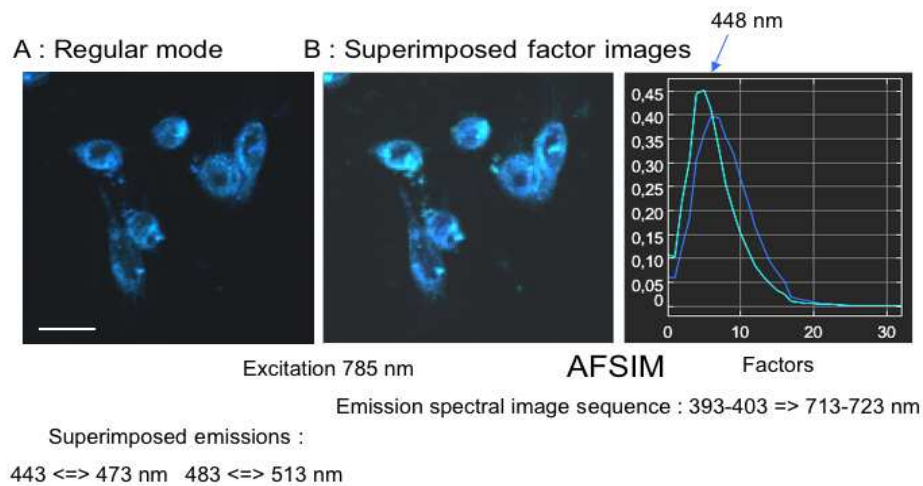


Figure 7 - Kahn et al.

Analysis of LAURDAN coloration on C24:0-treated 158N oligodendrocytes

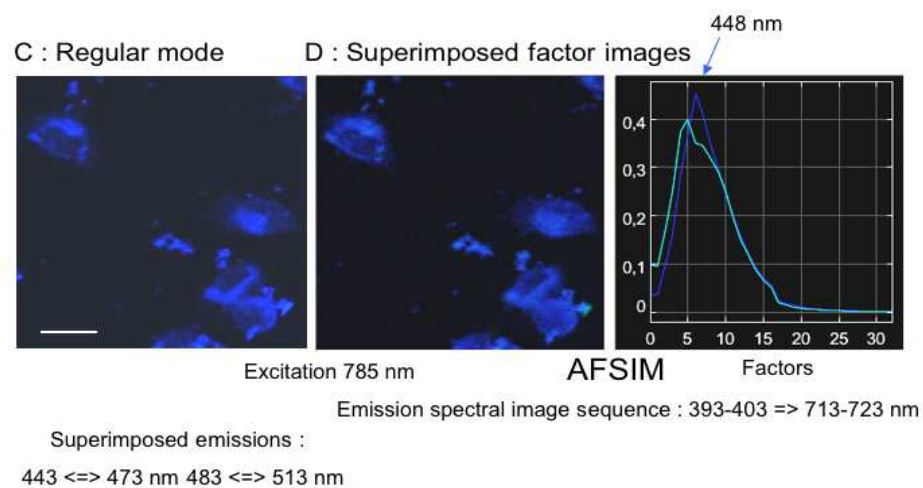


Figure 7 - Kahn et al.

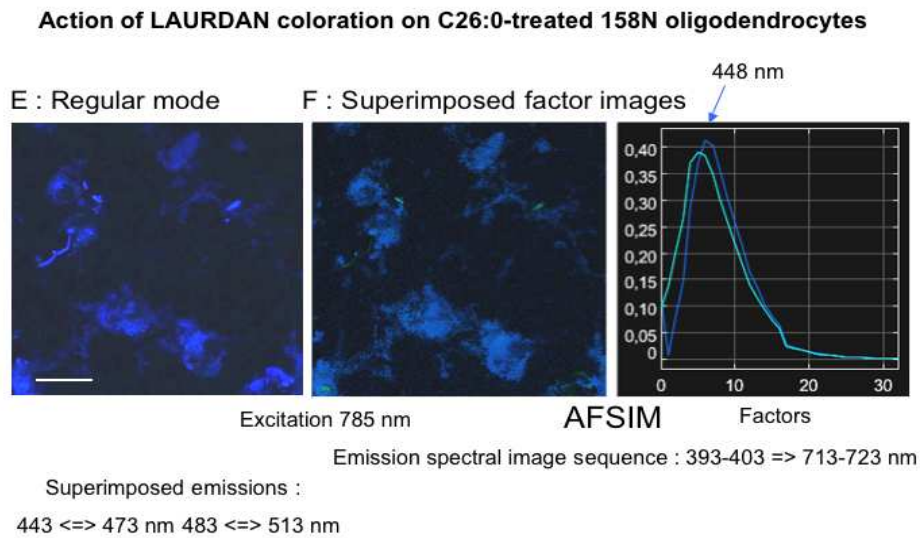


Figure 7 - Kahn et al.

Figure 7: Case of spectral observations of β -cyclodextrin, C24:0 or C26:0 -treated 158N murine oligodendrocytes cells in which emissions are collected through band-pass filters (pixel size : 0.2 μ m, scale bar : 20 μ m). Sub-confluent 158N murine oligodendrocytes were cultured for 24 h in the presence of β -cyclodextrin (1 mg/ml), C24:0 or C26:0 (20 μ M).

A, C, E: The excitation is performed at 785 nm (bi-photon confocal microscope), and the emission is collected in the regular mode through band-pass filters filters (443-473 nm, 483-513 nm). No obvious emission corresponding to shifted LAURDAN is visualized.

B, D, F: Use of the spectral mode through 10 nm band-pass filters from blue to red (393 => 713 nm). The resulting spectral sequences are investigated by means of FAMIS. A blue emission (448 nm) corresponding to unshifted LAURDAN is visualized in the first two factors and factor images, which are superimposed in true color. No green emission corresponding to shifted LAURDAN is visualized.

DISCUSSION

I Modèle cellulaire utilisé

Dans l’X-ALD (OMIM 300100) et la P-NALD (OMIM264470), l’accumulation plasmatique et tissulaire d’AGTLC est une caractéristique biochimique commune à ces deux maladies peroxysomales, métaboliques et neurodégénératives (Kemp & Wanders, 2010; Wanders *et al.*, 2010). Les formes les plus sévères de ces maladies induisent une démyélinisation inflammatoire au niveau du SNC (Wanders *et al.*, 2010). La physiopathologie de ces deux maladies reste peu connue, surtout les relations entre accumulation d’AGTLC, oxydation, inflammation et démyélinisation.

Pour aborder *in vitro* ces différents aspects, il était nécessaire de disposer d’un modèle cellulaire approprié. Nous avons ainsi caractérisé une lignée d’oligodendrocytes murin (158N) initialement décrite pour exprimer plusieurs marqueurs myéliniques qui sont aussi des marqueurs de différenciation terminale des oligodendrocytes (PLP, MBP, MOG, CNPase) (Feutz *et al.*, 2001; Ghandour *et al.*, 2002). La PLP et la MBP sont les deux protéines majeures de la myéline, elles sont impliquées dans la stabilisation et la compaction de la myéline (de Vries & Hoekstra, 2000). La CNPase est associée aux cellules productrices de la myéline dans le SNC, ainsi que dans le SNP (Sprinkle, 1989). La MOG est la protéine de myéline la plus tardivement exprimée; elle est fortement immunogène et constitue un auto-antigène clé dans la sclérose en plaque (Clements *et al.*, 2003). L’expression de ces protéines de myéline indique que la lignée oligodendrocytaire 158N constitue un outil intéressant pour étudier les effets des facteurs intrinsèques et/ou extrinsèques sur la différenciation des oligodendrocytes en relation avec l’expression des protéines majeures de la myéline. Ces cellules présentent donc un intérêt pour aborder certains aspects de la démyélinisation (expression des protéines myéliniques, composition et dynamique lipidique) dans le cadre de différentes maladies neurodégénératives. L’abondance et la fonctionnalité des peroxysomes dans les cellules 158N, l’expression de protéines peroxysomales associées à l’X-ALD (Abcd1, Abcd2) et à la P-NALD (ACOX1), la capacité de moduler l’expression de certaines protéines peroxysomales (Acox1, L-PBE), l’activité de certaines enzymes de la β -oxydation (ACOX1) et de l’enzyme majeure de détoxification peroxysomale (catalase) permettent d’utiliser cette lignée comme modèle pour aborder la physiopathologie de l’X-ALD et de la P-NALD *in vitro* après extinction transitoire (siRNA) ou permanente (shRNA) d’Abcd1 et/ou d’Acox1. Ce modèle n’exclut toutefois pas d’utiliser en complément d’autres approches *in vitro* comme la culture primaire mixte de cellules gliales (oligodendrocytes + astrocytes) avec

DISCUSSION

ou sans neurones et la culture organotypique de tissus nerveux central ou périphérique provenant de souris sauvages ou déficientes en *Abcd1*. En effet, les cultures mixtes ou organotypiques permettront d'aborder les effets des AGTLC sur les différents types de cellules neuronales dans des conditions qui permettront d'étudier plusieurs paramètres; en particulier l'aspect inflammatoire, oxydatif et la part prise par les interactions cellulaires.

II Traitement avec les AGTLC

Pour solubiliser les AGTLC plusieurs moyens ont été testés : solubilisations dans l'éthanol, le DMSO, l'albumine bovine et l'alpha-cyclodextrine. Le traitement des 158N avec les AGTLC solubilisés dans l'éthanol, dans le DMSO et dans l'albumine bovine n'a pas permis d'obtenir des résultats reproductibles car la solubilisation des AGTLC dans le milieu de culture était aléatoire. L'utilisation de l'alpha-cyclodextrine (1 mg/ml final dans le milieu de culture) dans un rapport molaire C24:0 ou C26:0 / alpha-cyclodextrine de 1/50 est optimale pour la solubilisation des AGTLC. Dans ces conditions, l'accumulation des AGTLC dans les 158N a été montrée par CPG/MS. Suite au traitement des 158N avec le C24:0 et le C26:0, la répartition des AGTLC dans les différentes sous classes lipidiques a été mesurée (Article 2, tableau 1).

Le dosage de la quantité de C24:0 dans les 158N après traitement au C24:0 (5, 10 ou 20 μ M) (Article 2, tableau 1) révèle, non seulement, que le C24:0 s'accumule mais également une augmentation de C26:0. L'accumulation de C26:0 suggère que la sur-accumulation de C24:0 pourrait provoquer l'activation de certaines enzymes impliquées dans l'élongation des AGTLC et notamment d'ELOVL1 ([Kemp & Wanders, 2010](#)).

Le dosage de la quantité de C26:0 dans les 158N après traitement au C26:0 (5, 10 ou 20 μ M) (Article 2, tableau 1), met en évidence une accumulation de C26:0, ainsi qu'une augmentation de C24:0. Ceci peut être expliqué par le fait qu'un excès de substrat (C26:0) provoque une activation de la β -oxydation peroxysomale et par conséquent l'accumulation de métabolites intermédiaires de dégradation comme le C24:0.

Une vérification de cette hypothèse nécessiterait 1) une quantification de la β -oxydation peroxysomale suite au traitement avec du C26:0, ainsi que le dosage d'autres métabolites de la β -oxydation peroxysomale du C26:0 comme le C22:0 ; 2) un dosage de l'activité de certaines élongases comme ELOVL1 et ELOVL6.

DISCUSSION

Dans les conditions de solubilisation utilisées et permettant une accumulation des AGTLC, on observe une accumulation dose-dépendante de ces AG sous forme libre. Or *in vivo*, les AGTLC sont essentiellement associés aux phospholipides. Toutefois, dans nos conditions expérimentales, malgré un fort pourcentage d'AGTLC libres, la quantité d'AGTLC associés aux phospholipides et aux stérols neutres (essentiellement cholestérol) est élevée. On ignore aussi dans quelles proportions ces AGTLC sont activés par l'acyl-CoA pour pouvoir être métabolisé par le peroxysome. Actuellement, les effets physiologiques des AGTLC sont inconnus, une interprétation possible serait que les AGTLC puissent moduler plusieurs réponses biologiques (Hardy *et al.*, 1994).

III AGTLC et stress oxydant

Des études *in vitro* et *in vivo* ont mis en évidence que la présence excessive d'ERO et d'ERN est associée à une augmentation de la démyélinisation dans les maladies neuro-inflammatoires comme la sclérose en plaque ou l'encéphalomyélite expérimentale (Molina-holgado *et al.*, 2001; Tran *et al.*, 1997; Danilov *et al.*, 2003), ainsi que dans d'autres maladies neuro-dégénératives comme la sclérose amyotrophique latérale (ou maladie de Charcot) ou la maladie de Parkinson (Rothstein, 2009; Seet *et al.*, 2010). Ces radicaux oxygénés peuvent avoir des effets délétères sur la mémoire et la plasticité synaptique (Massaad & Klann, 2010). Chez les patients atteints d'X-ALD, une augmentation du stress oxydant ainsi qu'une diminution des défenses anti-oxydantes totales ont été rapportées (Vargas *et al.*, 2004; Deon *et al.*, 2007; Uto *et al.*, 2008). L'accumulation de C26:0 induit une surproduction de radicaux libres dans des cellules gliales C6 de rat (Di Biase *et al.*, 2004) et dans des fibroblastes humains sauvages ou déficients en ABCD1 (Fourcade *et al.*, 2008). Ces données suggèrent que les AGTLC peuvent altérer l'homéostasie oxydative *in vivo* et *in vitro*. Il est donc important de déterminer les activités oxydatives des AGTLC sur les oligodendrocytes (sauvages ou déficientes en Abcd1 ou Acox1). Nous avons traité les cellules 158N pendant 24 h avec différentes concentrations de C24:0 et C26:0 (5, 10, 20 μ M), puis nous avons évalué le stress oxydant et ses conséquences. Le C24:0 et le C26:0 induisent la surproduction d'anions superoxydes, de peroxyde d'hydrogène, ainsi que de monoxyde d'azote à partir de 10 μ M. L'extinction transitoire d'Abcd1 et d'Acox1 par siRNA est suffisante pour induire une rupture de l'équilibre RedOx et pour contribuer à l'augmentation de production du stress oxydant. Sur les cellules gliales C6, l'extinction d'Abcd3 par siRNA favorise aussi la production de stress

DISCUSSION

oxydant en agissant indirectement par l'intermédiaire de l'IL-12 (Di benedetto *et al.*, 2008). Les résultats obtenus, en accord avec ceux d'études antérieures, montrent le rôle des VLCFA et l'importance de l'inactivation d'Abcd1 et d'Acox1 dans la stimulation du stress oxydant. Ils confortent l'hypothèse récente du « Three hits hypothesis » proposée par Singh et Pujol selon laquelle le stress oxydant pourrait être à l'origine de la cascade d'évènements conduisant à la démyélinisation inflammatoire (Sing & Pujol, 2010).

En présence des anions superoxydes, le NO interagit avec les anions superoxydes pour donner des peroxynitrites (Gao, 2010) qui réagissent avec les macromolécules biologiques (protéines, lipides et ADN) et induisent des activités neurotoxiques (Lawson *et al.*, 1999; Lorch *et al.*, 2002; Lee & Blair, 2001). Le NO et le peroxynitrite (ONOO⁻) peuvent inhiber les composants de la chaîne respiratoire mitochondriale conduisant éventuellement à un état de carence énergétique cellulaire (Heals *et al.*, 1999). L'augmentation de l'activité SOD, qui transforme les anions superoxydes en H₂O₂, ainsi que la diminution de l'activité catalase et de la quantité de glutathion intracellulaire (leurs activités assurent la réduction de H₂O₂ en H₂O et O₂) peuvent expliquer l'accumulation de H₂O₂ intracellulaire. L'identification d'ERO et d'ERN, ainsi que les modulations d'activité des enzymes anti-oxydantes (catalase, SOD), constituent des arguments en faveur des effets pro-oxydants des AGTLC. Dans les cellules, le GSH élimine le H₂O₂ et maintient le groupe cysteinyl-thiol des protéines à l'état réduit (Mytilineou *et al.*, 2002). Au niveau du SNC, la déplétion des cellules gliales en GSH conduit à un relargage d'acide arachidonique de manière dépendante de la phospholipase A2 (PLA₂). L'activation du métabolisme de l'acide arachidonique par la lipoxygénase génère aussi des ERO (Mytilineou *et al.*, 2002). Par ailleurs, l'accumulation de C26:0 dans des astrocytes murins en culture primaire active la 5-lipoxygénase (5-LOX), et de même dans toutes les zones du cerveau de patients atteints d'X-ALD, la 5-LOX est activée (Khan *et al.*, 2010). Nos résultats confortent les activités pro-oxydantes des AGTLC mises en évidence précédemment sur 1) les fibroblastes humains déficients en ABCD1, 2) les fibroblastes humains sauvages traités avec des AGTLC, 3) la moelle épinière de souris déficientes en Abcd1 (Fourcade *et al.*, 2008), 4) les cellules gliales C6 chargées en C26:0. Ces activités peuvent, au moins en partie, expliquer le stress oxydant révélé chez des patients atteints d'X-ALD (Deon *et al.*, 2007) et des femmes hétérozygotes pour l'X-ALD (Deon *et al.*, 2008).

Le stress oxydant observé pourrait avoir une origine mitochondriale ou extra-mitochondriale. La production d'anions superoxydes révélée par le MitoSox au niveau des mitochondries et la dépolarisation mitochondriale concomitante observée indiquent que les AGTLC provoquent des altérations fonctionnelles de la mitochondrie. Nous avons aussi révélé que l'activité SOD

DISCUSSION

totale (incluant l'activité SOD cytosolique et mitochondriale) est augmentée dans les 158N traitées avec les AGTLC. Des études ont montré que l'activité SOD mitochondriale (Mn SOD ou SOD2) est augmentée dans le cerveau de patients atteints d'X-ALD (Khan *et al.*, 2010) et dans la moelle épinière des souris déficientes en Abcd1 à partir de 3,5 mois (Fourcade *et al.*, 2008), ainsi que chez les souris déficientes en Pex5 (Baugmart *et al.*, 2001). D'autre part, des études ont montré que les AGTLC induisent la production d'ERO par blocage de la chaîne respiratoire mitochondriale suite à un découplage des protéines de la chaîne respiratoire aboutissant à une perturbation du potentiel transmembranaire mitochondrial (Wojtczak & Schonfeld, 1993). Dans leur ensemble, nos résultats, en accord avec ceux de la littérature, suggèrent que les AGTLC peuvent provoquer une déstabilisation fonctionnelle de la mitochondrie avec pour conséquence une stimulation du stress oxydant.

Les sources extra-mitochondriales d'ERO pourraient avoir pour origine 1) l'activation de NADPH oxydase(s) (Dhaunsi *et al.*, 2005; Uto *et al.*, 2008), 2) l'activation de la lipoxigénase (5-LOX) par les AGTLC (Khan *et al.*, 2010).

Nous avons aussi évalué les conséquences de l'induction du stress oxydant par les AGTLC sur les protéines, les lipides et l'ADN. L'accumulation des AGTLC active la peroxydation lipidique, la modification des protéines et la dégradation de l'ADN. La peroxydation lipidique a été révélée par l'accumulation de 4-HNE, de HODEs et de 7- hydroxycholestérols. L'atteinte radicalaire des protéines a été révélée par la carbonylation de ces dernières. Nous avons montré qu'à partir de 10 μ M, le C24:0 et le C26:0 induisent une accumulation significative d'HODEs qui est un marqueur précoce de stress oxydatif (Yoshida & Niki, 2006). Les HODEs peuvent être produits à partir de l'acide linoléique par différentes lipoxigénases (Kawajiri *et al.*, 2002), qui peuvent être activées dans les cellules gliales par accumulation des AGTLC (Khan *et al.*, 2010). Dans le plasma de malades atteints de différentes formes d'X-ALD, nous avons révélé une peroxydation lipidique par la présence de 9- et 13- hydroxy-octadecadiénoate (HODEs) issus de l'oxydation de l'acide linoléique (Yoshida *et al.*, 2005; Yoshida & Niki, 2006) et par la présence de 7-hydroxycholestérols résultant essentiellement de l'auto-oxydation du cholestérol et incluant le 7 α -hydroxycholestérol, le 7 β -hydroxycholestérol et le 7-cétocholestérol (Vejux & Lizard, 2009). Nos résultats indiquent que l'accumulation d'HODEs est plus importante dans le plasma des patients présentant une forme CCALD que chez ceux atteints d'AMN, de maladie d'Addison et enfin d'ACALD. Ceci laisse supposer que le stress oxydant pourrait jouer un rôle important dans l'évolution et/ou la sévérité de la maladie. En accord avec nos résultats, des marqueurs de peroxydation lipidique (TBA-RS ou thiobarbituric acid reactive substances)

DISCUSSION

ont été décrits dans le sérum et les fibroblastes de patients atteints d'X-ALD ([Deon et al., 2007](#); [Vargas et al., 2004](#)). Dans les cerveaux de patients atteints d'X-ALD (CCALD et AMN) l'accumulation de 4-HNE et de MDA conforte l'intervention d'un stress oxydant ([Powers et al., 2005](#)). Le 4-HNE formé peut altérer la fluidité et les fonctions des membranes, dont la composition en AGI module l'oxydabilité ([Britton, 1996](#)). Par ailleurs, l'injection de 4-HNE dans le cerveau de souris endommage les axones montrant une toxicité à la fois pour les neurones et les oligodendrocytes ([McCracken et al., 2000](#)).

Chez les patients atteints de différentes formes d'X-ALD, nos résultats montrent aussi une accumulation accrue de 7-hydroxycholestérols qui pourrait être due, au moins en partie aux taux d'AGTLC augmentés. En effet, *in vitro*, une accumulation dépendante de la dose de 7-hydroxycholestérols a été révélée suite au traitement par le C24:0 ou le C26:0. Nos résultats suggèrent que les 7-hydroxycholestérols et HODEs pourraient être des biomarqueurs plasmatiques associés à l'évolution de l'X-ALD. Néanmoins, dans nos résultats 2 patients présentant une forme CCALD sur 10 n'ont pas montré de signes de peroxydation plasmatique (taux de 7-hydroxycholestérols et HODEs comparables aux témoins). Actuellement, l'accumulation d'oxystérols a été rapportée dans la maladie d'Alzheimer, la sclérose en plaque et la maladie de Huntington ([Diestel A et al., 2003](#); [Garenc et al., 2010](#)). Dans le cas de la sclérose en plaque, un lien indirect entre démyélinisation inflammatoire et mort des cellules neuronales a été décrit. Le 7-cétocholestérol (7KC) accumulé dans le liquide céphalorachidien serait capable d'induire des lésions neuronales *via* l'activation et la migration de la microglie dans le SNC ([Diestel et al., 2003](#)). Chez les souris Nestine-Pex5 KO (absence de peroxysomes fonctionnels dans le SNC), une microgliose qui est un signe de neuro-inflammation a été décrite ([Hulshagen et al., 2008](#)). Comme les oxystérols oxydés en C7 ont des activités inflammatoires ([Vejux & Lizard, 2009](#)), leur éventuelle présence dans le SNC générée sous l'action des AGTLC, pourrait contribuer à la microgliose.

Suite au traitement avec le C24:0 et le C26:0, nous avons constaté une oxydation des protéines ainsi qu'une dégradation de l'ADN. A des concentrations non toxiques des AGTLC, nous avons observé une carbonylation importante des protéines en accord avec les résultats obtenus sur les souris déficientes en *Abcd1* et sur les fibroblastes humains traités avec du C26:0 ([Fourcade et al., 2008](#); [Fourcade et al., 2010](#)). Ces dommages aux protéines chez les souris déficientes en *Abcd1* ont été révélés dès l'âge de 3,5 mois, soit un an avant la première apparition de signes neurologiques ([Fourcade et al., 2008](#)). L'oxydation des protéines au niveau du SNC a été révélée dans d'autres maladies neurodégénératives ([Pamplona et al., 2005](#)). Cela souligne que le stress oxydant affecte différentes macromolécules. Comme les

DISCUSSION

protéines sont impliquées dans différentes activités cellulaires, leurs altérations peuvent avoir des conséquences multiples et prononcées néfastes au bon fonctionnement cellulaire. La dégradation de l'ADN observée sur les cellules 158N traitées par les AGTLC, essentiellement à 20 μ M, serait plutôt une conséquence de la mort cellulaire observée à cette concentration. D'autres approches plus spécifiques, comme la détection de formation de 8-oxoguanine, seraient nécessaires pour aborder l'impact du stress oxydant au niveau de l'ADN.

Dans leur ensemble, les résultats obtenus supportent l'hypothèse que dans l'X-ALD et la P-NALD, le stress oxydant et les molécules qui en sont issues, ainsi que les modifications de macromolécules qui en résultent, pourraient avoir de graves conséquences au niveau du SNC.

IV AGTLC et mort cellulaire

L'incubation des cellules 158N avec 20 μ M de C24:0 et C26:0 provoque une chute drastique de la viabilité cellulaire à 24 h ou 48 h. De plus faibles concentrations (5 et 10 μ M) correspondant à des concentrations plasmatiques d'AGTLC pouvant être observées chez des patients atteints d'X-ALD ou de P-NALD (Moser *et al.*, 1998), n'ont pas ou peu d'effets cytotoxiques (Article 2).

Les effets cytotoxiques associés aux AGTLC sont les suivants : en fonction de la concentration, les AGTLC provoquent une inhibition dose-dépendante de la prolifération. A forte concentration, cette inhibition de prolifération est associée à une induction de mort cellulaire qui a été caractérisée. En effet, trois grands types de mort sont reconnus : la mort de type I ou apoptose, la mort de type II ou autophagie et la mort de type III ou nécrose (Boya & Kroemer, 2008). D'autres types de mort, dérivant de ces trois grands types, ont également été décrits (Kroemer *et al.*, 2009). Dans le cas des AGTLC, nous nous sommes intéressés aux événements précoces et tardifs associés à la mort. Précocement, une importante perturbation des flux calciques intracellulaires a été mise en évidence par vidéomicroscopie. Le traitement par des AGTLC de cellules gliales de rat en culture primaire mixte avec des neurones a aussi montré une augmentation importante du calcium intracellulaire (Heine *et al.*, 2008). Par ailleurs, l'accumulation d'acide pristanique ou d'acide phytanique (substrats peroxysomaux) dans les cellules gliales de rat en culture primaire mixte avec des neurones provoque également une importante perturbation de l'homéostasie calcique intracellulaire (Rönicke *et al.*, 2009). Dans ces deux cas, les oligodendrocytes sont les plus sensibles à l'accumulation d'AG (AGTLC, acide pristanique ou acide phytanique) qui sont des substrats peroxysomaux

DISCUSSION

(Rönicke *et al.*, 2009; Heine *et al.*, 2008). Nos résultats confirment la sensibilité des oligodendrocytes aux AGTLC.

Par ailleurs, l'accumulation d'AGTLC provoque une chute de potentiel transmembranaire mitochondrial (montré par coloration à la Rh123 et JC1) (Article 2 et 3). Cette dépolarisation peut augmenter la perméabilité de la membrane mitochondriale aux protons (Hein *et al.*, 2008). Cet effet résulte soit d'une incorporation directe des AGTLC dans la membrane mitochondriale, soit d'un effet indirect de ces AGTLC *via* des effets antérieurs à d'autres niveaux de la cellule. Par microscopie électronique à transmission, des modifications ultrastructurales de la mitochondrie ont été observées. Nous avons aussi observé une augmentation du nombre de vacuoles. Ces dernières pourraient refléter l'intervention de phénomènes d'autophagie et une déstabilisation des lysosomes. Cette hypothèse a été évaluée en recherchant le rôle des lysosomes dans la mort cellulaire induite par les AGTLC. Les différentes approches utilisées (coloration à l'Acridine Orange, au LysoTracker et analyse de l'expression et de la répartition cellulaire de LAMP1) démontrent une mort cellulaire induite par les AGTLC associée à une déstabilisation lysosomale.

Cette intervention des lysosomes s'accompagne d'une diminution du pH intracellulaire. Cette acidification pourrait contribuer à maintenir actives des enzymes protéolytiques libérées par le lysosome (Repnik & Turk, 2010) et favoriser ainsi le processus de mort cellulaire. Cette hypothèse sera évaluée en utilisant différents inhibiteurs, tels que des inhibiteurs de protéases lysosomales comme les cathepsines par z-FA-fmk (Schotte *et al.*, 2001) et l'inhibiteur de pompes à protons (Esomeprazole) (Vachhani *et al.*, 2009).

Dans leur ensemble, les résultats obtenus sur la toxicité des AGTLC soulignent leurs effets cytotoxiques sur les oligodendrocytes : induction de flux calciques, diminution du pH intracellulaire, dépolarisation des mitochondries, déstabilisation des lysosomes, augmentation de la perméabilité membranaire à l'iodure de propidium.

De plus, l'absence de cellules à noyaux fragmentés et/ou condensés caractéristiques des cellules apoptotiques, de fragmentation internucléosomale de l'ADN et d'activation de caspases, indiquent que la mort cellulaire induite par les AGTLC est indépendante des caspases et non apoptotique. Une induction de mort cellulaire par apoptose étant exclue, nous devront préciser si le type de mort induit par les AGTLC se rattache à de la nécrose ou à de l'autophagie.

Dans nos conditions expérimentales, l'incidence des AGTLC et de l'inactivation d'Abcd1 sur l'expression des protéines majeures de la myéline (PLP, MBP) a aussi été abordée. L'inactivation d'Abcd1 diminue l'expression de MBP mais pas celle de PLP. Les AGTLC

DISCUSSION

n'entraînent pas ou peu de modulation d'expression de PLP et MBP dans les cellules sauvages ou déficientes en Abcd1. Actuellement, une diminution d'expression forte et faible de MBP est observée respectivement sur les souris Nestin-Pex5 et CNPase-Pex5 KO (Kassmann *et al.*, 2007; Hulshagen *et al.*, 2008). Ces observations soulignent l'importance du métabolisme peroxysomal sur la myélinisation et plus particulièrement la relation entre le métabolisme peroxysomal et la synthèse de MBP qui est une des protéines majeures de la myéline.

Les résultats obtenus conduisent à proposer un modèle d'induction de mort cellulaire activée par les AGTLC présenté dans la Figure 30. Il reste à définir le rôle du peroxysome dans la mort cellulaire. Les résultats préliminaires obtenus indiquent que les cellules 158N deviennent plus sensibles aux AGTLC, en particulier à de faibles concentrations, suite à une extinction transitoire d'Abcd1 par siRNA (Article 2).

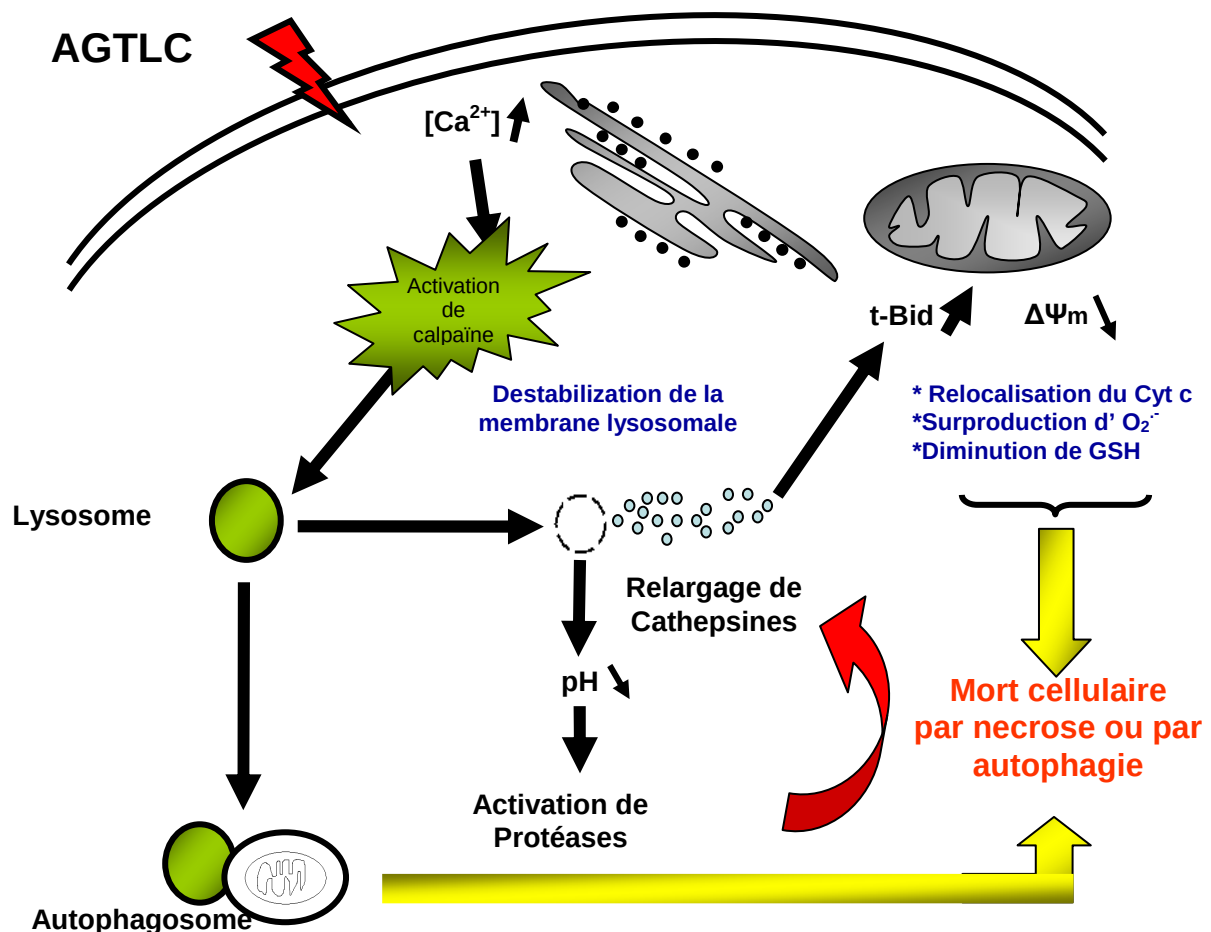


Figure 30 : Modèle proposé pour l'activation de la mort cellulaire oligodendrocytaire par les AGTLC (C24:0 et C26:0).

DISCUSSION

E plus de leurs activités biologiques, les peuvent induire des modifications physico-chimiques au niveau des membranes et en particulier de la membrane cytoplasmique (Knazek *et al.*, 1983; Whitcomb *et al.*, 1988). Ceci a conduit à préciser les effets du C24:0 et du C26:0 sur les caractéristiques physico-chimiques de la membrane cytoplasmique.

V AGTLC et modulation des caractéristiques membranaires

A la concentration induisant une mort cellulaire (20 μ M), les effets des AGTLC (C24:0 et C26:0) sur l'organisation des lipides membranaires des cellules 158N ont été recherchés en utilisant la mérocyanine 540 (MC540) et le LAURDAN. La mérocyanine 540 donne des informations sur la fluidité membranaire: si les lipides membranaires sont bien organisés l'accumulation de MC540 dans la membrane cytoplasmique est faible ; si les lipides membranaires sont désorganisés l'accumulation de MC540 dans la membrane cytoplasmique est forte (McEvoy *et al.*, 1988). La fluorescence qui en résulte peut être mesurée par cytométrie en flux. Le LAURDAN s'accumule dans la membrane cytoplasmique au niveau des radeaux lipidiques (ou microdomaines) (Bagatolli, 2006). L'utilisation combinée de ces deux fluorochromes permet donc d'obtenir des informations concernant les effets des AGTLC sur la fluidité membranaire et sur les microdomaines d'où partent de nombreux signaux cellulaires. Les résultats obtenus avec les AGTLC montrent que ces derniers altèrent la fluidité membranaire sans affecter les microdomaines. Les AGTLC sont déjà connus pour altérer la microviscosité des membranes érythrocytaires chez les patients atteints d'X-ALD (Knazek *et al.*, 1983). Il a été décrit sur des cellules adrénocorticales que ces altérations de la microviscosité rendent insensibles les cellules à l'ACTH (Whitcomb *et al.*, 1988), ce qui démontre que la membrane n'est plus fonctionnelle. Des effets similaires peuvent donc être envisagés sur les cellules du SNC.

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Les travaux réalisés au cours de ma thèse ont apporté de nouvelles informations sur la capacité des AGTLC (C24:0 et C26:0 utilisés à 5, 10, 20 et 40 μ M) à induire un stress oxydant, à activer la mort cellulaire et à modifier les propriétés physiques de la membrane cytoplasmique des oligodendrocytes.

Ainsi, en utilisant une lignée établie d'oligodendrocytes murins 158N, il a été démontré que :

- Les AGTLC induisent une surproduction d'ERO et d'ERN et une perturbation des systèmes anti-oxydants non enzymatique et enzymatique, ce qui entraîne une peroxydation lipidique, une carbonylation des protéines et une dégradation de l'ADN.
- Nous montrons pour la première fois que l'inactivation d'Abcd1 et d'Acox1 est suffisante pour augmenter la production d'ERO et d'ERN. Ces effets sont augmentés en présence d'AGTLC.
- Ces activités pro-oxydantes sont associées à une mort cellulaire lorsque la concentration en AGTLC est élevée (≥ 20 μ M).
- Une déstabilisation du lysosome est associée à la mort cellulaire non apoptotique induite par les AGTLC.
- A la concentration de 20 μ M, les AGTLC altèrent la fluidité membranaire sans affecter les microdomaines lipidiques.

Par ailleurs, des analyses ont été réalisées sur des plasmas de malades remis par le Pr P Aubourg (INSERM UMR 745, Hôpital St Vincent de Paul, Paris).

- Nous montrons pour la première fois que des taux élevés de 7-hydroxycholestérol et de HODES (marqueurs de peroxydation lipidique) présents dans les plasmas de patients atteints d'X-ALD sont corrélés avec la sévérité de la maladie : CCALD > AMN > Addison > ACALD.

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

En fonction des résultats obtenus, nous tenterons de répondre à différentes questions :

- Dans le cadre du stress oxydant activé par les AGTLC, des oxystérols oxydés en C7 ont été générés. Il nous est apparu important de préciser si ces derniers peuvent agir comme second messager et s'ils pourraient intervenir dans l'activation de la microglie observée *in vivo* sur des modèles de souris Nestin-Pex5 et CNPase-Pex5. En effet, ces molécules sont fortement pro-inflammatoires et peuvent induire la synthèse de différentes cytokines.
- Dans la mort cellulaire, l'étude de l'intervention du lysosome sera approfondie. Le type de mort cellulaire induit par les AGTLC devra être précisé (autophagie ou nécrose) ainsi que les voies de signalisation associées. La chronologie et les relations entre la perturbation des flux calciques, la déstabilisation du lysosome et la dépolarisation mitochondriale devront être étudiées.
- Nous envisageons également de préciser les effets de différentes molécules anti-oxydantes (vitamine E, Trolox, acide valproïque, N-acétylcystéine, ...) sur le stress oxydatif et la viabilité. Cela permettra de préciser les relations entre le stress oxydant et la mort cellulaire, tout en permettant d'identifier de nouvelles molécules à visée thérapeutique.
- Des transfections stables permettant d'obtenir des cellules 158N déficientes en Abcd1 et Acox1 sont en cours au laboratoire. Ces outils permettront de mieux aborder l'incidence de ces protéines peroxysomales sur la mort cellulaire, l'oxydation et l'inflammation.
- Les résultats préliminaires obtenus sur les plasmas de patients atteints d'X-ALD sont encourageants et méritent d'être approfondis pour définir dans quelles mesures les 7-hydroxycholestérol et HODEs pourraient être des biomarqueurs des différentes formes d'X-ALD et d'en préciser l'évolution.
- En fonction des résultats obtenus sur les plasmas de patients atteints d'X-ALD, il serait judicieux de pouvoir analyser les taux de 7-hydroxycholestérols et HODEs dans

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

le liquide céphalorachidien, où ils pourraient constituer des marqueurs précoces de l'évolution de la maladie dans la mesure où le stress oxydant en est un élément initiateur.

ANNEXES

I - Presentations

A - Communication orales :

- **BAARINE M**, RAGOT K, RISOLD PY, GHANDOUR S, LIZARD G. Analyse de l'expression de protéines de myéline (PLP, MBP, MOG), d'antigènes de différenciation oligodendrocytaire (CNPase, protéine S100) et de marqueurs peroxysomaux (Catalase, ABCD3, ABCD4) dans deux lignées d'oligodendrocytes murins (158 N, 158 JP). XIVème Forum des Jeunes Chercheurs, Besançon, 12-13 juin 2008.
- **BAARINE M**, RAGOT K, GENIN E, GHANDOUR S, SAVARY S, LIZARD G. Caractérisation antigénique et fonctionnelle de deux lignées cellulaires d'oligodendrocytes murins (158N, 158JP) par microscopie à fluorescence, cytométrie en flux et microscopie confocale : analyse de l'expression de protéines myéliniques et peroxysomales, du contenu et de l'activité mitochondriale, et du statut oxydatif. Congrès AFC CYTOMETRIE Nancy, 22-24 octobre 2008. (Prix de l'AFC).
- **BAARINE M**, LIZARD G. Apport de la microscopie électronique pour l'analyse du métabolisme lipidique et des peroxysomes. Conférence IFR Santé-STIC – Dijon, Recherche et microscopie électronique à l'IFR. Décembre 2009.
- **BAARINE M**, LIZARD G. Caractérisation de la mort cellulaire par cytométrie en flux. Atelier Pratique de Cytométrie en Flux et en Image, Troyes, 2-3 juin 2010.
- **BAARINE M**, LIZARD G. Caractérisation de radicaux oxygénés par cytométrie en flux : applications en biologie et en médecine. Atelier Pratique de Cytométrie en Flux et en Image, Troyes, 2-3 juin 2010.

B - Communications affichées :

- **BAARINE M**, RAGOT K, ATHIAS A, GHANDOUR S, LIZARD G. Evaluation of the cytotoxic effects of Very Long Chain Fatty Acids (C24:0, C26:0) on 158N murine oligodendrocyte cell line. The 2nd ELA Research Foundation Congress, Luxembourg (26-27 June 2009).
- **BAARINE M**, RAGOT K, GHANDOUR S, LIZARD G. Lysosomal Dependent Cell Death of Oligodendrocytes under Treatment by Very Long Chain Fatty Acids (C24:0 and C26:0). XXV Congress of the International Society for Advancement Cytometry, Seattle - USA, May 8-12, 2010.
- ZILAL K, **BAARINE M**, PIERRE A, SAVARY S, CHERKAOUI-MALKI M, LIZARD G. *Abcd1* and *Acox1* silencing in murine oligodendrocyte cells (158N) enhances oxidative stress induced by accumulation of Very Long Chain Fatty Acids (C26:0; C24:0). 14ème réunion de l'AEP BIO "peroxysomes et PPARs, Paris 4 juin 2010.
- RAGOT K, **BAARINE M**, ATHIAS A, GHANDOUR S, LIZARD G. C24:0 and C26:0 favor intracellular accumulation of cholesterol oxide derivatives (7-ketocholesterol, 7β-

hydroxycholesterol) two potent inducers of apoptosis on 158N murine oligodendrocyte cell line. The 2nd ELA Research Foundation Congress, Luxembourg (26-27 June 2009).

- RAGOT K, **BAARINE M**, CHARBONNIER S, ATHIAS A, AUBOURG P, LIZARD G. Implication of oxidized derivatives of cholesterol in the physiopathology of X-ALD : *in vivo* and *in vitro* approach. 14^{ème} réunion de l'AEP BIO "peroxysomes et PPARs, Paris 4 juin 2010.

II – Collaborations

A - Communication orales et affichées :

- KAHN E, PELLOUX S, TOURNEUR Y, FROUIN F, RAGOT K, **BAARINE M**, LIZARD G. Dynamic and spectral imaging analysis of the capture by cardiac cells and toxicity of fluorescent nanoparticles. XXIV International Congress. Cytometry in the age of systems biology. Budapest, Hungary, 17-21 May 2008.
- KAHN E, **BAARINE M**, CHARBONNIER S, PELLOUX S, FROUIN F, TOURNEUR Y, LIZARD G. Etude de la captation de nanoparticules de fer fluorescentes et de leurs activités cytotoxiques et pro-inflammatoires sur des cellules cardiaques (HL1-NB) : analyse par cytométrie en flux et microscopie confocale spectrale. Congrès AFC CYTOMETRIE Nancy, 22-24 octobre 2008.
- DUGAS B, CHARBONNIER S, **BAARINE M**, MALVITTE L, BRON AM, GARCHER C, LIZARD G. Toxicité des oxystérols sur des cellules de l'épithélium pigmentaire rétinien et évaluation des effets protecteurs d'acides gras oméga 3 (DHA, EPA), d'un agoniste de PPAR- α (fénofibrate) et du resvératrol. 115^e Congrès de la Société Française d'Ophtalmologie. Paris, France. 9-13 mai 2009.
- DUGAS B, CHARBONNIER S, **BAARINE M**, MALVITTE L, BRON AM, CREUZOT-GARCHER C, LIZARD G. Toxicity of Oxysterols in Cultured Retinal Pigment Epithelial Cells and Evaluation of Fatty Acids ω 3 (DHA, EPA), PPAR- α Agonist (fenofibrate) and Resveratrol Protective Effects. Reducing Disparities in Eye Disease and Treatment: ARVO, Annual Meeting Fort Lauderdale, FL May 3-7, 2009.
-
- DUGAS B, CHARBONNIER S, **BAARINE M**, RAGOT K, DELMAS D, LIZARD G. Effects of oxysterols on cell viability, inflammatory cytokines, VEGF and Reactive Oxygen Species production on human retinal cells: prevention of VEGF secretion by Resveratrol. International congress Taste, Nutrition, Health; vitagora-Dijon 23-24 mars 2010.
-
- **BAARINE M**, THANDAPILLY S, YU L, LOUIS X, DELMAS D, NETTICADAN T, LIZARD G., LATRUFFE N. Selective effects of dietary resveratrol on normal cardiomyocytes (anti-apoptotic activity) and on tumoral cardiac cells (pro-apoptotic activity). Séminaire Inter Cancéropôle : Grand Est (GE) – Lyon Auvergne Rhône Alpes (CLARA), Dijon, 29-30 avril 2010.

- LIZARD G, KATTAN Z, **BAARINE M**. Activité métabolique de la cellule. Journée Recherche et Master Biologie, Biophotonique. 11ème colloque Rhône-Alpes de quantimétrie cellulaire. St Etienne 16 juin 2010.
- RAGOT K, **BAARINE M**, LIZARD G. Multiplexed and microbeads-based analyses: powerful tools for protein and gene analysis. The Fifth National Congress of Cytometry, Sinaia, Romania, 25-27 may, 2009.

B - Publications :

- DUGAS B, CHARBONNIER S, **BAARINE M**, RAGOT K, DELMAS D, MENETRIER F, LHERMINIER J, MALVITTE L, KHALFAOUI T, BRON A, CREUZOT-GARCHER C, LATRUFFE N, LIZARD G. Effects of oxysterols on cell viability, inflammatory cytokines, VEGF, and reactive oxygen species production on human retinal cells : cytoprotective effects and prevention of VEGF secretion by resveratrol. *European Journal of Nutrition*. 2010 Oct; 49(7):435-46.
- KAHN E, **BAARINE M**, PELLOUX S, RIEDINGER JM, FROUIN F, TOURNEUR Y, LIZARD G. Iron nanoparticles increase 7-ketocholesterol-induced cell death, inflammation, and oxidation on murine cardiac HL1-NB cells. *International Journal of Nanomedicine*. 2010 Apr 7; 5:185-95.
- KAHN E, PELLOUX S, **BAARINE M**, KHALFAOUI T, RAGOT K, FROUIN F, RIEDINGER JM, TOURNEUR Y, LIZARD G. Analysis of the Capture and Influence of Nanoparticles on the Cytotoxic Effects of 7-Ketocholesterol on Cardiac Cells: Investigation by Flow Cytometry and by Dynamic and Spectral Imaging Microscopy associated with Factor Analysis of Medical Image Sequences (FAMIS). *Analytical and Quantitative Cytology and Histology*. 2009, 31: 380-394.
- **MAUHAMAD BAARINE**, SIJO JOSEPH THANDAPILLY, L. YU, FRÉDÉRIC MAZUÉ, X. L. LOUIS, DOMINIQUE DELMAS, THOMAS NETTICADAN, GÉRARD LIZARD, NORBERT LATRUFFE. Pro-apoptotic vs anti-apoptotic properties and cell signaling of dietary resveratrol on normal and on tumour cells. *Genes and Nutrition* (En révision).

REFERENCES

A

- Adamo AM, Aloise PA, Pasquini JM. 1986. A possible relationship between concentration of microperoxisomes and myelination. *Int J Dev Neurosci.* 4(6):513-517.
- Ahlemeyer B, Neubert I, Kovacs WJ, Baumgart-Vogt E. 2007. Differential expression of peroxisomal matrix and membrane proteins during postnatal development of mouse brain. *J Comp Neurol.* 505(1):1-17.
- Alessandri JM, Extier A, Astorg P, Lavialle M, Simon N, Guesnet P. 2009. Gender-related differences in omega-3 metabolism. *Nutrition Clinique et metabolisme.* 23:55-66.
- Alessandri JM, Guesnet P, Vancassel S, Astorg P, Denis I, Langelier B, Aïd S, Poumès-Ballihaut C, Champeil-Potokar G, Lavialle M. 2004. Polyunsaturated fatty acids in the central nervous system: evolution of concepts and nutritional implications throughout life. *Reprod Nutr Dev.* 44(6):509-538.
- Amon A, Tyers M. 2009. Life and death decisions. *Curr Opin Cell Biol.* 21(6):767-770.
- Angermüller S, Islinger M, Völkl A. 2009. Peroxisomes and reactive oxygen species, a lasting challenge. *Histochem Cell Biol.* 131(4):459-463.
- Aubourg P. 2007. X-linked adrenoleukodystrophy. *Ann Endocrinol (Paris).* 68(6):403-411.

B

- Baes M, Aubourg P. 2009. Peroxisomes, myelination, and axonal integrity in the CNS. *Neuroscientist.* 15(4):367-379.
- Baes M, Gressens P, Baumgart E, Carmeliet P, Casteels M, Franssen M, Evrard P, Fahimi D, Declercq PE, Collen D, van Veldhoven PP, Mannaerts GP. 1997. A mouse model for Zellweger syndrome. *Nat Genet.* 17(1):49-57.
- Bagatolli LA. 2006. To see or not to see: lateral organization of biological membranes and fluorescence microscopy. *Biochim Biophys Acta.* 1758:1541-1556.
- Barouki R. 2006. Ageing free radicals and cellular stress. *Med Sci (Paris).* 22(3):266-272.
- Baumgart E, Vanhooren JC, Franssen M, Mannaerts GP, Van Veldhoven PP. 1996. Mammalian peroxisomal acyl-CoA oxidases. III. Molecular characterization of human branched chain fatty acyl-CoA oxidase. *Ann N Y Acad Sci.* 804:678-689.
- Baumgart E, Vanhorebeek I, Grabenbauer M, Borgers M, Declercq PE, Fahimi HD, Baes M. 2001. Mitochondrial alterations caused by defective peroxisomal biogenesis in a mouse model for Zellweger syndrome (PEX5 knockout mouse). *Am J Pathol.* 159(4):1477-1494.
- Beal MF. 2000. Energetics in the pathogenesis of neurodegenerative diseases. *Trends Neurosci.* 23:298-304.
- Bergendi L, Benes L, Duracková Z, Ferencik M. 1999. Chemistry, physiology and pathology of free radicals. *Life Sci.* 65(18-19):1865-1874.
- Berger J, Pujol A, Aubourg P, Forss-Petter S. 2010. Current and future pharmacological treatment strategies in X-linked adrenoleukodystrophy. *Brain Pathol.* 20(4):845-856.
- Berger J. and Gärtner J. 2006. X-linked adrenoleukodystrophy: Clinical, biochemical and pathogenetic aspects. *Biochemica et Biophysica Acta,* 1763:1721-1732.
- Biasi F, Leonarduzzi G, Vizio B, Zanetti D, Sevanian A, Sottero B, Verde V, Zingaro B, Chiarpotto E, Poli G. 2004. Oxysterol mixtures prevent proapoptotic effects of 7-ketocholesterol in macrophages: implications for proatherogenic gene modulation. *FASEB J* 18(6):693-5.

REFERENCES

- Birling MC, Roussel G, Nussbaum F, and Nussbaum J.L. 1993. Biochemical and immunohistochemical studies with specific polyclonal antibodies directed against bovine myelin/oligodendrocyte glycoprotein, *Neurochem. Res.* 18:937-945.
- Biswas SK, Rahman I. 2009. Environmental toxicity, redox signaling and lung inflammation: the role of glutathione. *Mol Aspects Med.* 30(1-2):60-76.
- Björkhem I. 2006. Crossing the barrier: oxysterols as cholesterol transporters and metabolic modulators in the brain. *J Intern Med* 260(6):493-508.
- Björkhem I, Heverin M, Leoni V, Meaney S, Diczfalussy U. 2006. Oxysterols and Alzheimer's disease. *Acta Neurol Scand Suppl* 185:43-9.
- Björkhem I, Meaney S. 2004. Brain cholesterol: long secret life behind a barrier. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 24(5):806-15.
- Blair IA. 2001. Lipid hydroperoxide-mediated DNA damage. *Experimental gerontology.* 36:1473-1481.
- Boehm CD, Cutting GR, Lachtermacher MB, Moser HW, Chong SS. 1999. Accurate DNA-based diagnostic and carrier testing for X-linked adrenoleukodystrophy. *Mol Genet Metab.* 66(2):128-136.
- Boggs JM. 2006. Myelin basic protein: a multifunctional protein. *Cell Mol Life Sci.* 63(17):1945-1961.
- Bongarzone ER, Foster LM, Byravan S, Schonmann V, Campagnoni AT. 1997. Temperature-dependent regulation of PLP/DM20 and CNP gene expression in two conditionally-immortalized jimpy oligodendrocyte cell lines. *Neurochem Res* 22:363-372.
- Bottelbergs A, Verheijden S, Hulshagen L, Gutmann DH, Goebbels S, Nave KA, Kassmann C, Baes M. 2010. Axonal integrity in the absence of functional peroxisomes from projection neurons and astrocytes. *Glia.* 58(13):1532-1543.
- Boveris A, Oshino N, Chance B. 1972. The cellular production of hydrogen peroxide. *Biochem J.* 128(3):617-630.
- Boya P, Kroemer G. 2008. Lysosomal membrane permeabilization in cell death. *Oncogene.* 27(50):6434-6451.
- Bradl M, Lassmann H. 2010. Oligodendrocytes: biology and pathology. *Acta Neuropathol.* 119(1):37-53.
- Brites P, Mooyer PA, El Mrabet L, Waterham HR, Wanders RJ. 2008. Plasmalogens participate in very-long-chain fatty acid-induced pathology. *Brain.* 132(Pt 2):482-492.
- Brites P, Motley AM, Gressens P, Mooyer PA, Ploegaert I, Everts V, Evrard P, Carmeliet P, Dewerchin M, Schoonjans L, Duran M, Waterham HR, Wanders RJ, Baes M. 2003. Impaired neuronal migration and endochondral ossification in Pex7 knockout mice: a model for rhizomelic chondrodysplasia punctata. *Hum Mol Genet.* 12(18):2255-2267.
- Brites P, Waterham HR, Wanders RJ. 2004. Functions and biosynthesis of plasmalogens in health and disease. *Biochim Biophys Acta.* 1636(2-3):219-231.
- Britton RS. 1996. Metal-induced hepatotoxicity. *Semin Liver Dis.* 16(1):3-12.
- Brown AJ, Jessup W. 1999. Oxysterols and atherosclerosis. *Atherosclerosis* 142(1):1-28.
- Brown AJ, Jessup W. 2009. Oxysterols: Sources, cellular storage and metabolism, and new insights into their roles in cholesterol homeostasis. *Mol Aspects Med.* 30(3):111-122.
- Brown LA, Baker A. 2003. Peroxisome biogenesis and the role of protein import. *J Cell Mol Med.* 7(4):388-400.
- Bursch W. 2001. the autophagosomal-lysosomal compartment in programmed cell death. *Cell death differ* 8:569-581.
- Bucher JR, Tien M, Aust SD. 1983. The requirement for ferric in the initiation of lipid peroxidation by chelated ferrous iron. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 111:777-784.
- Buntinx M, Vanderlocht J, Hellings N, Vandenabeele F, Lambrichts I, Raus J, Ameloot M, Stinissen P, Steels P. 2003. Characterization of three human oligodendroglial cell lines

REFERENCES

as a model to study oligodendrocyte injury: morphology and oligodendrocyte-specific gene expression. *J Neurocytol.* 32:25-38.

C

- Cadet J, Douki T, Ravanat JL. 2010. Oxidatively generated base damage to cellular DNA. *Free Radic Biol Med.* 49(1):9-21.
- Carter CJ. 2007. Convergence of genes implicated in Alzheimer's disease on the cerebral cholesterol shuttle: APP, cholesterol, lipoproteins, and atherosclerosis. *Neurochem Int* 50(1):12-38.
- Cartier N, Hacein-Bey-Abina S, Bartholomae CC, Veres G, Schmidt M, Kutschera I, Vidaud M, Abel U, Dal-Cortivo L, Caccavelli L, Mahlaoui N, Kiermer V, Mittelstaedt D, Bellesme C, Lahlou N, Lefrère F, Blanche S, Audit M, Payen E, Leboulch P, l'Homme B, Bougnères P, Von Kalle C, Fischer A, Cavazzana-Calvo M, Aubourg P. 2009. Hematopoietic stem cell gene therapy with a lentiviral vector in X-linked adrenoleukodystrophy. *Science.* 326:818-823.
- Castino R, Bellio N, Nicotra G, Follo C, Trincheri NF, Isidoro C. 2007. Cathepsin D-Bax death pathway in oxidative stressed neuroblastoma cells. *Free Radic Biol Med.* 42(9):1305-1316.
- Chai J, Du C, Wu JW, Kyin S, Wang X, Shi Y. 2000. Structural and biochemical basis of apoptotic activation by Smac/DIABLO. *Nature.* 406(6798):855-862.
- Champeil-Potokar G, Denis I, Goustard-Langelier B, Alessandri JM, Guesnet P, Lavialle M. 2004. Astrocytes in culture require docosahexaenoic acid to restore the n-3/n-6 polyunsaturated fatty acid balance in their membrane phospholipids. *J Neurosci Res.* 75(1):96-106.
- Chang CC, South S, Warren D, Jones J, Moser AB, Moser HW, and Gould SJ. 1999. Metabolic control of peroxisome abundance. *J Cell Sci.* 112:1579-1590.
- Chaudhary P, Sharma R, Sharma A, Vatsyayan R, Yadav S, Singhal SS, Rauniyar N, Prokai L, Awasthi S, Awasthi YC. 2010. Mechanisms of 4-hydroxy-2-nonenal induced pro- and anti-apoptotic signaling. *Biochemistry.* 49(29):6263-6275.
- Cheng JP, Lane JD. 2010. Organelle dynamics and membrane trafficking in apoptosis and autophagy. *Histol Histopathol.* 25(11):1457-1472.
- Cheng WH, Zheng X, Quimby FR, Roneker CA, Lei XG. 2003. Low levels of glutathione peroxidase 1 activity in selenium-deficient mouse liver affect c-Jun N-terminal kinase activation and p53 phosphorylation on Ser-15 in pro-oxidant-induced apoptosis. *Biochem J.* 370(3):927-934.
- Chiueh CC. 1999. Neuroprotective properties of nitric oxide. *Ann N Y Acad Sci.* 890:301-311.
- Choi BH. 1993. Oxygen, antioxidants and brain dysfunction. *Yonsei Med J.* 34(1):1-10.
- Chu CT, Plowey ED, Dagda RK, Hickey RW, Cherra SJ 3rd, Clark RS. 2009. Autophagy in neurite injury and neurodegeneration: in vitro and in vivo models. *Methods Enzymol.* 453:217-249.
- Cimini A, Bernardo A, Cifone MG, Di Marzio L, Di Loreto S. 2003. TNFalpha downregulates PPARdelta expression in oligodendrocyte progenitor cells: implications for demyelinating diseases. *Glia.* 41(1):3-14. Erratum in: *Glia.* 2003 Jan 15;41(2):212
- Circu ML, Aw TY. 2010. Reactive oxygen species, cellular redox systems, and apoptosis. *Free Radic Biol Med.* 48(6):749-762.
- Clements CS, Reid HH, Beddoe T, Tynan FE, Perugini MA, Johns TG, Bernard CC, Rossjohn J. 2003. The crystal structure of myelin oligodendrocyte glycoprotein, a key autoantigen in multiple sclerosis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 100(19):11059-11064.
- Cohen GM. 1997. Caspases: the executioners of apoptosis. *Biochem J.* 15:326(Pt1):1-16.

REFERENCES

- Coulter AA, Stephens JM. 2006. STAT5 activators modulate acyl CoA oxidase (AOX) expression in adipocytes and STAT5A binds to the AOX promoter in vitro. *Biochem Biophys Res Commun.* 344(4):1342-1345.
- Curtin JF, Donovan M, Cotter TG. 2002. Regulation and measurement of oxidative stress in apoptosis. *Journal of immunological methods.* 265:49-72.
- Czaja MJ, Cuervo AM. 2009. Lipases in lysosomes, what for? *Autophagy.* 5(6):866-867.

D

- Danilov AI, Andersson M, Bavand N, Wiklund NP, Olsson T, Brundin L. 2003. Nitric oxide metabolite determinations reveal continuous inflammation in multiple sclerosis. *J Neuroimmunol.* 136(1-2):112-118.
- Dasari B, Prasanthi J, Marwarha G, Singh B, Ghribi O. 2010. The oxysterol 27-hydroxycholesterol increases b-amyloid and oxidative stress in retinal pigment epithelial cells. *BMC Ophthalmology* 10:22
- Davies, M. J., Fu, S., Dean, R. T. 1995. Protein hydroperoxides can give rise to reactive free radicals. *The Biochemical journal.* 305(Pt2):643-649.
- De Duve C, Baudhuin P. 1966. Peroxisomes (microbodies and related particles). *Physiol Rev.* 46(2):323-57.
- de Vries H, Hoekstra D. 2000. On the biogenesis of the myelin sheath: cognate polarized trafficking pathways in oligodendrocytes. *Glycoconj J.* 17(3-4):181-190.
- Dell'Angelica EC, Mullins C, Caplan S, Bonifacino JS. 2000. Lysosome-related organelles. *FASEB J.* 14(10):1265-1278.
- Deloulme JC, Raponi E, Gentil BJ, Bertacchi N, Marks A, Labourdette G, Baudier J. 2004. Nuclear expression of S100B in oligodendrocyte progenitor cells correlates with differentiation toward the oligodendroglial lineage and modulates oligodendrocytes maturation. *Mol Cell Neurosci.* 27(4):453-465.
- Deon M, Sitta A, Barschak AG, Coelho DM, Pigatto M, Schmitt GO, Jardim LB, Giugliani R, Wajner M, Vargas CR. 2007. Induction of lipid peroxidation and decrease of antioxidant defenses in symptomatic and asymptomatic patients with X-linked adrenoleukodystrophy. *Int J Dev Neurosci.* 25(7):441-444.
- Deon M, Sitta A, Barschak AG, Coelho DM, Terroso T, Schmitt GO, Wanderley HY, Jardim LB, Giugliani R, Wajner M, Vargas CR. 2008. Oxidative stress is induced in female carriers of X-linked adrenoleukodystrophy. *J Neurol Sci.* 266(1-2):79-83.
- Dhaunsi GS, Kaur J, Alsaeid K, Turner RB, Bitar MS. 2005. Very long chain fatty acids activate NADPH oxidase in human dermal fibroblasts. *Cell Biochem Funct.* 23(1):65-68.
- Di Benedetto R, Denti MA, Salvati S, Attorri L, Di Biase A. 2009. PMP70 knock-down generates oxidative stress and pro-inflammatory cytokine production in C6 glial cells. *Neurochem Int.* 54(1):37-42.
- Di Benedetto R, Denti MA, Salvati S, Sanchez M, Attorri L, David G, Di Biase A. 2008. RNAi-mediated silencing of ABCD3 gene expression in rat C6 glial cells: a model system to study PMP70 function. *Neurochem Int.* 52(6):1106-1113.
- Di Biase A, Di Benedetto R, Fiorentini C, Travaglione S, Salvati S, Attorri L, Pietraforte D. 2004. Free radical release in C6 glial cells enriched in hexacosanoic acid: implication for X-linked adrenoleukodystrophy pathogenesis. *Neurochem Int.* 44(4):215-221.
- Diestel A, Aktas O, Hackel D, Hake I, Meier S, Raine CS, Nitsch R, Zipp F, Ullrich O. 2003. Activation of microglial poly(ADP-ribose)-polymerase-1 by cholesterol breakdown products during neuroinflammation: a link between demyelination and neuronal damage. *J Exp Med.* 198(11):1729-40.

REFERENCES

- Di Monte DA, Chan P, Sandy MS. 1992. Glutathione in Parkinson's disease: a link between oxidative stress and mitochondrial damage? *Ann Neurol.* 32 Suppl:S111-115.
- Diczfalusy U. 1994. Beta-oxidation of eicosanoids. *Prog Lipid Res.* 33(4):403-428.
- Diestel A, Aktas O, Hackel D, Hake I, Meier S, Raine CS, Nitsch R, Zipp F, Ullrich O. 2003. Activation of microglial poly(ADP-ribose)-polymerase-1 by cholesterol breakdown products during neuroinflammation: a link between demyelination and neuronal damage. *J Exp Med.* 198(11):1729-1740.
- Dirkx R, Vanhorebeek I, Martens K, Schad A, Grabenbauer M, Fahimi D, Declercq P, Van Veldhoven PP, Baes M. 2005. Absence of peroxisomes in mouse hepatocytes causes mitochondrial and ER abnormalities. *Hepatology.* 41(4):868-878.
- Dobashi K, Pahan K, Chahal A, Singh I. 1997. Modulation of endogenous antioxidant enzymes by nitric oxide in rat C6 glial cells. *J Neurochem.* 68(5):1896-1903.
- Douki, T., Odin, F., Caillat, S., Favier, A., Cadet, J. 2004. Predominance of the 1,N2- propano 2'-deoxyguanosine adduct among 4-hydroxy-2-nonenal-induced DNA lesions. *Free radical biology & medicine.* 37:62-70.
- Dröge W. 2002. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev.* 82(1):47-95.
- Dubois-Dalcq M, Feigenbaum V, Aubourg P. 1999. The neurobiology of X-Linked adrenoleukodystrophy, a demyelinating peroxisomal disorder. *Trends in Neurosciences,* 22(1):4-12.
- Dugas JC, Tai YC, Speed TP, Ngai J, Barres BA. 2006. Functional genomic analysis of oligodendrocyte differentiation. *J. Neurosci.* 26(43):10967-10983.
- Dyer RG, Stewart MW, Mitcheson J, George K, Alberti MM, Laker MF. 1997. 7-ketocholesterol, a specific indicator of lipoprotein oxidation, and malondialdehyde in non-insulin dependent diabetes and peripheral vascular disease. *Clin Chim Acta.* 260(1):1-13.

E

- Eckert JH, Erdmann R. 2003. Peroxisome biogenesis. *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.* 147:75-121.
- Eichler FS, Ren JQ, Cossoy M, Rietsch AM, Nagpal S, Moser AB, Frosch MP, Ransohoff RM. 2008. Is microglial apoptosis an early pathogenic change in cerebral X-linked adrenoleukodystrophy? *Ann Neurol.* 63(6):729-742.
- Esterbauer H, Schaur RJ, Zollner H. 1991. Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes. *Free Radic Biol Med.* 11(1):81-128.

F

- Faccio L, Fusco C, Chen A, Martinotti S, Bonventre JV, Zervos AS. 2000. Characterization of a novel human serine protease that has extensive homology to bacterial heat shock endoprotease HtrA and is regulated by kidney ischemia. *J Biol Chem.* 275(4):2581-2588.
- Fan CY, Pan J, Chu R, Lee D, Kluckman KD, Usuda N, Singh I, Yeldandi AV, Rao MS, Maeda N, Reddy JK. 1996a. Hepatocellular and hepatic peroxisomal alterations in mice with a disrupted peroxisomal fatty acyl-coenzyme A oxidase gene. *J Biol Chem.* 271: 24698-24710.
- Fan CY, Pan J, Chu R, Lee D, Kluckman KD, Usuda N, Singh I, Yeldandi AV, Rao MS, Maeda N, Reddy JK. 1996b. Targeted disruption of the peroxisomal fatty acyl-CoA oxidase gene: generation of a mouse model of pseudoneonatal adrenoleukodystrophy. *Ann N Y Acad Sci.* 804:530-541.

REFERENCES

- Farooqui AA, Horrocks LA, Farooqui T. 2007. Modulation of inflammation in brain: a matter of fat. *J Neurochem*. 101(3):577-599.
- Faust PL, Hatten ME. 1997. Targeted deletion of the PEX2 peroxisome assembly gene in mice provides a model for Zellweger syndrome, a human neuronal migration disorder. *J Cell Biol*. 139(5):1293-1305.
- Faust PL, Banka D, Siriratsivawong R, Ng VG, Wikander TM. 2005. Peroxisome biogenesis disorders: the role of peroxisomes and metabolic dysfunction in developing brain. *J Inherit Metab Dis*. 28(3):369-383.
- Feldstein AE, Werneburg NW, Canbay A, Guicciardi ME, Bronk SF, Rydzewski R, Burgart LJ, Gores GJ. 2004. Free fatty acids promote hepatic lipotoxicity by stimulating TNF- α expression via a lysosomal pathway. *Hepatology*. 40(1):185-194.
- Feng Z, Hu W, Amin S, Tang MS. 2003. Mutational spectrum and genotoxicity of the major lipid peroxidation product, trans-4-hydroxy-2-nonenal, induced DNA adducts in nucleotide excision repair-proficient and -deficient human cells. *Biochemistry*. 42:7848-7854.
- Ferdinandusse S, Barker S, Lachlan K, Duran M, Waterham HR, Wanders RJ, Hammans S. 2010. Adult peroxisomal acyl-coenzyme A oxidase deficiency with cerebellar and brainstem atrophy. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 81(3):310-312.
- Ferdinandusse S, Denis S, Hogenhout EM, Koster J, van Roermund CWT, Lijst L, Moser AB, Wanders RJ, Waterham HR. 2007. Clinical, biochemical, and mutational spectrum of peroxisomal Acyl-Coenzyme A oxidase deficiency. *Hum Mut*. 28:904-912.
- Ferdinandusse S, Denis S, Mooijer PA, Zhang Z, Reddy JK, Spector AA, Wanders RJ. 2001. Identification of the peroxisomal beta-oxidation enzymes involved in the biosynthesis of docosahexaenoic acid. *J Lipid Res*. 42(12):1987-1995.
- Ferdinandusse S, Houten SM. 2006. Peroxisomes and bile acid biosynthesis. *Biochim Biophys Acta*. 1763(12):1427-1440.
- Ferrer I, Aubourg P, Pujol A. 2010. General aspects and neuropathology of X-linked adrenoleukodystrophy. *Brain Pathol*. 20(4):817-830.
- Ferrer I, Kapfhammer JP, Hindelang C, Kemp S, Troffer-Charlier N, Broccoli V, Callyzot N, Mooyer P, Selhorst J, Vreken P, Wanders RJ, Mandel JL, Pujol A. 2005. Inactivation of the peroxisomal ABCD2 transporter in the mouse leads to late-onset ataxia involving mitochondria, Golgi and endoplasmic reticulum damage. *Hum Mol Genet*. 14(23):3565-3577.
- Ferri KF, Kroemer G. 2001. Mitochondria--the suicide organelles. *Bioessays*. 23(2):111-115.
- Feutz AC, Bellomi I, Allinquant B, Schladenhaufen Y, Ghandour MS. 1995. Isolation and characterization of defective jimpy oligodendrocytes in culture. *J Neurocytol*. 24:865-877.
- Feutz AC, Pham-Dinh D, Allinquant B, Mieke M, Ghandour MS. 2001. An immortalized jimpy oligodendrocyte cell line: defects in cell cycle and cAMP pathway. *Glia*. 34:241-252.
- Fink SL, Cookson BT. 2005. Apoptosis, pyroptosis, and necrosis: mechanistic description of dead and dying eukaryotic cells. *Infect Immun*. 73(4):1907-1916.
- Ford-Hutchinson AW. 1985. Leukotrienes: their formation and role as inflammatory mediators. *Fed. Proc*. 44:25-29.
- Ford-Hutchinson, AW. 1989. Evidence for the involvement of leukotrienes and other lipoxygenase products in disease states. In *Leukotrienes and Lipoxygenases. Chemical, Biological and Clinical Aspects*. J. Rokach, editor. Elsevier Science Publishing Co., Inc., New York. 405-425.
- Forman HJ, Zhang H, Rinna A. 2009. Glutathione: overview of its protective roles, measurement, and biosynthesis. *Mol Aspects Med*. 30(1-2):1-12.

REFERENCES

- Forss-Petter S, Werner H, Berger J, Lassmann H, Molzer B, Schwab MH, Bernheimer H, Zimmermann F, Nave KA. 1997. Targeted inactivation of the X-linked adrenoleukodystrophy gene in mice. *J Neurosci Res.* 50(5):829-843.
- Fouquet F, Zhou JM, Ralston E, Murray K, Troalen F, Magal E, Robain O, Dubois-Dalcq M, Aubourg P. 1997. Expression of the adrenoleukodystrophy protein in the human and mouse central nervous system. *Neurobiol Dis.* 3(4):271-285.
- Fourcade S, López-Erauskin J, Galino J, Duval C, Naudi A, Jove M, Kemp S, Villarroja F, Ferrer I, Pamplona R, Portero-Otin M, Pujol A. 2008. Early oxidative damage underlying neurodegeneration in X-adrenoleukodystrophy. *Hum Mol Genet.* 17(12):1762-1773.
- Fourcade S, Ruiz M, Guileria C, Hahnen E, Brichta L, Naudi A, Portero-Otín M, Dacremont G, Cartier N, Wanders R, Kemp S, Mandel JL, Wirth B, Pamplona R, Aubourg P, Pujol A. 2010. Valproic acid induces antioxidant effects in X-linked adrenoleukodystrophy. *Hum Mol Genet.* 19(10):2005-2014.
- Fournier B, Saudubray JM, Benichou B, Lyonnet S, Munnich A, Clevers H, Poll-The BT. 1994. Large deletion of the peroxisomal acyl-CoA oxidase gene in pseudoneonatal adrenoleukodystrophy. *J. Clin. Invest.* 94(2):526-531.
- Fukui M, Zhu BT. 2010. Mitochondrial superoxide dismutase SOD2, but not cytosolic SOD1, plays a critical role in protection against glutamate-induced oxidative stress and cell death in HT22 neuronal cells. *Free Radic Biol Med.* 48(6):821-830.
- Funk CD. 2001. Prostaglandins and leukotrienes: advances in eicosanoid biology. *Science.* 294(5548):1871-1875.
- Furukawa A, Hiraku Y, Oikawa S, Luxford C, Davies MJ, and Kawanishi S. 2005. Guanine-specific DNA damage induced by gamma-irradiated histone. *The Biochemical journal.* 388:813-818.

G

- Gao Y. 2010. The multiple actions of NO. *Pflugers Arch.* 459(6):829-839.
- Gaposchkin DP, Zoeller RA. 1999. Plasmalogen status influences docosahexaenoic acid levels in a macrophage cell line. Insights using ether lipid-deficient variants. *J Lipid Res.* 40(3):495-503.
- Geng YJ, Libby P. 1995. Evidence for apoptosis in advanced human atheroma. Colocalization with interleukin-1 beta-converting enzyme. *Am J Pathol.* 147(2):251-266.
- Ghandour S, Feutz AC, Jalabi W, Taleb O, Bessert D, Cypher M, Carlock L, Skoff RP. 2002. Trafficking of PLP/DM20 and cAMP signalling in immortalized jimpy oligodendrocytes. *GLIA.* 40:300-311.
- Gilg AG, Singh AK, Singh I. 2000. Inducible nitric oxide synthase in the central nervous system of patients with X-adrenoleukodystrophy. *J Neuropathol Exp Neurol.* 59(12):1063-1069.
- Gilmore AP. 2005. Anoikis. *Cell Death Differ.* 2:1473-1477.
- Girzalsky W, Saffian D, Erdmann R. 2010. Peroxisomal protein translocation. *Biochim Biophys Acta.* 1803(6):724-731.
- Gitsham AM, Burdett K, Tappia PS, Connock MJ, Johnson P. 1989. Enzymes of plasmalogen biosynthesis in microperoxisomes of guinea-pig intestinal mucosa. *Biochem Soc Trans.* 17:1074-1075.
- Gondcaille C, Depreter M, Fourcade S, Lecca MR, Leclercq S, Martin PG, Pineau T, Cadepond F, ElEtr M, Bertrand N, Beley A, Duclos S, De Craemer D, Roels F, Savary S, Bugaut M. 2005. Phenylbutyrate up-regulates the adrenoleukodystrophy-related gene as a nonclassical peroxisome proliferator. *J Cell Biol.* 169(1):93-104.
- Goodman JM. 2008. The gregarious lipid droplet. *J Biol Chem.* 283(42):28005-28009.

REFERENCES

- Gorgas K, Teigler A, Komljenovic D, Just WW. 2006. The ether lipid-deficient mouse: tracking down plasmalogen functions. *Biochim Biophys Acta*. 1763(12):1511-1526.
- Granier LA, Langley K, Leray C, Sarlieve LL. 2000. Phospholipid composition in late infantile neuronal ceroid lipofuscinosis. *Eur J Clin Invest*. 30:1011-1017.
- Green D, Kroemer G. 1998. The central executioners of apoptosis: caspases or mitochondria? *Trends Cell Biol*. 8(7):267-271.
- Green DR, Kroemer G. 2004. The pathophysiology of mitochondrial cell death. *Science*. 305(5684):626-629.
- Griffiths I, Klugmann M, Anderson T, Yool D, Thomson C, Schwab MH, Schneider A, Zimmermann F, McCulloch M, Nadon N, Nave KA. 1998. Axonal swellings and degeneration in mice lacking the major proteolipid of myelin. *Science*. 280:1610-1613.
- Gruber CW, Cemazar M, Heras B, Martin JL, Craik DJ. 2006. Protein disulfide isomerase: the structure of oxidative folding. *Trends in biochemical sciences*. 31:455-464.
- Guardiola F, Codony R, Addis PB, Rafecas M, Boatella J. 1996. Biological effects of oxysterols: current status. *Food Chem Toxicol* 34(2):193-211.
- Guesnet P, Alessandri JM. 2010. Docosahexaenoic acid (DHA) and the developing central nervous system (CNS) - Implications for dietary recommendations. *Biochimie*. PMID: 20478353.
- Gueugnon F, Volodina N, Taouil JE, Lopez TE, Gondcaille C, Grand AS, Mooijer PA, Kemp S, Wanders RJ, Savary S. 2006. A novel cell model to study the function of the adrenoleukodystrophy-related protein. *Biochem Biophys Res Commun*. 341(1):150-157.
- Guicciardi ME, Leist M, Gores GJ. 2004. Lysosomes in cell death. *Oncogene*. 23(16):2881-2890.
- Guimarães CP, Domingues P, Aubourg P, Fouquet F, Pujol A, Jimenez-Sanchez G, Sá-Miranda C, Azevedo JE. 2004. Mouse liver PMP70 and ALDP: homomeric interactions prevail in vivo. *Biochim Biophys Acta*. 1689(3):235-243.
- Gunkel K, van der Klei IJ, Barth G, Veenhuis M. 1999. Selective peroxisome degradation in *Yarrowia lipolytica* after a shift of cells from acetate/oleate/ethylamine into glucose/ammonium sulfate-containing media. *FEBS Lett*. 451(1):1-4.
- Guo T, Kit YY, Nicaud JM, Le Dall MT, Sears SK, Vali H, Chan H, Rachubinski RA, Titorenko VI. 2003. Peroxisome division in the yeast *Yarrowia lipolytica* is regulated by a signal from inside the peroxisome. *J Cell Biol*. 162(7):1255-1266.
- Gurvitz A, Rottensteiner H. 2006. The biochemistry of oleate induction : transcriptional upregulation and peroxisome proliferation. *Biochim Biophys Acta*. 1763(12):1392-1402.

H

- Halbach A, Lorenzen S, Landgraf C, Volkmer-Engert R, Erdmann R, Rottensteiner H. 2005. Function of the PEX19-binding site of human adrenoleukodystrophy protein as targeting motif in man and yeast. PMP targeting is evolutionarily conserved. *J Biol Chem*. 280(22):21176-21182.
- Hammarstrom S. 1983. Leukotrienes. *Annu Rev Biochem*. 52:355-377.
- Han X, Holtzman DM, McKeel DW. 2001. Plasmalogen deficiency in early Alzheimer's disease subjects and in animal models: molecular characterization using electrospray ionization mass spectrometry. *J. Neurochem*. 77:1168-1180.
- Hanson RF, Szczepanik-VanLeeuwen P, Williams GC, Grabowski G, Sharp HL. 1979. Defects of bile acid synthesis in Zellweger's syndrome. *Science*. 203(4385):1107-1108.
- Hardeman D, Van den Bosch H. 1989. Topography of ether phospholipid biosynthesis. *Biochim Biophys Acta*. 1006:1-8.

REFERENCES

- Hardy SJ, Ferrante A, Poulos A, Robinson BS, Johnson DW, Murray AW. 1994. Effect of exogenous fatty acids with greater than 22 carbon atoms (very long chain fatty acids) on superoxide production by human neutrophils. *J Immunol.* 153(4):1754-61.
- Hashimoto F, Furuya Y, Hayashi H. 2001. Accumulation of medium chain acyl-CoAs during beta-oxidation of long chain fatty acid by isolated peroxisomes from rat liver. *Biol Pharm Bull.* 24(6):600-606.
- Heales SJ, Bolaños JP, Stewart VC, Brookes PS, Land JM, Clark JB. 1999. Nitric oxide, mitochondria and neurological disease. *Biochim Biophys Acta.* 1410(2):215-228.
- Hein S, Schönfeld P, Kahlert S, Reiser G. 2008. Toxic effects of X-linked adrenoleukodystrophy-associated, very long chain fatty acids on glial cells and neurons from rat hippocampus in culture. *Hum Mol Genet.* 17(12):1750-1761.
- Hettema EH, Distel B, and Tabak HF. 1999. Import of proteins into peroxisomes. *Biochim Biophys Acta.* 1451(1):17-34.
- Hirrlinger J, Resch A, Gutterer JM, Dringen R. 2002. Oligodendroglial cells in culture effectively dispose of exogenous hydrogen peroxide: comparison with cultured neurones, astroglial and microglial cells. *J Neurochem.* 82(3):635-644.
- Ho JK, Moser H, Kishimoto Y, Hamilton JA. 1995. Interactions of a very long chain fatty acid with model membranes and serum albumin. Implications for the pathogenesis of adrenoleukodystrophy. *J Clin Invest.* 96(3):1455-1463.
- Hoepfner D, Schildknecht D, Braakman I, Philippsen P, Tabak HF. 2005. Contribution of the Endoplasmic Reticulum to Peroxisome Formation. *Cell.* 122: 85-95.
- Hu Y, Israelachvili J. 2008. Lateral reorganization of myelin lipid domains by myelin basic protein studied at the air-water interface. *Colloids Surf B Biointerfaces.* 62(1):22-30.
- Hubbard WC, Moser AB, Liu AC, Jones RO, Steinberg SJ, Lorey F, Panny SR, Vogt RF Jr, Macaya D, Turgeon CT, Tortorelli S, Raymond GV. 2009. Newborn screening for X-linked adrenoleukodystrophy (X-ALD): validation of a combined liquid chromatography-tandem mass spectrometric (LC-MS/MS) method. *Mol Genet Metab.* 97(3):212-220.
- Hudspeth MP, Raymond GV. 2007. Immunopathogenesis of adrenoleukodystrophy: current understanding. *J Neuroimmunol.* 182(1-2):5-12.
- Hulshagen L, Krysko O, Bottelbergs A, Huyghe S, Klein R, Van Veldhoven PP, De Deyn PP, D'Hooge R, Hartmann D, Baes M. 2008. Absence of functional peroxisomes from mouse CNS causes dysmyelination and axon degeneration. *J Neurosci.* 28(15):4015-4027.
- Hunt JV, Wolff SP. 1991. The role of histidine residues in the nonenzymic covalent attachment of glucose and ascorbic acid to protein. *Free Radic Res Commun.* 14(4):279-287.
- Hwang JJ, Lee SJ, Kim TY, Cho JH, Koh JY. 2008. Zinc and 4-hydroxy-2-nonenal mediate lysosomal membrane permeabilization induced by H₂O₂ in cultured hippocampal neurons. *J Neurosci.* 28(12):3114-3122.

I

- Igarashi M, Schaumburg HH, Powers J, Kishimoto Y, Kolodny E, Suzuki K. 1976. Fatty acid abnormality in adrenoleukodystrophy. *J Neurochem.* 26(4):851-860.
- Ito M, Blumberg BM, Mock DJ, Goodman AD, Moser AB, Moser HW, Smith KD, Powers JM. 2001. Potential environmental and host participants in the early white matter lesion of adreno-leukodystrophy: morphologic evidence for CD8 cytotoxic T cells, cytolysis of oligodendrocytes, and CD1-mediated lipid antigen presentation. *J Neuropathol Exp Neurol.* 60(10):1004-1019.

I

- Jacob C, Knight I, Winyard PG. 2006. Aspects of the biological redox chemistry of cysteine: from simple redox responses to sophisticated signalling pathways. *Biol Chem.* 387:1385-1397.
- Janssen A, Gressens P, Grabenbauer M, Baumgart E, Schad A, Vanhorebeek I, Brouwers A, Declercq PE, Fahimi D, Evrard P, Schoonjans L, Collen D, Carmeliet P, Mannaerts G, Van Veldhoven P, Baes M. 2003. Neuronal migration depends on intact peroxisomal function in brain and in extraneuronal tissues. *J Neurosci.* 23(30):9732-9741.
- Jedlitschky G, Huber M, Volkl A, Muller M, Leier I, Mtiller J, Lehmann WD, Fahimi HD, Keppler D. 1991. Peroxisomal degradation of leukotrienes by β -oxidation from the omega-end. *J. Biol. Chem.* 266:24763-24772.
- Jia Z, Pei Z, Li Y, Wei L, Smith KD, Watkins PA. 2004. X-linked adrenoleukodystrophy: role of very long-chain acyl-CoA synthetases. *Mol Genet Metab.* 83(1-2):117-127.
- Johansson AS, Haeggström JZ, Hultenby K, Palmblad J. 2010. Subcellular localization of leukotriene receptors in human endothelial cells. *Exp Cell Res.* 316(17):2790-2796.

K

- Kabeya Y, Mizushima N, Ueno T, Yamamoto A, Kirisako T, Noda T, Kominami E, Ohsumi Y, Yoshimori T. 2000. LC3, a mammalian homologue of yeast Apg8p, is localized in autophagosome membranes after processing. *EMBO J.* 19(21):5720-5728.
- Kamiryo T, Abe M, Okasaki K, Kato S, Shimamoto N. 1982. Absence of DNA in peroxisomes of *Candida tropicalis*. *Journal of Bacteriology.* 152:269-274.
- Kashiwayama Y, Seki M, Yasui A, Murasaki Y, Morita M, Yamashita Y, Sakaguchi M, Tanaka Y, Imanaka T. 2009. 70-kDa peroxisomal membrane protein related protein (P70R/ABCD4) localizes to endoplasmic reticulum not peroxisomes, and NH2-terminal hydrophobic property determines the subcellular localization of ABC subfamily D proteins. *Exp Cell Res.* 315(2):190-205.
- Kassmann CM, Lappe-Siefke C, Baes M, Brügger B, Mildner A, Werner HB, Natt O, Michaelis T, Prinz M, Frahm J, Nave KA. 2007. Axonal loss and neuroinflammation caused by peroxisome-deficient oligodendrocytes. *Nat Genet.* 39(8):969-976.
- Kassmann CM, Nave KA. 2008. Oligodendroglial impact on axonal function and survival - a hypothesis. *Curr Opin Neurol.* 21(3):235-241.
- Kawajiri H, Hsi LC, Kamitani H, Ikawa H, Geller M, Ward T, Eling TE, Glasgow WC. 2002. Arachidonic and linoleic acid metabolism in mouse intestinal tissue: evidence for novel lipoxygenase activity. *Arch Biochem Biophys.* 398(1):51-60.
- Kemp S, Valianpour F, Denis S, Ofman R, Sanders RJ, Mooyer P, Barth PG, Wanders RJ. 2005. Elongation of very long-chain fatty acids is enhanced in X-linked adrenoleukodystrophy. *Mol Genet Metab.* 84(2):144-151. Erratum in: *Mol Genet Metab.* 2008. 93(3):350.
- Kemp S, Wanders R. 2010. Biochemical aspects of X-linked adrenoleukodystrophy. *Brain Pathol.* 20(4):831-837.
- Kemp S, Wanders RJ. 2007. X-linked adrenoleukodystrophy: very long-chain fatty acid metabolism, ABC half-transporters and the complicated route to treatment. *Mol Genet Metab.* 90(3):268-276.
- Keppler D, Müller M, Klünemann C, Guhlmann A, Krauss K, Müller J, Berger U, Leier I, Mayatepek E. 1992. Transport and in vivo elimination of cysteinyl leukotrienes. *Adv Enzyme Regul.* 32:107-116.
- Keppler D, Huber M, Baumert T, Guhlmann A. 1989. Metabolic inactivation of leukotrienes. *Adv. Enzyme Regul.* 28:307-319.

REFERENCES

- Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. 1972. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer*. 26(4):239-257.
- Khan M, Pahan K, Singh AK, Singh I. 1998. Cytokine-induced accumulation of very long-chain fatty acids in rat C6 glial cells: implication for X-adrenoleukodystrophy. *J Neurochem*. 71(1):78-87.
- Khan M, Singh J, Gilg AG, Uto T, Singh I. 2010. Very long-chain fatty acid accumulation causes lipotoxic response via 5-lipoxygenase in cerebral adrenoleukodystrophy. *J Lipid Res*. 51(7):1685-1695.
- Khan M, Singh J, Singh I. 2008. Plasmalogen deficiency in cerebral adrenoleukodystrophy and its modulation by lovastatin. *J Neurochem*. 106(4):1766-1779.
- Kim PK, Mullen RT, Schumann U, Lippincott-Schwartz J. 2006. The origin and maintenance of mammalian peroxisomes involves a de novo PEX16-dependent pathway from the ER. *J Cell Biol*. 173(4):521-532.
- Kinnula VL, Crapo JD, Raivio KO. 1995. Generation and disposal of reactive oxygen metabolites in the lung. *Lab Invest*. 73(1):3-19.
- Kitanaka C, Kuchino Y. 1999. Caspase-independent programmed cell death with necrotic Morphology. *Cell Death Differ*. 6: 508-515.
- Klionsky DJ, Emr SD. 2000. Autophagy as a regulated pathway of cellular degradation. *Science*. 290(5497):1717-1721.
- Knazek RA, Rizzo WB, Schulman JD, Dave JR. 1983. Membrane microviscosity is increased in the erythrocytes of patients with adrenoleukodystrophy and adrenomyeloneuropathy. *J Clin Invest*. 72(1):245-248.
- Kobayashi T, Shinnoh N, Kondo A, Yamada T. 1997. Adrenoleukodystrophy protein-deficient mice represent abnormality of very long chain fatty acid metabolism. *Biochem Biophys Res Commun*. 232(3):631-236.
- Koch A, Thiemann M, Grabenbauer M, Yoon Y, McNiven MA, Schrader M. 2003. Dynamin-like protein 1 is involved in peroxisomal fission. *J Biol Chem*. 278(10):8597-8605.
- Kohlschutter A, Schade B, Blomer B, Hubner C. 1993. Low erythrocyte plasmalogen and plasma docosahexaenoic acid (DHA) in juvenile neuronal ceroid-lipofuscinosis (JNCL). *J. Inherit. Metab. Dis*. 16:299-304.
- Kourtis N, Tavernarakis N. 2009. Autophagy and cell death in model organisms. *Cell Death Differ*. 16(1):21-30.
- Kroemer G, Galluzzi L, Vandenabeele P, Abrams J, Alnemri ES, Baehrecke EH, Blagosklonny MV, El-Deiry WS, Golstein P, Green DR, Hengartner M, Knight RA, Kumar S, Lipton SA, Malorni W, Nuñez G, Peter ME, Tschopp J, Yuan J, Piacentini M, Zhivotovsky B, Melino G. 2009. Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death. *Cell Death Differ*. 16(1):3-11.
- Kristofikova Z, Kopecky V, Hofbauerova K, Hovorkova P, Ripova D. 2008. Complex of Amyloid b Peptides with 24-Hydroxycholesterol and Its Effect on Hemicholinium-3 Sensitive Carriers. *Neurochem Res* 33:412–421
- Krysco O, Hulshagen L, Janssen A, Schütz G, Klein R, De Bruycker M, Espeel M, Gressens P, Baes M. 2007. Neocortical and cerebellar developmental abnormalities in conditions of selective elimination of peroxisomes from brain or from liver. *J Neurosci Res*. 85(1):58-72.
- Kuczynski B, Reo NV. 2006. Evidence that plasmalogen is protective against oxidative stress in the rat brain. *Neurochem Res*. 31:58-72.
- Kunau WH. 2005. Peroxisome biogenesis: end of the debate. *Curr Biol*. 15(18):R774-R776.
- Kurz T, Gustafsson B, Brunk UT. 2006. Intralysosomal iron chelation protects against oxidative stress-induced cellular damage. *FEBS J*. 273(13):3106-3117.

L

- Lachtermacher MB, Seuánez HN, Moser AB, Moser HW, Smith KD. 2000. Determination of 30 X-linked adrenoleukodystrophy mutations, including 15 not previously described. *Hum Mutat.* 15(4):348-353.
- Lagarkova MA, Iarovaia OV, Razin SV. 1995. Large-scale fragmentation of mammalian DNA in the course of apoptosis proceeds via excision of chromosomal DNA loops and their oligomers. *J Biol Chem.* 270(35):20239-20241.
- Larsson DA, Baird S, Nyhalah JD, Yuan XM, Li W. 2006. Oxysterol mixtures, in atheroma-relevant proportions, display synergistic and proapoptotic effects. *Free Radic Biol Med* 41(6):902-10.
- Lawson JA, Rokach J, FitzGerald GA. 1999. Isoprostanes: formation, analysis and use as indices of lipid peroxidation in vivo. *J Biol Chem.* 274:24441–24444.
- Lazarow PB. 2003. Peroxisome biogenesis: advances and conundrums. *Current Opinion in Cell Biology.* 15:489-497.
- Lazarow PB, Fujiki Y. 1985. Biogenesis of peroxisomes. *Annu Rev Cell Biol.* 1:489-530.
- Lei XG. 2002. In vivo antioxidant role of glutathione peroxidase: evidence from knockout mice. *Methods Enzymol.* 347:213-225.
- Lee SH, Blair IA. 2001. Oxidative DNA damage and cardiovascular disease. *Trends Cardiovasc Med.* 11:148–155.
- Leoni V, Lütjohann D, Masterman T. 2005. Levels of 7-oxocholesterol in cerebrospinal fluid are more than one thousand times lower than reported in multiple sclerosis. *J Lipid Res.* 46(2):191-5.
- Levine B, Kroemer G. 2009. Autophagy in aging, disease and death: the true identity of a cell death impostor. *Cell Death Differ.* 16(1):1-2.
- Lewis RA, Austen KF. 1984. The biologically active leukotrienes. *J Clin Invest.* 73:889-897.
- Leung RK, Whittaker PA. 2005. RNA interference: from gene silencing to gene-specific therapeutics. *Pharmacol Ther.* 107(2):222-39.
- Li W, Hellsten A, Xu LH, Zhuang DM, Jansson K, Brunk UT, Yuan XM. 2005. Foam cell death induced by 7 β -hydroxycholesterol is mediated by labile iron-driven oxidative injury: mechanisms underlying induction of ferritin in human atheroma. *Free Radic Biol Med* 39(7):864-75.
- Liu X, Kim CN, Yang J, Jemmerson R, Wang X. 1996. Induction of apoptotic program in cell-free extracts: requirement for dATP and cytochrome c. *Cell.* 86(1):147-157.
- Lizard G, Fournel S, Genestier L, Dhedin N, Chaput C, Flacher M, Mutin M, Panaye G, Revillard JP. 1995. Kinetics of plasma membrane and mitochondrial alterations in cells undergoing apoptosis. *Cytometry.* 21(3):275-283.
- Long EK, Picklo MJ Sr. 2010. Trans-4-hydroxy-2-hexenal, a product of n-3 fatty acid peroxidation: make some room HNE. *Free Radic Biol Med.* 49(1):1-8.
- Lorch S, Lightfoot R, Ohshima H, Virág L, Chen Q, Hertkorn C, Weiss M, Souza J, Ischiropoulos H, Yermilov V, Pignatelli B, Masuda M, Szabó C. 2002. Detection of peroxynitrite-induced protein and DNA modifications. *Methods Mol Biol.* 196:247–275.
- Lu JF, Barron-Casella E, Deering R, Heinzer AK, Moser AB, deMesy Bentley KL, Wand GS, C McGuinness M, Pei Z, Watkins PA, Pujol A, Smith KD, Powers JM. 2007. The role of peroxisomal ABC transporters in the mouse adrenal gland: the loss of Abcd2 (ALDR), Not Abcd1 (ALD), causes oxidative damage. *Lab Invest.* 87(3):261-272.
- Lu JF, Lawler AM, Watkins PA, Powers JM, Moser AB, Moser HW, Smith KD. 1997. A mouse model for X-linked adrenoleukodystrophy. *Proc Natl Acad Sci.* 94(17):9366-9371.

M

- Maeba R, Ueta N. 2003a. Ethanolamine plasmalogen and cholesterol reduce the total membrane oxidizability measured by the oxygen uptake method. *Biochem Biophys Res Commun.* 302(2):265-270.
- Maeba R, Ueta N. 2003b. Ethanolamine plasmalogens prevent the oxidation of cholesterol by reducing the oxidizability of cholesterol in phospholipid bilayers. *J Lipid Res.* 44(1):164-171.
- Maier CS, Chavez J, Wang J, Wu J. 2010. Protein adducts of aldehydic lipid peroxidation products identification and characterization of protein adducts using an aldehyde/keto-reactive probe in combination with mass spectrometry. *Methods Enzymol.* 473:305-330.
- Majno G, Joris I. 1995. Apoptosis, oncosis, and necrosis. An overview of cell death. *Am J Pathol.* 146(1):3-15.
- Makkar RS, Contreras MA, Paintlia AS, Smith BT, Haq E, Singh I. 2006. Molecular organization of peroxisomal enzymes: protein-protein interactions in the membrane and in the matrix. *Arch Biochem Biophys.* 451(2):128-140.
- Malvitte L, Montange T, Vejux A, Joffre C, Bron A, Creuzot-Garcher C, Lizard G. 2008. Activation of a caspase-3-independent mode of cell death associated with lysosomal destabilization in cultured human retinal pigment epithelial cells (ARPE-19) exposed to 7beta-hydroxycholesterol. *Curr Eye Res.* 33(9):769-781.
- Marnett LJ. 1999. Lipid peroxidation-DNA damage by malondialdehyde. *Mutat Res.* 424(1-2):83-95.
- Marques C, Pereira P, Taylor A, Liang JN, Reddy VN, Szweda LI, Shang F. 2004. Ubiquitin-dependent lysosomal degradation of the HNE-modified proteins in lens epithelial cells. *FASEB J.* 18(12):1424-1426.
- Massaad CA, Klann E. 2010. Reactive Oxygen Species in the Regulation of Synaptic Plasticity and Memory. *Antioxid Redox Signal.* In Press. PMID: 20649473
- Massey JB, Pownall HJ. 2005. Role of oxysterol structure on the microdomain-induced microsolubilization of phospholipid membranes by apolipoprotein A-I. *Biochemistry* 44(43):14376-84.
- Mayatepek E, Baumann M, Meissner T, Hanefeld F, Korenke GC. 2003. Role of leukotrienes as indicators of the inflammatory demyelinating reaction in x-linked cerebral adrenoleukodystrophy. *J Neurol.* 250(10):1259-1260.
- Mayatepek E, Lehmann WD, Fauler J, Tsikas D, Frolich JC, Schutgens RB, Wanders RJ, Keppler D. 1993. Impaired Degradation of Leukotrienes in Patients with Peroxisome Deficiency Disorders. *J. Clin. Invest.* 91:881-888.
- Mayatepek E, Tjepelmann B. 1996. Defective degradation of leukotrienes in peroxisomal-deficient human hepatocytes. *Biochem Biophys Res Commun.* 227(1):131-134.
- McCracken E, Valeriani V, Simpson C, Jover T, McCulloch J, Dewar D. 2000. The lipid peroxidation by-product 4-hydroxynonenal is toxic to axons and oligodendrocytes. *J Cereb Blood Flow Metab.* 20(11):1529-1536.
- McEvoy L, Schlegel RA, Williamson P, Del Buono BJ. 1988. Merocyanine 540 as a flow cytometric probe of membrane lipid organization in leukocytes. *J Leukoc Biol.* 44(5):337-344.
- McGuinness MC, Powers JM, Bias WB, Schmeckpeper BJ, Segal AH, Gowda VC, Wesselingh SL, Berger J, Griffin DE, Smith KD. 1997. Human leukocyte antigens and

REFERENCES

- cytokine expression in cerebral inflammatory demyelinating lesions of X-linked adrenoleukodystrophy and multiple sclerosis. *J Neuroimmunol.* 75(1-2):174-182.
- Meier P, Finch A, Evan G. 2000. Apoptosis in development. *Nature.* 407:796-801.
- Melino G. 2001. The Sirens' song. *Nature.* 412(6842):23.
- Michels PA, Moyersoen J, Krazy H, Galland N, Herman MHannaert V. 2005. Peroxisomes, glyoxysomes and glycosomes. *Mol Membr Biol.* 22(1-2):133-145.
- Miguet-Alfonsi C, Prunet C, Monier S, Bessède G, Lemaire-Ewing S, Berthier A, Ménétrier F, Néel D, Gamber P, Lizard G. 2002. Analysis of oxidative processes and of myelin figures formation before and after the loss of mitochondrial transmembrane potential during 7 β -hydroxycholesterol and 7-ketocholesterol-induced apoptosis: comparison with various pro-apoptotic chemicals. *Biochem Pharmacol* 64(3):527-41.
- Miyazawa S, Hashimoto T, Yokota S. 1985. Identity of long-chain acyl-coenzyme A synthetase of microsomes, mitochondria, and peroxisomes in rat liver. *J Biochem.* 98(3):723-733.
- Molina-Holgado E, Vela JM, Arévalo-Martín A, Guaza C. 2001. LPS/IFN- γ cytotoxicity in oligodendroglial cells: role of nitric oxide and protection by the anti-inflammatory cytokine IL-10. *Eur J Neurosci.* 13(3):493-502.
- Morita M, Kanai M, Mizuno S, Iwashima M, Hayashi T, Shimozaawa N, Suzuki Y, Imanaka T. 2008. Baicalein 5,6,7-trimethyl ether activates peroxisomal but not mitochondrial fatty acid β -oxidation. *J Inher Metab Dis.* 31(3):442-449.
- Morita M, Takahashi I, Kanai M, Okafuji F, Iwashima M, Hayashi T, Watanabe S, Hamazaki T, Shimozaawa N, Suzuki Y, Furuya H, Yamada T, Imanaka T. 2005. Baicalein 5,6,7-trimethyl ether, a flavonoid derivative, stimulates fatty acid β -oxidation in skin fibroblasts of X-linked adrenoleukodystrophy. *FEBS Lett.* 579(2):409-414.
- Mormone E, Matarrese P, Tinari A, Cannella M, Maglione V, Farrace MG, Piacentini M, Frati L, Malorni W, Squitieri F. 2006. Genotype-dependent priming to self- and xenocannibalism in heterozygous and homozygous lymphoblasts from patients with Huntington's disease. *J Neurochem.* 98(4):1090-1099.
- Moser HW. 1997. Adrenoleukodystrophy: phenotype, genetics, pathogenesis and therapy. *Brain.* 120:1485-1508.
- Moser HW, Fatemi A, Zackowski K, Smith S, Golay X, Muenz L, Raymond G. 2004. Evaluation of therapy of X-linked adrenoleukodystrophy. *Neurochemical research.* 29(5):1003-1016.
- Moser HW, Moser AB, Frayer KK, Chen W, Schulman JD, O'Neill BP, Kishimoto Y. 1998. Adrenoleukodystrophy: increased plasma content of saturated very long chain fatty acids. *Neurology.* 51(2):334-343.
- Moser HW, Raymond GV, Dubey P. 2005. Adrenoleukodystrophy: new approaches to a neurodegenerative disease. *JAMA.* 294(24):3131-3134.
- Mosser J, Douar AM, Sarde CO, Kioschis P, Feil R, Moser H, Poustka AM, Mandel JL, Aubourg P. 1993. Putative X-linked adrenoleukodystrophy gene shares unexpected homology with ABC transporters. *Nature.* 361(6414):726-730.
- Mullen RT, Flynn CR, Trelease RN. 2001. How are peroxisomes formed? The role of the endoplasmic reticulum and peroxins. *Trends Plant Sci.* 6(6):256-261.
- Munafó DB, Colombo MI. 2001. A novel assay to study autophagy: regulation of autophagosome vacuole size by amino acid deprivation. *J Cell Sci.* 114(Pt 20):3619-3629.
- Murphy RC, Hammarstrom S, Samuelsson B. 1979. Leukotriene C: a slow-reacting substance from murine mastocytoma cells. *Proc Natl Acad Sci. USA.* 76:4275-4279.
- Mytilineou C, Kramer BC, Yabut JA. 2002. Glutathione depletion and oxidative stress. *Parkinsonism Relat Disord.* 8(6):385-387.

N

- Nagan N, Zoeller RA. 2001. Plasmalogens: biosynthesis and functions. *Prog Lipid Res.* 40(3):199-229.
- Nakamura A, Kawakami K, Kametani F, Nakamoto H, Goto S. 2010. Biological significance of protein modifications in aging and calorie restriction. *Ann N Y Acad Sci.* 1197:33-39.
- Narala VR, Adapala RK, Suresh MV, Brock TG, Peters-Golden M, Reddy RC. 2010. Leukotriene B4 is a physiologically relevant endogenous peroxisome proliferator-activated receptor- α agonist. *J Biol Chem.* 285(29):22067-22074.
- Nave KA. 1994. Neurological mouse mutants and the genes of myelin. *J Neurosci Res.* 38:607-612.
- Neuspiel M, Schauss AC, Braschi E, Zunino R, Rippstein P, Rachubinski RA, Andrade-Navarro MA, McBride HM. 2008. Cargo-selected transport from the mitochondria to peroxisomes is mediated by vesicular carriers. *Curr Biol.* 18:102-108.
- Nilsson C, Johansson U, Johansson AC, Kågedal K, Ollinger K. 2006. Cytosolic acidification and lysosomal alkalization during TNF- α induced apoptosis in U937 cells. *Apoptosis.* 11(7):1149-1159.
- Novikoff AB, and Shin WY. 1964. The endoplasmic reticulum in the golgi zone and its relations to microbodies, golgi apparatus and autophagic vacuoles in rat liver cells. *J Microsc.* 3:187-206.

O

- Oaxaca-Castillo D, Andreoletti P, Vluggens A, Yu S, van Veldhoven PP, Reddy JK, Cherkaoui-Malki M. 2007. Biochemical characterization of two functional human liver acyl-CoA oxidase isoforms 1a and 1b encoded by a single gene. *Biochem Biophys Res Commun.* 360(2):314-319.
- Oezen I, Rossmannith W, Forss-Petter S, Kemp S, Voightländer T, Moser-Thier K, Wanders RJ, Bittner RE, Berger J. 2005. Accumulation of very long-chain fatty acids does not affect mitochondrial function in adrenoleukodystrophy protein deficiency. *Hum Mol Genet.* 14(9):1127-1137.
- Ofman R, Dijkstra IM, van Roermund CW, Burger N, Turkenburg M, van Cruchten A, van Engen CE, Wanders RJ, Kemp S. 2010. The role of ELOVL1 in very long-chain fatty acid homeostasis and X-linked adrenoleukodystrophy. *EMBO Mol Med.* 2(3):90-97.
- Ohsumi Y. 2001. Molecular dissection of autophagy: two ubiquitin-like systems. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2:211-216.
- Orrenius S, Zhivotovsky B, Nicotera P. 2003. Regulation of cell death: the calcium-apoptosis link. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 4(7):552-565.

P

- Paintlia AS, Gilg AG, Khan M, Singh AK, Barbosa E, Singh I. 2003. Correlation of very long chain fatty acid accumulation and inflammatory disease progression in childhood X-ALD: implications for potential therapies. *Neurobiol Dis.* 14(3):425-439.
- Pamplona R, Dalfó E, Ayala V, Bellmunt MJ, Prat J, Ferrer I, Portero-Otín M. 2005. Proteins in human brain cortex are modified by oxidation, glycooxidation, and lipoxidation. Effects of Alzheimer disease and identification of lipoxidation targets. *J Biol Chem.* 280(22):21522-21530.
- Parrish J, Li L, Klotz K, Ledwich D, Wang X, Xue D. 2001. Mitochondrial endonuclease G is important for apoptosis in *C. elegans*. *Nature.* 412(6842):90-94.

REFERENCES

- Paruchuri S, Jiang Y, Feng C, Francis SA, Plutzky J, Boyce JA. 2008. Leukotriene E4 activates peroxisome proliferator-activated receptor gamma and induces prostaglandin D2 generation by human mast cells. *J Biol Chem.* 283(24):16477-16487.
- Peters C, Charnas LR, Tan Y, Ziegler RS, Shapiro EG, DeFor T, Grewal SS, Orchard PJ, Abel SL, Goldman AI, Ramsay NK, Dusenbery KE, Loes DJ, Lockman LA, Kato S, Aubourg PR, Moser HW, Krivit W. 2004. Cerebral X-linked adrenoleukodystrophy: the international hematopoietic cell transplantation experience from 1982 to 1999. *Blood.* 104(3):881-888. Erratum in: *Blood.* 2004. 104(13):3857.
- Petroni A, Cappa M, Carissimi R, Blasevich M, Uziel G. 2007. Effect of testosterone metabolites on ABC half-transporter relative gene expression in X-linked adrenoleukodystrophy. *J Inherit Metab Dis.* 30(5):828.
- Pettus BJ, Baes M, Busman M, Hannun YA, Van Veldhoven PP. 2004. Mass spectrometric analysis of ceramide perturbations in brain and fibroblasts of mice and human patients with peroxisomal disorders. *Rapid Commun Mass Spectrom.* 18(14):1569-1574.
- Pillai BK, Jasuja R, Simard JR, Hamilton JA. 2009. Fast diffusion of very long chain saturated fatty acids across a bilayer membrane and their rapid extraction by cyclodextrins: implications for adrenoleukodystrophy. *J Biol Chem.* 284(48):33296-33304.
- Platta HW, Erdmann R. 2007. Peroxisomal dynamics. *Trends cell biol.* 17(10):474-484.
- Powers JM, Moser HW. 1998. Peroxisomal disorders: genotype, phenotype, major neuropathologic lesions, and pathogenesis. *Brain Pathol.* 8(1):101-120.
- Powers JM, Liu Y, Moser AB, Moser HW. 1992. The inflammatory myelinopathy of adrenoleukodystrophy: cells, effector molecules, and pathogenetic implications. *J Neuropathol Exp Neurol.* 51(6):630-643.
- Powers JM, Pei Z, Heinzer AK, Deering R, Moser AB, Moser HW, Watkins PA, Smith KD. 2005. Adreno-leukodystrophy: oxidative stress of mice and men. *J Neuropathol Exp Neurol.* 64(12):1067-1079.
- Prunet C, Lemaire-Ewing S, Ménétrier F, Néel D, Lizard G. 2005. Activation of caspase-3-dependent and -independent pathways during 7-ketocholesterol- and 7beta-hydroxycholesterol-induced cell death: a morphological and biochemical study. *J Biochem Mol Toxicol.* 19(5):311-326.
- Pujol A, Ferrer I, Camps C, Metzger E, Hindelang C, Callizot N, Ruiz M, Pàmols T, Giròs M, Mandel JL. 2004. Functional overlap between ABCD1 (ALD) and ABCD2 (ALDR) transporters: a therapeutic target for X-adrenoleukodystrophy. *Hum Mol Genet.* 13(23):2997-3006.
- Pujol A, Hindelang C, Callizot N, Bartsch U, Schachner M, Mandel JL. 2002. Late onset neurological phenotype of the X-ALD gene inactivation in mice: a mouse model for adrenomyeloneuropathy. *Hum Mol Genet.* 11(5):499-505.
- Purdue PE, Lazarow PB. 2001. Peroxisome Biogenesis. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 17:701-752.



- Radak Z, Boldogh I. 2010. 8-Oxo-7,8-dihydroguanine: links to gene expression, aging, and defense against oxidative stress. *Free Radic Biol Med.* 49(4):587-596.
- Raff MC, Whitmore AV, Finn JT. 2002. Axonal self-destruction and neurodegeneration. *Science.* 296(5569):868-871.
- Rahman I, Biswas SK, Kode A. 2006. Oxidant and antioxidant balance in the airways and airway diseases. *Eur J Pharmacol.* 533:222-239.

REFERENCES

- Raymond GV, Seidman R, Monteith TS, Kolodny E, Sathe S, Mahmood A, Powers JM. 2010. Head trauma can initiate the onset of adreno-leukodystrophy. *J Neurol Sci.* 290(1-2):70-74.
- Reddy TS, Horrocks LA. 1982. Effects of neonatal undernutrition on the lipid composition of gray matter and white matter in rat brain. *J. Neurochem.* 38(3):601-605.
- Repnik U, Turk B. 2010. Lysosomal-mitochondrial cross-talk during cell death. *Mitochondrion.* PMID:20696281.
- Rhodin J. 1954. Correlation of ultrastructure organization and function in normal and experimentally changed proximal convoluted tubule cells of the mouse kidney. Karolinska Institute, Stockholm.
- Rönicke S, Kruska N, Kahlert S, Reiser G. 2009. The influence of the branched-chain fatty acids pristanic acid and Refsum disease-associated phytanic acid on mitochondrial functions and calcium regulation of hippocampal neurons, astrocytes, and oligodendrocytes. *Neurobiol Dis.* 36(2):401-410.
- Rothstein JD. 2009. Current hypotheses for the underlying biology of amyotrophic lateral sclerosis. *Ann. Neurol.* 65 Suppl 1:S3-S9.
- Roussi S, Gossé F, Aoudé-Werner D, Zhang X, Marchioni E, Geoffroy P, Miesch M, Raul F. 2007. Mitochondrial perturbation, oxidative stress and lysosomal destabilization are involved in 7beta-hydroxysterol and 7beta-hydroxycholesterol triggered apoptosis in human colon cancer cells. *Apoptosis.* 12(1):87-96.
- Royer MC, Lemaire-Ewing S, Desrumaux C, Monier S, Pais de Barros JP, Athias A, Néel D, Lagrost L. 2009. 7-ketocholesterol incorporation into sphingolipid/cholesterol-enriched (lipid raft) domains is impaired by vitamin E: a specific role for alpha-tocopherol with consequences on cell death. *J Biol Chem.* 284(23):15826-15834.
- Russel DW. 2003. The enzymes, regulation, and genetics of bile acid synthesis. *Annu Rev Biochem.* 72:137-174.
- S
- Sakai Y, Oku M, van der Klei IJ, Kiel JA. 2006. Pexophagy: autophagic degradation of peroxisomes. *Biochim Biophys Acta.* 1763(12):1767-1775.
- Sala A, Folco G, Murphy RC. 2010. Transcellular biosynthesis of eicosanoids. *Pharmacol Rep.* 62(3):503-510.
- Salmon AB, Richardson A, Pérez VI. 2010. Update on the oxidative stress theory of aging: does oxidative stress play a role in aging or healthy aging? *Free Radic Biol Med.* 48(5):642-655.
- Samuelsson B, Dahlen SE, Lindgren JA, Rouzer CA, Serhan CN. 1987. Leukotrienes and lipoxins: structures, biosynthesis, and biological effects. *Science.* 237:1171-1176.
- Sayre LM, Lin D, Yuan Q, Zhu X, Tang X. 2006. Protein adducts generated from products of lipid oxidation: focus on HNE and one. *Drug Metab Rev.* 38(4):651-675.
- Schlüter A, Fourcade S, Domènech-Estévez E, Gabaldón T, Huerta-Cepas J, Berthommier G, Ripp R, Wanders RJ, Poch O, Pujol A. 2007. PeroxisomeDB: a database for the peroxysomal proteome, functional genomics and disease *Nucleic Acids Res.* 35, D815-D822.
- Schotte P, Schauvliege R, Janssens S, Beyaert R. 2001. The cathepsin B inhibitor z-FA.fmk inhibits cytokine production in macrophages stimulated by lipopolysaccharide. *J Biol Chem.* 276(24):21153-21157.
- Schrader M, Fahimi HD. 2004. Mammalian peroxisomes and reactive oxygen species. *Histochem Cell Biol.* 122(4):383-393.

REFERENCES

- Schrader M, Fahimi HD. 2006. Peroxisomes and oxidative stress. *Biochim Biophys Acta*. 1763(12):1755-1766.
- Schrader M, and Fahimi HD. 2008. The peroxisome: still a mysterious organelle. *Histochem Cell Biol*. 129(4):421-440.
- Schrader M, Reuber BE, Morrell JC, Jimenez-Sanchez G, Obie C, Stroh TA, Valle D, Schroer TA, Gould SJ. 1998. Expression of PEX11beta mediates peroxisome proliferation in the absence of extracellular stimuli. *J Biol Chem*. 273(45):29607-29614.
- Schrader M, Yoon Y. 2007. Mitochondria and peroxisomes: are the 'big brother' and the 'little sister' closer than assumed? *Bioessays*. 29:1105-1114.
- Schrakamp G, Schutgens RB, Wanders RJ, Heymans HS, Tager JM, Van den Bosch H. 1985. The cerebro-hepato-renal (Zellweger) syndrome. Impaired de novo biosynthesis of plasmalogens in cultured skin fibroblasts. *Biochim Biophys Acta*. 833:170-174.
- Schroepfer GJ Jr. 2000. Oxysterols: modulators of cholesterol metabolism and other processes. *Physiol Rev* 80(1):361-554.
- Schumann U, Subramani S. 2008. Special delivery from mitochondria to peroxisomes. *Trends Cell Biol*. 18(6):253-256.
- Scott RC, Juhász G, Neufeld TP. 2007. Direct induction of autophagy by Atg1 inhibits cell growth and induces apoptotic cell death. *Curr Biol*. 17(1):1-11.
- Sedelnikova OA, Redon CE, Dickey JS, Nakamura AJ, Georgakilas AG, Bonner WM. 2010. Role of oxidatively induced DNA lesions in human pathogenesis. *Mutat Res*. 704(1-3):152-159.
- Seet RC, Lee CY, Lim EC, Tan JJ, Quek AM, Chong WL, Looi WF, Huang SH, Wang H, Chan YH, Halliwell B. (2010) Oxidative damage in Parkinson disease: Measurement using accurate biomarker. *Free Radic. Biol. Med*. 48:560-566.
- Shapiro E, Krivit W, Lockman L, Jambaqué I, Peters C, Cowan M, Harris R, Blanche S, Bordigoni P, Loes D, Ziegler R, Crittenden M, Ris D, Berg B, Cox C, Moser H, Fischer A, Aubourg P. 2000. Long-term effect of bone-marrow transplantation for childhood-onset cerebral X-linked adrenoleukodystrophy. *Lancet*. 356(9231):713-718.
- Sies H. 1997. Oxidative stress: oxidants and antioxidants. *Exp Physiol*. 82(2):291-295.
- Simonian NA, and Coyle JT. 1996. Oxidative stress in neurodegenerative diseases. *Annual Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 36:83-106.
- Singh H, Beckman K, Poulos A. 1993. Exclusive localization in peroxisomes of dihydroxyacetone phosphate acyltransferase and alkyl-dihydroxyacetone phosphate synthase in rat liver. *J Lipid Res*. 34:467-477.
- Singh I, Pujol A. 2010. Pathomechanisms underlying X-adrenoleukodystrophy: a three-hit hypothesis. *Brain Pathol*. 20(4):838-844.
- Singh J, Khan M, Singh I. 2009. Silencing of Abcd1 and Abcd2 genes sensitizes astrocytes for inflammation: implication for X-adrenoleukodystrophy. *J Lipid Res*. 50(1):135-147.
- Singh R, Kaushik S, Wang Y, Xiang Y, Novak I, Komatsu M, Tanaka K, Cuervo AM, Czaja MJ. 2009. Autophagy regulates lipid metabolism. *Nature*. 458(7242):1131-1135.
- Singh R. 2010. Autophagy and regulation of lipid metabolism. *Results Probl Cell Differ*. 52:35-46.
- Smith KD, Kemp S, Braiterman LT, Lu JF, Wei HM, Geraghty M, Stetten G, Bergin JS, Pevsner J, Watkins PA. 1999. X-linked adrenoleukodystrophy: genes, mutations, and phenotypes. *Neurochem Res*. 24(4):521-535.
- Smith MA, Perry G. 1995. Free radical damage, iron, and Alzheimer's disease. *J Neurol Sci*. 134 Suppl:92-94.
- Sperandio S, de Belle I, Bredesen DE. 2000. An alternative, nonapoptotic form of programmed cell death. *Proc Natl Acad Sci USA*. 97(26):14376-14381.

REFERENCES

- Sprinkle TJ. 1989. 2',3'-cyclic nucleotide 3'-phosphodiesterase, an oligodendrocyte-Schwann cell and myelin-associated enzyme of the nervous system. *Crit Rev Neurobiol.* 4(3):235-301.
- Stadtman ER, Starke-Reed PE, Oliver CN, Carney JM, Floyd RA. 1992. Protein modification in aging. *EXS.* 62:64-72.
- Stadtman ER. 1992. Protein oxidation and aging. *Science.* 257(5074):1220-1224.
- Stefanis L, Larsen KE, Rideout HJ, Sulzer D, Greene LA. 2001. Expression of A53T mutant but not wild-type alpha-synuclein in PC12 cells induces alterations of the ubiquitin-dependent degradation system, loss of dopamine release, and autophagic cell death. *J Neurosci.* 21(24):9549-9560.
- Steinberg SJ, Kemp S, Braiterman LT, Watkins PA. 1999 Role of very-long-chain acyl-coenzyme A synthetase in X-linked adrenoleukodystrophy. *Ann Neurol.* 46(3):409-412.
- Stolz DB, Zamora R, Vodovotz Y, Loughran PA, Billiar TR, Kim YM, Simmons RL, Watkins SC. 2002. Peroxisomal localization of inducible nitric oxide synthase in hepatocytes. *Hepatology.* 36(1):81-93.
- Susin SA, Lorenzo HK, Zamzami N, Marzo I, Snow BE, Brothers GM, Mangion J, Jacotot E, Costantini P, Loeffler M, Larochette N, Goodlett DR, Aebersold R, Siderovski DP, Penninger JM, Kroemer G. 1999. Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor. *Nature.* 397(6718):441-446.

T

- Tanaka AR, Tanabe K, Morita M, Kurisu M, Kasiwayama Y, Matsuo M, Kioka N, Amachi T, Imanaka T, Ueda K. 2002. ATP binding/hydrolysis by and phosphorylation of peroxisomal ATP-binding cassette proteins PMP70 (ABCD3) and adrenoleukodystrophy protein (ABCD1). *J Biol Chem.* 277(42):40142-40147.
- Tang PS, Mura M, Seth R, Liu M. 2008. Acute lung injury and cell death: how many ways can cells die? *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 294(4):L632-L641.
- Tardy C, Codogno P, Autefage H, Levade T, Andrieu-Abadie N. 2006. Lysosomes and lysosomal proteins in cancer cell death (new players of an old struggle). *Biochim Biophys Acta.* 1765(2):101-125.
- Taylor CM, Marta CB, Claycomb RJ, Han DK, Rasband MN, Coetzee T, Pfeiffer SE. 2004. Proteomic mapping provides powerful insights into functional myelin biology. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 101(13):4643-8.
- Terman A, Gustafsson B, Brunk UT. 2006. The lysosomal-mitochondrial axis theory of postmitotic aging and cell death. *Chem Biol Interact.* 163(1-2):29-37.
- Thompson CB. 1995. Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science.* 267(5203):1456-1462.
- Thoms S, Erdmann R. 2005. Dynamin-related proteins and Pex11 proteins in peroxisome division and proliferation. *FEBS J.* 272(20):5169-5181.
- Thoms S, Grønborg S, Gärtner J. 2009. Organelle interplay in peroxisomal disorders. *Trends Mol Med.* 15(7):293-302.
- Titorenko VI, Rachubinski RA. 1998. The endoplasmic reticulum plays an essential role in peroxisome biogenesis. *Trends Biochem Sci.* 23(7):231-233.
- Titorenko VI, Rachubinski RA. 2001. The life cycle of the peroxisome. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2(5):357-368.
- Tran EH, Hardin-Pouzet H, Verge G, Owens T. 1997. Astrocytes and microglia express inducible nitric oxide synthase in mice with experimental allergic encephalomyelitis. *J Neuroimmunol.* 74(1-2):121-129.
- Turk B, Turk V. 2009. Lysosomes as "suicide bags" in cell death: myth or reality? *J Biol Chem.* 284(33):21783-21787.

V

Uto T, Contreras MA, Gilg AG, Singh I. 2008. Oxidative imbalance in nonstimulated X-adrenoleukodystrophy-derived lymphoblasts. *Dev Neurosci*. 30(6):410-418.

V

Vachhani R, Olds G, Velanovich V. 2009. Esomeprazole: a proton pump inhibitor. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol*. 3(1):15-27.

Vakifahmetoglu H, Olsson M, Zhivotovsky B. 2008. Death through a tragedy: mitotic catastrophe. *Cell Death Differ*. 15(7):1153-1162.

Valianpour F, Selhorst JJ, van Lint LE, van Gennip AH, Wanders RJ, Kemp S. 2003. Analysis of very long-chain fatty acids using electrospray ionization mass spectrometry. *Mol Genet Metab*. 79(3):189-196.

Valko M, Izakovic M, Mazur M, Rhodes CJ, Telser J. 2004. Role of oxygen radicals in DNA damage and cancer incidence. *Mol Cell Biochem*. 266(1-2):37-56.

Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MT, Mazur M, Telser J. 2007. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol*. 39(1):44-84.

Valko M, Rhodes CJ, Moncol J, Izakovic M, Mazur M. 2006. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem Biol Interact*. 160(1):1-40.

Van der Klei IJ, Veenhuis M. 2002. Peroxisomes: flexible and dynamic organelles. *Curr Opin Cell Biol*. 14:500-505.

Van der Klei IJ, Veenhuis M. 1997. Yeast peroxisomes: function and biogenesis of a versatile cell organelle. *Trends Microbiol*. 5:502-509.

Van der Valk P, Gille JJ, Oostra AB, Roubos EW, Sminia T, and Joenje H. 1985. Characterization of an oxygen-tolerant cell line derived from Chinese hamster ovary. Antioxygenic enzyme levels and ultrastructural morphometry of peroxisomes and mitochondria. *Cell Tissue Res*. 239:61-68.

Van Roermund CW, Visser WF, Ijlst L, van Cruchten A, Boek M, Kulik W, Waterham HR, Wanders RJ. 2008. The human peroxisomal ABC half transporter ALDP functions as a homodimer and accepts acyl-CoA esters. *FASEB J*. 22(12):4201-4208.

Varanasi U, Chu R, Chu S, Espinosa R, LeBeau MM, Reddy JK. 1994. Isolation of the human peroxysomal acyl-CoA oxidase gene: organization, promoter analysis, and chromosomal localization. *Proc natl Acad Sci USA*. 91:3107-3111.

Vargas CR, Wajner M, Sirtori LR, Goulart L, Chiochetta M, Coelho D, Latini A, Llesuy S, Bello-Klein A, Giugliani R, Deon M, Mello CF. 2004. Evidence that oxidative stress is increased in patients with X-linked adrenoleukodystrophy. *Biochim Biophys Acta*. 1688(1):26-32.

Vejux A, Kahn E, Dumas D, Bessède G, Ménétrier F, Athias A, Riedinger JM, Frouin F, Stoltz JF, Ogier-Denis E, Todd-Pokropek A, Lizard G. 2005. 7-Ketocholesterol favors lipid accumulation and colocalizes with Nile Red positive cytoplasmic structures formed during 7-ketocholesterol-induced apoptosis: analysis by flow cytometry, FRET biphoton spectral imaging microscopy, and subcellular fractionation. *Cytometry A*. 64(2):87-100.

Vejux A, Lizard G. 2009. Cytotoxic effects of oxysterols associated with human diseases: Induction of cell death (apoptosis and/or oncosis), oxidative and inflammatory activities, and phospholipidosis. *Mol Aspects Med*. 30(3):153-170.

Vejux A, Malvitte L, Lizard G. 2008. Side effects of oxysterols: cytotoxicity, oxidation, inflammation, and phospholipidosis. *Braz J Med Biol Res* 41(7):545-56.

REFERENCES

- Verity AM, Bredezen D, Vonderscher C, Handeley VW, Campagnoni AT. 1993. Expression of myelin protein genes and other myelin components in an oligodendrocytic cell line conditionally immortalized with a temperature-sensitive retrovirus. *J Neurochem.* 60:577-587.
- Vicencio JM, Galluzzi L, Tajeddine N, Ortiz C, Criollo A, Tasdemir E, Morselli E, Ben Younes A, Maiuri MC, Lavandro S, Kroemer G. 2008. Senescence, apoptosis or autophagy? When a damaged cell must decide its path. *Gerontology.* 54(2):92-99.
- Visser WF, Van Roermund CW, Ijlst L, Waterham HR, Wanders RJ. 2007. Metabolite transport across the peroxisomal membrane. *Biochem J.* 401(2):365-375.
- Vlasits J, Jakopitsch C, Bernroitner M, Zamocky M, Furtmüller PG, Obinger C. 2010. Mechanisms of catalase activity of heme peroxidases. *Arch Biochem Biophys.* 500(1):74-81.
- Vluggens A, Andreoletti P, Viswakarma N, Jia Y, Matsumoto K, Kulik W, Khan M, Huang J, Guo D, Yu S, Sarkar J, Singh I, Rao MS, Wanders RJA, Reddy JK, Cherkaoui-Malki M. 2010. Reversal of mouse Acyl-CoA oxidase 1 (ACOX1) Null Phenotype by human ACOX1b isoform. *Lab Invest.* 90(5):696-708.
- W
- Wahli W, Braissant O, Desvergne B. 1995. Peroxisome proliferator activated receptors: transcriptional regulators of adipogenesis, lipid metabolism and more. *Chem Biol.* 2(5):261-266.
- Wanders RJ, Waterham HR. 2006a. Biochemistry of mammalian peroxisomes revisited. *Annu Rev Biochem.* 75:295-332.
- Wanders RJ, Waterham HR. 2006b Peroxisomal disorders: The single peroxisomal enzyme deficiencies. *Biochim Biophys Acta.* 1763:1707-1720.
- Wanders RJ, Ferdinandusse S, Brites P, Kemp S. 2010. Peroxisomes, lipid metabolism and lipotoxicity. *Biochim Biophys Acta.* 1801(3):272-80.
- Wanders RJ, van Roermund CW, van Wijland MJ, Heikoop J, Schutgens RB, Schram AW, Tager JM, van den Bosch H, Poll-Thé BT, Saudubray JM, et al. 1987. Peroxisomal very long-chain fatty acid beta-oxidation in human skin fibroblasts: activity in Zellweger syndrome and other peroxisomal disorders. *Clin Chim Acta.* 166(2-3):255-263.
- Wang J, Megha, London E. 2004. Relationship between sterol/steroid structure and participation in ordered lipid domains (lipid rafts): implications for lipid raft structure and function. *Biochemistry.* 43(4):1010-1018.
- Watkins BA, Seifert MF. 2000. Conjugated linoleic acid and bone biology. *J Am Coll Nutr* 19(4):478S-486S
- Watkins PA. 1997. Fatty acid activation. *Prog Lipid Res.* 36 (1):55-83.
- Watkins PA, Howard AE, Gould SJ, Avigan J, Mihalik SJ. 1996. Phytanic acid activation in rat liver peroxisomes is catalyzed by long-chain acyl-CoA synthetase. *J Lipid Res.* 37(11):2288-2295.
- Weinhofer I, Forss-Petter S, Kunze M, Zigman M, Berger J. 2005. X-linked adrenoleukodystrophy mice demonstrate abnormalities in cholesterol metabolism. *FEBS Lett* 579(25):5512-5516.
- Weinhofer I, Forss-Petter S, Zigman M, Berger J. 2002. Cholesterol regulates ABCD2 expression: implications for the therapy of X-linked adrenoleukodystrophy. *Hum Mol Genet* 11(22):2701-8.
- Whitcomb RW, Linehan WM, Knazek RA. 1988. Effects of long-chain, saturated fatty acids on membrane microviscosity and adrenocorticotropin responsiveness of human adrenocortical cells in vitro. *J Clin Invest.* 81(1):185-188.

REFERENCES

- Willingham SB, Bergstralh DT, O'Connor W, Morrison AC, Taxman DJ, Duncan JA, Barnoy S, Venkatesan MM, Flavell RA, Deshmukh M, Hoffman HM, Ting JP. 2007. Microbial pathogen-induced necrotic cell death mediated by the inflammasome components CIAS1/cryopyrin/NLRP3 and ASC. *Cell Host Microbe*. 2(3):147-159.
- Windelborn JA, Lipton P. 2008. Lysosomal release of cathepsins causes ischemic damage in the rat hippocampal slice and depends on NMDA-mediated calcium influx, arachidonic acid metabolism, and free radical production. *J Neurochem*. 106(1):56-69.
- Wojtczak L, Schönfeld P. 1993. Effect of fatty acids on energy coupling processes in mitochondria. *Biochim Biophys Acta*. 1183(1):41-57.
- Wyllie AH, Kerr JF, Currie AR. 1980. Cell death: the significance of apoptosis. *Int Rev Cytol*. 68:251-306.

Y

- Yamada T, Ohyagi Y, Shinnoh N, Kikuchi H, Osoegawa M, Ochi H, Kira J, Furuya H. 2004. Therapeutic effects of normal cells on ABCD1 deficient cells in vitro and hematopoietic cell transplantation in the X-ALD mouse model. *J Neurol Sci*. 218(1-2):91-97.
- Yamashima T, Oikawa S. 2009. The role of lysosomal rupture in neuronal death. *Prog Neurobiol*. 89(4):343-358.
- Yamashima T. 2000. Implication of cysteine proteases calpain, cathepsin and caspase in ischemic neuronal death of primates. *Prog Neurobiol*. 62(3):273-295.
- Yamashima T. 2004. Ca²⁺-dependent proteases in ischemic neuronal death: a conserved 'calpain-cathepsin cascade' from nematodes to primates. *Cell Calcium*. 36(3-4):285-293.
- Yanagisawa N, Shimada K, Miyazaki T, Kume A, Kitamura Y, Sumiyoshi K, Kiyanagi T, Iesaki T, Inoue N, Daida H. 2008. Enhanced production of nitric oxide, reactive oxygen species, and pro-inflammatory cytokines in very long chain saturated fatty acid-accumulated macrophages. *Lipids Health Dis*. 7:48.
- Yin X, Peterson J, Gravel M, Braun PE, Trapp BD. 1997. CNP overexpression induces aberrant oligodendrocyte membranes and inhibits MBP accumulation and myelin compaction. *J Neurosci Res*. 50:238-247.
- Yoshida Y, Hayakawa M, Niki E. 2005. Total hydroxyoctadecadienoic acid as a marker for lipid peroxidation in vivo. *Biofactors*. 24(1-4):7-15.
- Yoshida Y, Niki E. 2006. Bio-markers of lipid peroxidation in vivo: hydroxyoctadecadienoic acid and hydroxycholesterol. *Biofactors*. 27(1-4):195-202.

Z

- Zachara BA. 1992. Mammalian selenoproteins. *J Trace Elem Electrolytes Health Dis*. 6(3):137-151.
- Zangar RC, Davydov DR, Verma S. 2004. Mechanisms that regulate production of reactive oxygen species by cytochrome P450. *Toxicol Appl Pharmacol*. 199(3):316-331.
- Zoeller RA, Lake AC, Nagan N, Gaposchkin DP, Legner MA, Lieberthal W. 1999. Plasmalogens as endogenous antioxidants: somatic cell mutants reveal the importance of the vinyl ether. *Biochem J*. 338:769-776.
- Zoeller RA, Morand OH, Raetz CR. 1988. A possible role for plasmalogens in protecting animal cells against photosensitized killing. *J Biol Chem*. 263(23):11590-11596.