



HAL
open science

Altérations mitochondriales et processus inflammatoire dans la déficience en acyl- Coenzyme A oxydase 1 peroxysomale

Hamam El Hajj

► **To cite this version:**

Hamam El Hajj. Altérations mitochondriales et processus inflammatoire dans la déficience en acyl-Coenzyme A oxydase 1 peroxysomale. Sciences agricoles. Université de Bourgogne, 2012. Français. NNT : 2012DIJOS108 . tel-00995795

HAL Id: tel-00995795

<https://theses.hal.science/tel-00995795>

Submitted on 24 May 2014

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.

UNIVERSITÉ DE BOURGOGNE

ECOLE DOCTORALE ENVIRONNEMENT-SANTÉ/STIC

UFR SCIENCES DE LA VIE-DIJON

THÈSE

Pour l'obtention du grade de

Docteur de l'Université de Bourgogne

Discipline : Biochimie, Biologie Cellulaire et Moléculaire

Altérations mitochondriales et processus inflammatoire dans la déficience en acyl-Coenzyme A oxydase 1 peroxysomale

Présentée et soutenue publiquement par :

Hammam EL HAJJ

Le 22 Mai 2012

Membres du jury :

Pr. Myriam BAES	Université de Louvain, Belgique	Rapporteur
Dr. Jean BASTIN	Inserm UMR-S 747, Université René Descartes, Paris	Rapporteur
Dr. Joseph VAMECQ	Inserm CHRU, Lille	Examineur
Pr. Luc PENICAUD	CNRS, UMR5548, Université de Bourgogne, Dijon	Examineur
Dr. Pierre ANDREOLETTI	Laboratoire BioPeroxiL - Université de Bourgogne, Dijon	Co-directeur de thèse
Pr. Mustapha CHERKAOUI MALKI	Laboratoire BioPeroxiL - Université de Bourgogne, Dijon	Directeur de thèse

Qu'il me soit permis de remercier :

Madame le Professeur Myriam Baes et Monsieur le docteur Jean Bastin pour avoir accepté de lire et d'évaluer ce manuscrit. Qu'ils soient assurés de ma profonde reconnaissance,

Monsieur le docteur Joseph Vamecq pour avoir accepté de faire partie du comité de suivi de thèse et pour avoir accepté d'examiner ce travail,

Monsieur le Professeur Luc Pénicaud pour avoir accepté d'examiner ce travail,

Messieurs les Professeurs Ronald J.A. Wanders et Hans R. Waterham pour nous avoir fourni les lignées de fibroblastes issus de patients P-NALD et pour avoir partagé des échanges scientifiques,

Monsieur le Professeur Janardan K. Reddy et son équipe pour nous avoir fourni les tissus de souris (souris sauvages, souris déficientes en Acox1 et souris hACOX1),

Monsieur le Professeur Sander Kersten pour la réalisation des puces à ADN et la discussion des résultats,

Madame Jeannine Lherminier pour son assistance technique (Microscopie électronique),

Messieurs le Professeur Norbert Latruffe et le Docteur Gérard Lizard pour m'avoir accueilli au sein du laboratoire,

Monsieur le Professeur Mustapha Cherkaoui Malki pour m'avoir accueilli dans son équipe et d'avoir supervisé ce travail. Merci pour toutes nos discussions scientifiques si intéressantes, pour tous tes conseils que j'apprécie tant et pour m'avoir encouragé tout au long de cette thèse,

Monsieur le docteur Pierre Andreoletti, mon co-directeur de thèse, pour m'avoir encadré pendant mon stage de M2R et pour avoir suivi mon travail tout au long de cette thèse, merci pour tes encouragements, j'ai beaucoup appris de ta logique et de ton raisonnement scientifique,

Mes remerciements vont également à tous les membres de l'équipe Inserm U866 « Biochimie Métabolique et Nutritionnelle » - BioPeroXIL qui m'ont accompagné au quotidien dans mon travail de thèse :

Valérie Nicolas pour ta compréhension et tes conseils, Doriane Tromprier pour m'avoir formé à la culture cellulaire, pour ta gentillesse et pour toutes les discussions scientifiques et non scientifiques pendant les heures de TP, Stéphane Savary pour tes conseils et pour ton franc-parler, Stéphane Mandard pour toutes tes blagues qui me faisaient rire (PS : tu progresses en langue arabe...continue !), Anne Vejux pour ton humour (et qui a cru que j'étais pakistanais quand elle est arrivée au labo! J'avais cette tête ?), Nathalie Bancod pour ta gentillesse et pour m'avoir aidé à imprimer la première version du manuscrit (c'était une bataille !)

Je remercie tous mes collègues du bureau qui sont devenus avec le temps mes vrais amis : Didier (qui me faisait éclater de rire avec ses blagues et ses critiques), Kevin pour ton amitié et ton humour (et pour avoir assuré pendant plus de 3 ans la superbe ambiance du bureau), Ségolène pour ta gentillesse et tes Grrrrr tout au long de la journée, oui tu étais souvent la victime des blagues de Kevin et Didier mais toujours avec le sourire, Jacques avec qui je partage une vraie amitié, l'amour de la bouffe et du foot et qui n'a jamais arrêté de m'encourager pendant la rédaction du manuscrit (je suis sûr que tu passeras une très belle thèse), Virginie pour ton amitié, ta sincérité, tes conseils et toutes les cigarettes qu'on s'est échangées (nos fous rires en parlant anglais et pour avoir essayé de m'apprendre le portugais), Emeric (la crevette) pour toutes les discussions sérieuses et non sérieuses qu'on a eues ensemble accompagnées de tes blagues et de ton imitation de l'accent du sud, quand je pense que tu seras bientôt papa (Courage au bébé !), je pense que ton parcours dans la recherche sera extraordinaire !, Mauhamad que je considère comme un frère, et qui nous faisait toujours rire avec ses théories et ses analyses « psychologiques » bizarres, Arnaud, Flore (la bourgeoise qui cuisine de bons plats), Thomas (qui me rappelle toujours le jour de diffusion de TPMP et pour la prédiction de la météo), Fred, Alix, Riad, Simo et Soufiane.

Je remercie également Allan, mon ami, je peux te dire que je croiserais rarement quelqu'un comme toi, avec toutes tes blagues et ta manière de raconter les choses, ta joie de vivre, nos soirées initiation à la chicha, tes imitations (de tous les accents qui existent sur terre !) je peux rigoler avec toi 24h/24h. Soëli pour ta gentillesse, ton écoute quand les choses allaient plus ou moins bien, tes encouragements, ta patience et ta générosité. Antoine, avec

qui je partageais la passion de la recherche et celle du Real de Madrid, je n'oublierais pas les moments qu'on a passé pour préparer le départ vers Dijon.

Je n'oublie pas mes parents, ma sœur, mon frère, mes grands-mères, ma tante Magida et mon oncle Hassan qui m'ont soutenu tout le long de cette thèse, vous étiez toujours à m'encourager et à me donner de l'espoir dans les moments difficiles malgré les quatre mille kilomètres qui nous séparent. Cette thèse je vous la dédie.

A ma mère,
A mon père,
A ma famille.

Résumé

L'acyl-CoA oxydase 1 (ACOX1) est l'enzyme qui catalyse la première étape de la voie classique de la β -oxydation peroxysomale. Cette voie catabolise exclusivement les acides gras à très longue chaîne (AGTLC). Chez l'homme, la déficience en ACOX1 est à l'origine de la pseudo-adrénoleucodystrophie néonatale (P-NALD), une maladie neurodégénérative rare caractérisée par une accumulation des AGTLC dans le plasma et les tissus, une hépatomégalie, un retard du développement moteur et une démyélinisation de la matière blanche cérébrale. Chez la souris, l'extinction du gène *Acox1* provoque une accumulation des AGTLC dans le plasma, un retard de croissance, une stéatose hépatique et le développement d'une hépatocarcinogenèse avec l'âge. Cependant, ces souris ne développent pas de symptômes cérébraux contrairement aux patients P-NALD. Au cours de ce travail, on a pu montrer sur des fibroblastes issus de patients atteints de P-NALD qu'en absence d'activité ACOX1, les peroxysomes sont diminués en nombre et augmentés en taille avec un niveau de β -oxydation peroxysomale fortement réduit. L'accumulation des AGTLC suite à la déficience en ACOX1 dans ces cellules provoque, au niveau transcriptionnel, la perturbation de la voie de synthèse du cholestérol et déclenche une réaction inflammatoire caractérisée par l'activation de la voie de l'IL-1 et la sécrétion d'IL-6 et d'IL-8. Le rôle métabolique important que joue l'ACOX1 dans l'homéostasie énergétique cellulaire a pu être souligné chez l'homme et chez la souris. En effet, la déficience en ACOX1 dans les fibroblastes de patients P-NALD perturbe la morphologie de la mitochondrie qui apparaît anormale ainsi que le métabolisme énergétique mitochondrial caractérisé par une inhibition de PGC-1 α par acétylation, une surexpression de l'activité du complexe V et une diminution du taux d'ATP mitochondrial. L'absence dans le foie de l'activité ACOX1, chez la souris *Acox1*^{-/-}, se traduit par des perturbations, au niveau mitochondrial, de la biogenèse et du métabolisme énergétique. Ces perturbations mitochondriales se caractérisent par une diminution de l'activité du complexe IV de la chaîne respiratoire accompagnée d'une diminution de la respiration. Cependant, ces perturbations n'affectent pas le taux d'ATP total. Les altérations mitochondriales observées chez les souris *Acox1*^{-/-} sont en grande partie corrigées par l'expression de l'ACOX1 humaine. Ceci montre le rôle indispensable de l'ACOX1 dans l'homéostasie de la fonction mitochondriale.

L'ensemble des résultats obtenus au cours de ce travail confirme l'importance de l'activité acyl-CoA oxydase 1 pour la dégradation des AGTLC au niveau du système de β -oxydation peroxysomale et pour la biogenèse du peroxysome. L'accumulation des substrats non métabolisés en absence d'ACOX1 pourrait être à l'origine de la perturbation de la fonction mitochondriale montrant à quel point l'activité de l'ACOX1 est indispensable au métabolisme cellulaire.

Mots-clés: ACOX1; Peroxysome, AGTLC, inflammation, cholestérol, mitochondrie.

Abstract

Acyl-CoA oxidase 1 (ACOX1) is the rate-limiting enzyme of the peroxisomal fatty acid β -oxidation pathway of very-long-chain fatty acid (VLCFAs). In humans, ACOX1 deficiency, also called pseudo-neonatal adrenoleukodystrophy, is an autosomal recessive and a severe form of the peroxisomal β -oxidation deficiency. Patients suffer from severe delayed motor development followed by a progressive neurological regression including progressive hypodensity of cerebral white matter, hepatomegaly and deafness and die during late-infantile period. Elevated plasma and tissues VLCFAs levels are detected in these patients. Mice lacking ACOX1 develop severe microvesicular steatohepatitis with increased intrahepatic H_2O_2 levels and hepatocellular regeneration. Liver cell proliferation in *Acox1*^{-/-} mice leads to complete replacement of steatotic hepatocytes with hepatocytes that exhibit massive spontaneous peroxisome proliferation. Older mice develop hepatocellular carcinomas due to the sustained activation of peroxisome proliferator-activated receptor-alpha (PPAR α). Contrary to humans, mice lacking ACOX1 have no apparent neurological disorder. Based on fibroblasts cell model from P-NALD patients, we show that ACOX1 deficiency lead to abolition of peroxysomal β -oxidation of cerotic acid (C26:0) and modification of peroxysomal morphology which appear reduced in number and enlarged in size. Moreover, accumulation of VLCFAs in ACOX1 deficiency in human fibroblasts interferes at the transcription level with cholesterol synthesis pathway. Furthermore, these cells show activation of interleukin-1b pathway with elevated production of interleukin-6 and interleukin-8 as an inflammatory response to metabolic disturbance due to VLCFAs accumulation. Furthermore, we show in this study that the ACOX1 deficiency in human fibroblasts and in mice liver leads to alteration of the mitochondrial ultra structure, changes in the expression and activity of mitochondrial chain complexes. These alterations of mitochondrial functions are accompanied by reduction in mitochondrial ATP levels in human fibroblasts and decreased mitochondrial respiration in ACOX1 deficient mice. Interestingly, the mitochondrial changes observed in *Acox1*^{-/-} mice are restored by expression of human ACOX1 in liver suggesting an essential role of human and murine Acyl-CoA oxidase 1 activity in preventing mitochondrial and lipid disturbance.

Together, the results presented in this work underscore the important role of ACOX1 in humans and mice to ensure peroxisomal β -oxidation, VLCFAs catabolism and to preserve peroxisomal morphology. Given mitochondrial perturbation in ACOX1 deficiency, it is clear that this enzyme plays a pivotal role in preventing VLCFAs accumulation and their cellular toxicity and guarantees mitochondrial normal morphology and function in response to energy demand.

Keywords: ACOX1; Peroxisome, VLCFA, inflammation, cholesterol, mitochondria.



Sommaire

SOMMAIRE	7
LISTE DES TABLEAUX	15
LISTE DES FIGURES	17
LISTE DES ANNEXES	21
ABREVIATIONS	23
INTRODUCTION	27
RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES	31
A. Le peroxysome	32
<i>A.1 Découverte</i>	32
<i>A.2. La biogenèse des peroxysomes</i>	34
A.2.1. Origine des peroxysomes et rôle du réticulum endoplasmique	34
A.2.2. Import des protéines peroxysomales	36
A.2.3. La dynamique peroxysomale	38
B. Les fonctions métaboliques du peroxysome	43
<i>B.1. Métabolisme des lipides</i>	43
B.1.1. Le système de β -oxydation peroxysomal des acides gras	43
B.1.2. La β -oxydation peroxysomale des acides dicarboxyliques	53
B.1.3. La β -oxydation des eicosanoïdes	54
B.1.4. Le transport et l'activation des acides gras	54
<i>B.2. Synthèse des acides gras polyinsaturés (AGPI)</i>	57
<i>B.3. Synthèse des acides biliaires</i>	60
<i>B.4. Synthèse des éthers de phospholipides</i>	62
<i>B.5. L'α-oxydation</i>	64
C. Autres fonctions du peroxysome	66
<i>C.1. Métabolisme du glyoxylate</i>	66
<i>C.2. Métabolisme des acides aminés</i>	66
<i>C.3. Dégradation des espèces réactives de l'oxygène (ERO)</i>	66
D. L'acyl-CoA oxydase 1 (ACOX1)	67
<i>D.1. La nomenclature</i>	67
<i>D.2. Le gène</i>	67
<i>D.3. L'ARNm</i>	70
<i>D.4. Acyl-CoA oxydase 1 : Isoformes, activité et substrats</i>	71
E. Les maladies peroxysomales	73
<i>E.1. Les maladies associées à un défaut de la biogenèse du peroxysome (PBDs)</i>	73
<i>E.2. Les maladies causées par une déficience d'un enzyme/transporteur peroxysomal</i>	74
<i>E.3. La pseudo-adrénoleucodystrophie néonatale (P-NALD)</i>	77

F. Modèle murin de déficience en Acyl-CoA oxydase 1	78
G. Peroxisomes et inflammation	79
H. Interrelations peroxysome-mitochondrie	81
<i>H.1. Morphologie</i>	81
<i>H.2. Production d'énergie</i>	81
<i>H.3. Dégradation des espèces réactives de l'oxygène</i>	82
<i>H.4. Dialogue entre mitochondrie et peroxysome</i>	82
H.4.1. Processus de Fusion/Fission	82
H.4.2. Altérations mitochondriales et maladies peroxysomales	83
I. La mitochondrie.....	84
<i>I.1. Généralités</i>	84
<i>I.2. Principales fonctions</i>	84
<i>I.3. Les complexes de la chaîne respiratoire</i>	85
I.3.1. Complexe I : NADH-Coenzyme Q oxydoréductase.....	87
I.3.2. Complexe II : Succinate déshydrogénase	87
I.3.3. Complexe III : Cytochrome c réductase	87
I.3.4. Complexe IV : Cytochrome c oxydase.....	87
I.3.5. Complexe V: L'ATP synthase.....	88
<i>I.4. L'ADN mitochondrial</i>	88
I.4.1. Transcription	90
I.4.2. Régulation de la transcription de l'ADN mitochondrial.....	90
<i>I.5. Contrôle nucléaire des fonctions mitochondriales</i>	91
<i>I.6. Régulation de la biogenèse et des fonctions mitochondriales</i>	92
I.6.1. Le coactivateur PGC-1 α	92
MATERIELS ET METHODES.....	99
A. Tissus, lignées et culture cellulaire.....	100
A.1. Origine des tissus de souris Acox1 ^{-/-} , hACOX1 et sauvages	100
A.2. Origine des fibroblastes	100
A.3. Conditions de culture des fibroblastes	101
B. Traitements appliqués sur les cellules	101
<i>B.1. Traitement des cellules à l'acide cérotique (C26:0)</i>	101
<i>B.2. Traitement avec les inhibiteurs des voies de signalisation</i>	101
C. Mesure de l'activité enzymatique de l'ACOX1 par dosage fluorimétrique	102
<i>C.1. Extraction des protéines</i>	102
<i>C.2. Mesure de l'activité enzymatique acyl-CoA oxydase 1</i>	102
D. Mesure de l'activité enzymatique des complexes de la chaîne respiratoire mitochondriale par dosage spectrophotométrique.....	103
<i>D.1. Préparation des mitochondries de foies de souris et homogénéisation des cellules</i>	103
<i>D.2. Réactifs</i>	104

<i>D.3. Complexe I :NADH-Coenzyme Q oxydoréductase</i>	104
D.3.1. Principe.....	104
D.3.2. Préparation de la suspension cellulaire	105
D.3.3. Mesure de l'activité du complexe I par spectrophotométrie	105
D.3.4. Calcul de l'activité du complexe I	106
<i>D.4. Complexe II :Succinate ubiquinone réductase</i>	106
D.4.1. Principe.....	106
D.4.2. Préparation de la suspension cellulaire	107
D.4.3. Mesure de l'activité du complexe II par spectrophotométrie	107
D.4.4. Calcul de l'activité du complexe II.....	108
<i>D.5. Complexe III :Ubiquinol cytochrome c réductase</i>	108
D.5.1. Principe.....	108
D.5.2. Préparation du Décylubiquinol	108
D.5.3. Préparation de la suspension cellulaire	109
D.5.4. Mesure de l'activité du complexe III par spectrophotométrie.....	110
D.5.5. Calcul de l'activité du complexe III.....	110
<i>D.6. Complexe IV: Cytochrome c oxydase</i>	111
D.6.1. Principe.....	111
D.6.2. Préparation du Cytochrome c réduit 220 μ M.....	111
D.6.3. Préparation de la suspension cellulaire	111
D.6.4. Mesure de l'activité du complexe IV par spectrophotométrie	112
D.6.5. Calcul de l'activité du complexe IV	112
<i>D.7. Dosage de l'activité citrate synthase</i>	113
D.7.1. Principe.....	113
D.7.2. Préparation de la suspension cellulaire	113
D.7.3. Mesure de l'activité citrate synthase par spectrophotométrie	113
D.7.4. Calcul de l'activité de l'activité Citrate synthase.....	114
D.8. Mesure de la β -oxydation peroxysomale	114
<i>D.8.1. Principe</i>	114
<i>D.8.2. Protocole</i>	115
D.8.2.1. Ensemencement des cellules dans les fioles	115
D.8.2.1.1. Préparation du mélange de β -oxydation.....	115
D.8.2.1.2. Initiation de la β -oxydation.....	115
D.8.2.1.3. Contrôle de la solubilisation du C26:0.....	116
D.8.2.1.5. Lyse des protéines.....	116
D.8.2.1.6. Comptage du CO_2 radioactif.....	116
D.8.2.1.7. Hydrolyse des esters d'acides gras.....	116
D.8.2.1.8. Purification des fractions acido-solubles	117
<i>D.8.2.2. Calculs</i>	117
E. Western blot	118
<i>E.1. Préparation et dosage des extraits protéiques</i>	118

E.2. Séparation des protéines en SDS-PAGE (PolyAcrylamid Gel Electrophoresis)	118
F. Immunofluorescence.....	119
G. RT-QPCR.....	120
G.1. Mesure de la quantité de transcrits	120
G.1.1. Extraction d'ARN totaux à partir de tissus	120
G.1.2. Extraction d'ARN totaux à partir de cellules	120
G.1.3. Dosage des ARN totaux.....	121
G.2. Transcription inverse	121
G.3. Réaction de polymérisation en chaîne en temps réel	121
G3.1. Préparations des échantillons.....	122
G.3.2. Réaction de qPCR.....	122
G.4. RT-QPCR en plaque pour l'identification des voies d'inflammation.....	123
H. Cytométrie en flux	124
I. Dosage de l'ATP intracellulaire par fluorimétrie	125
I.1. Principe	125
I.2. Préparation de la gamme d'ATP	125
I.3. Dosage de l'ATP.....	126
RESULTATS	127
Chapitre I : Déficience en ACOX1 et inflammation (Article)	128
Objectifs.....	129
Introduction.....	129
Chapitre II : Métabolisme du cholestérol dans le cadre de la déficience en ACOX1	140
A. Introduction du chapitre	141
A.1. Voie de la biosynthèse du cholestérol.....	141
A.2. Peroxysome et voie de synthèse du cholestérol	144
B. Analyse d'expression de gènes du métabolisme du cholestérol dans les lignées de fibroblastes	147
B.1. Voie de synthèse du cholestérol.....	147
B.2. Voie de dégradation du cholestérol.....	149
B.3. Régulation du métabolisme du cholestérol	150
C. Conclusions	151
Chapitre III : Effets de la déficience en ACOX1 sur les fonctions peroxysomales	152
A. Introduction	153
B. Evaluation du niveau d'expression des ARNm codant l'ACOX1.....	154
C. Evaluation de l'expression de la protéine ACOX1	156
D. Activité acyl-CoA oxydase 1 dans les lignées de fibroblastes de patients P-NALD.....	157
E. Mesure de la β -oxydation peroxysomale des acides gras à très longue chaîne (AGTLC).....	158
F. Morphologie et nombre des peroxysomes dans les lignées de fibroblastes P-NALD	159
F.1. Evaluation du nombre des peroxysomes	159
F.2. Etude morphologique des peroxysomes	160

<i>G. Conclusions</i>	164
Chapitre IV : Effets de la déficience en ACOX1 sur les fonctions mitochondriales	166
<i>A. Introduction</i>	167
<i>B. Effets de la déficience en ACOX1 humaine sur la morphologie de la mitochondrie</i>	169
B.1. Observations en microscopie à fluorescence.....	169
B.2. Observations en microscopie électronique.....	169
<i>C. Biogenèse mitochondriale et déficience en ACOX1 chez les patients P-NALD et chez les souris Acox1^{-/-}</i>	174
C.1. Fibroblastes de patients P-NALD	174
C.2. Souris Acox1 ^{-/-} et hACOX1	176
C.3. Evaluation du nombre des mitochondries dans les lignées de fibroblastes	176
<i>D. Etude du métabolisme énergétique de la mitochondrie</i>	177
D.1. Evaluation du taux d'expression des ARNm codant les complexes de la chaîne respiratoire dans les lignées de fibroblastes et de souris	178
D.2. Expression des protéines des complexes respiratoires	180
D.3. Mesure des activités des complexes de la chaîne respiratoire.....	181
D.4. Mesure de la respiration et du niveau d'ATP cellulaire	184
D.5. Expression de l'ARNm du gène codant la protéine de découplage UCP2 chez les souris	188
D.6. Expression de la protéine acyl-CoA déshydrogénase à chaîne moyenne.....	189
<i>E. Régulation du métabolisme mitochondrial</i>	190
E.1. Evaluation du taux d'expression des ARNm codant les facteurs de transcription impliqués dans la régulation du métabolisme mitochondrial	190
E.2. Expression des facteurs de transcription NRF1, NRF2 et de la désacétylase SIRT1 en immunofluorescence dans les fibroblastes humains	193
E.3. Expression protéique de NRF1 et NRF2 dans les fibroblastes humains par Western blot	199
E.4. Expression de PGC-1 α dans les lignées de fibroblastes de patients P-NALD.....	200
E.5. Evaluation des voies de signalisation régulant l'expression de PGC-1 α	202
<i>F. Expression de l'acétyl-CoA carboxylase (ACC) dans les fibroblastes humains</i>	203
<i>G. Conclusions</i>	204
DISCUSSION	205
A. Caractérisation de 3 lignées de fibroblastes de patients atteints de P-NALD	207
B. Déficience en ACOX1 et métabolisme du cholestérol dans les fibroblastes P-NALD	210
C. Déficience en ACOX1 et altérations de la mitochondrie dans les fibroblastes P-NALD.....	214
<i>C.1. Morphologie et biogenèse des mitochondries chez les patients P-NALD</i>	215
<i>C.2 Métabolisme énergétique mitochondrial chez les patients P-NALD</i>	217
D. Effets de la déficience en ACOX1 sur la fonction mitochondriale au niveau hépatique chez les souris	221
E. Déficience en ACOX1 et effets sur la biogenèse et le métabolisme énergétique dans les fibroblastes P-NALD et souris Acox1 ^{-/-}	228

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES 231

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES 235

ANNEXES 261



Liste des tableaux

<i>Tableau 1. Récapitulatif des différentes maladies peroxysomales.</i>	75
<i>Tableau 2. Liste des lignées de fibroblastes humaines.</i>	100
<i>Tableau 3. Liste des gènes liés à l'inflammation testés par RT-QPCR sur plaque.</i>	124
<i>Tableau 4. Niveaux d'expressions des gènes de la voie de synthèse du cholestérol dans les fibroblastes de patient P2 (n=1) normalisés par rapport à la lignée contrôle (n=1) par analyse transcriptomique par puces à ADN.</i>	147
<i>Tableau 5. Niveau d'expression du gène de la CYP7B1 en puce à ADN dans la lignée de fibroblaste P2 (n=1) normalisé par rapport à la lignée contrôle C (n=1).</i>	149
<i>Tableau 6. Expression des gènes de régulation de la voie de synthèse du cholestérol dans la lignée de patient P2 (n=1) normalisée par rapport à la lignée contrôle C (n=1).</i>	150
<i>Tableau 7. Tableau récapitulatif des principaux résultats d'évaluation des fonctions mitochondriales dans les fibroblastes humains et dans le tissu hépatique murin en absence d'ACOX1.</i>	204
<i>Tableau 8. Tableau récapitulatif des résultats de la caractérisation des lignées de fibroblastes de patients P-NALD P3, P4 et P5 par rapport à la lignée contrôle C1.</i>	209
<i>Tableau 9. Tableau montrant les facteurs d'induction des gènes cibles de PPARα.</i>	213



Liste des figures

<i>Figure 1. Image de peroxysomes en microscopie électronique.</i>	33
<i>Figure 2. Modèle global du processus de biogenèse des peroxysomes.</i>	35
<i>Figure 3. Importation des protéines dans la matrice peroxysomale.</i>	37
<i>Figure 4. Modèle du processus de prolifération et de division du peroxysome chez S. Cerevisae.</i>	39
<i>Figure 5. Modèles de pexophagie.</i>	42
<i>Figure 6. Schéma général de la voie de β-oxydation peroxysomale chez l'homme.</i>	45
<i>Figure 7. Représentation schématique de la voie et des enzymes impliquées dans la β-oxydation peroxysomale et des acides gras à chaîne linéaire et des acides gras à chaîne ramifiée (acide pristanique et les intermédiaires des acides biliaires).</i>	47
<i>Figure 8. Représentation générale des différentes enzymes de la voie de β-oxydation peroxysomale.</i>	51
<i>Figure 9. Schéma récapitulatif de la synthèse l'acide docosahexaénoïque (DHA, C22:6) et de l'acide docosapentaénoïque (DPA, C22:5).</i>	59
<i>Figure 10. Représentation schématique des étapes de synthèse peroxysomale des acides biliaires.</i>	61
<i>Figure 11. Représentation schématique des différentes étapes de la voie de synthèse des plasmalogènes dans le peroxysome.</i>	63
<i>Figure 12. Schéma de la voie de l'α-oxydation peroxysomale de l'acide phytanique chez les mammifères.</i>	65
<i>Figure 13. Schéma représentant le gène de l'ACOX1 humaine.</i>	69
<i>Figure 14. Représentation schématisée du mécanisme de l'épissage alternatif du gène de l'ACOX1.</i>	70
<i>Figure 15. Mécanisme réactionnel de l'ACOX1 lors de la transformation de l'acyl-CoA en 2-trans-énoyl-CoA.</i>	72
<i>Figure 16. Représentation schématique des complexes de la chaîne respiratoire mitochondriale.</i>	86
<i>Figure 17. Représentation schématique de l'organisation de l'ADN mitochondrial.</i>	89
<i>Figure 18. Schéma générale de la régulation de la transcription de PGC-1α.</i>	95
<i>Figure 19. Modification post-traductionnelles de PGC-1α.</i>	97
<i>Figure 20. Représentation schématique de la voie de synthèse du cholestérol.</i>	142
<i>Figure 21. Implication des Sterol response element binding protein SREBP-2 and SREBP-1c respectivement dans la voie de synthèse du cholestérol et des acides gras.</i>	143
<i>Figure 22. Représentation schématique de la voie de synthèse du cholestérol avec la répartition subcellulaire des enzymes de la voie.</i>	146
<i>Figure 23. Expression relative des principaux gènes de la voie de synthèse du cholestérol en PCR quantitative.</i>	148
<i>Figure 24. Expression relative du gène de la Cytochrome P450 (CYB7B1) en PCR quantitative.</i>	149
<i>Figure 25. Expression relative des gènes de régulation de la voie de synthèse du cholestérol en PCR quantitative.</i>	151
<i>Figure 26. Représentation des niveaux relatifs d'expression des ARNm de l'ACOX1 (A), l'ACOX1a (B) et de l'ACOX1b (C) dans les fibroblastes de patients P3, P4 et P5 comparés à celui des contrôles C1.</i>	155
<i>Figure 27. Expression protéique de l'ACOX1 par Western blot dans les fibroblastes contrôles C1 et dans les 3 lignées de patients P-NALD P3, P4 et P5.</i>	156

Figure 28. Activités spécifiques acyl-CoA oxydase 1 exprimées en $mU.mg^{-1}$ pour le substrat palmitoyl-CoA.....	157
Figure 29. Niveau de β -oxydation du ^{14}C -C26:0 exprimé en pourcentage d'activité spécifique globale en $pmol/h/mg$ de protéines dans les fibroblastes de patients P3 et P5 par rapport aux contrôles C1.....	159
Figure 30. Images d'immunofluorescences en microscopie à fluorescence des fibroblastes contrôle (C1) et des fibroblastes de patients atteints de P-NALD (P3, P4 et P5).....	161
Figure 31. Evaluation du nombre de peroxysomes par cellules dans les lignée de fibroblastes contrôles et déficientes en ACOX1.	162
Figure 32. Micrographies électroniques de fibroblastes contrôles (A, B, C et D) et P-NALD (E, F et G). Les peroxysomes ont été marqués par la DAB grâce à l'activité catalase.	163
Figure 33. Micrographies électroniques de peroxysomes de fibroblastes P-NALD.	164
Figure 34. Images des marquages au MitoTracker Red CMXRos et au cytochrome c de la lignée de fibroblastes contrôle C1 et des lignées de fibroblastes de patients P3, P4 et P5.	171
Figure 35. Micrographies électroniques de fibroblastes d'un sujet contrôle.....	172
Figure 36. Micrographies électroniques de fibroblastes issus de patients P-NALD (P3 et P5).	173
Figure 37. Niveaux d'expression des gènes de fusion et de fission de la mitochondrie analysés par qPCR.	175
Figure 38. Rapports d'ADN mitochondrial/ADN génomique (ADNmt) dans les fibroblastes.	177
Figure 39. Effets de la déficience en ACOX1 sur l'expression de gènes codant les protéines de la chaîne respiratoire.	178
Figure 40. Analyse de l'expression des complexes de la chaîne respiratoire par Western blot.	181
Figure 41. Activités des complexes de la chaîne respiratoire dans les lignées de fibroblastes de patients (P6, P7, P8, P9, P10 et P11).	183
Figure 42. Activités des complexes de la chaîne respiratoire dans les foies de souris Wild-type (Wt), ACOX1 ^{-/-} (-/-) et hACOX1.....	184
Figure 43. Taux relatif d'ATP dans les lignées de fibroblastes.	185
Figure 44. Taux relatif d'ATP dans les foies de souris WT, ACOX1 ^{-/-} (-/-) et hACOX1.	186
Figure 45. Mesure de la respiration mitochondriale (consommation d'oxygène) dans les foies de souris Wild-Type (WT), Acox1 ^{-/-} (-/-) et les souris hACOX1.	187
Figure 46. Expression des gènes de l'UCP2 chez les souris.	189
Figure 47. Expression de la protéine MCAD dans les fibroblastes.	190
Figure 48. Evaluation de taux d'ARNm des facteurs de transcription mitochondriaux dans les fibroblastes humains.....	191
Figure 49. Evaluation de taux d'ARNm des facteurs de transcription mitochondriaux au niveau des foies de souris.	192
Figure 50. Images d'immunofluorescence par microscopie à fluorescence des fibroblastes contrôles (C1) et des fibroblastes de patients atteints de P-NALD (P3 et P5) pour les mitochondries et NRF1.....	195

Figure 51. Images d'immunofluorescence par microscopie à fluorescence des fibroblastes contrôles (C1) et des fibroblastes de patients atteints de P-NALD (P3 et P5) pour les mitochondries et NRF2.....196

Figure 52. Images d'immunofluorescence par microscopie à fluorescence des fibroblastes contrôles (C1) et des fibroblastes de patients atteints de P-NALD (P3 et P5) pour les mitochondries et SIRT1.198

Figure 53. Analyse de l'expression de NRF1 et NRF2 dans les fibroblastes par Western blot.199

Figure 54. Analyse de l'expression de la protéine PGC-1 α par Western blot.200

Figure 55. Régulation post-traductionnelle de PGC-1 α en immunoprécipitation.201

Figure 56. Etude de l'expression de l'AMPK et de l'Akt par Western blot.202

Figure 57. Niveau de phosphorylation de l'ACC dans les fibroblastes.203



Liste des annexes

Annexe 1. Données supplémentaires (Article)	262
Annexe 2. Communications-Publications-Collaborations	268



Abréviations

A

AADHAP-R : Acyl/Alkyl-dihydroxyacétone phosphate réductase
 ABC : « ATP-binding cassette »
 ABCD1 : « ATP binding cassette » de la sous famille D
 ACOT : Acyl-CoA Thioestérase
 ACOX1 : Acyl-CoA oxydase 1
 ACS : Acyl-CoA synthétase
 ACSL : Acyl-CoA synthétase à longue chaîne
 ADHAP-S : Alkyl-dihydroxyacétone phosphate synthase
 ADN : Acide désoxyribonucléique
 ADNc : ADN complémentaire
 ADNmt : ADN mitochondrial
 AE : Activité enzymatique
 AGAT : Alanine/glyoxylate aminotransférase
 AG : Acides Gras
 AGLC : Acide gras à longue chaîne
 AGTLC : Acides Gras à Très Longue Chaîne
 AGPI : Acide Gras Polyinsaturé
 AGPS : Alkyl glycerone-phosphate synthase
 AICAR : 5-amino-1-β-D-ribofuranosyl-imidazole-4-carboxamide
 Akt/PKB : Protein Kinase B
 ALDP : « Adrenoleukodystrophy protein »
 AMN : « Adult cerebral adrenomyeloneuropathy »
 AMP : Adénosine monophosphate
 AMPc : Adénosine monophosphate cyclique
 AMPK : « Adénosine monophosphate-activated protein kinase »
 ANT : Adénine Nucléotide Translocase
 ARNm : ARN messenger
 ARNr : ARN ribosomal
 ARNt : ARN de transfert
 ATP : Adénosine triphosphate
 ATF2 : « Activating transcription factor 2 »

B

BAAT : Bile acyl-CoA acyltransférase
 BACS : Bile acid synthétase
 BAT : Tissu adipeux brun
 BCOX : « Branched Chain Oxidase »
 BET : bromure d'éthidium
 BSA : Albumine de sérum bovin

C

CA : Acide Cholique
 CACT : Carnitine acyl-carnitine translocase
 CaMKIV : Protéine kinase IV dépendante du Ca²⁺/calmoduline
 CCALD : « Childhood Cerebral Adrenoleukodystrophy »
 CCL : « Chemokine (C-C motif) ligand »
 CDCA : Acide Chénodoxycholique
 CnA : Calcineurine A

CoA : Co-enzyme A
 COX : Cytochrome Oxydase
 CPT-I : Carnitine palmitoyl transférase I
 CPT-II : Carnitine palmitoyl transférase II
 CRAT : Carnitine acétyltransférase
 CRE : « CREB Response Element »
 CREB : « cAMP response element Binding protein »
 CROT : Carnitine octanoyltransférase
 Ct : « Threshold cycle »
 Cu-SOD : Superoxyde dismutase à cuivre
 CXCL : « Chemokine (CXC motif) ligand »
 CYP7A1 : Cholesterol 7α-hydroxylase A1
 CYP7B1 : Cholesterol 7α-hydroxylase B1
 Cyt c : Cytochrome c
 Cyt b : Cytochrome b

D

DAB : Di-Amino-benzidine
 DCA : Acides dicarboxylique
 DCPIP : Dichlorophenolindophenol
 DHA : Acide Docohexaenoïque
 DHAP : Dihydroxyacétone phosphate
 DHAP-AT : Dihydroxyacétone phosphate acyltransférase
 DHCA : Acide Dihydroxycholestanoïque
 DLP-1 : « Dynamin-Like Protein 1 »
 DMEM : « Dulbecco's modified Eagle medium »
 DMSO : Diméthylsulfoxyde
 Dnmp1 : « DRP-mediated peroxisomal fission »
 DPA : Acide docosapentaenoïque
 D-PBE : D-peroxisomal bifunctional enzyme
 DPBS : D-phosphate Buffer saline
 DRP : « Dynamin-Related Protein »
 DTNB : Acide 5, 5' dithiobis 2-nitrobenzoïque
 DTT : Dithiothréitol

E

EC : Ester de cholestérol
 EDT A : Acide éthylène diamine tétraacétique
 ER : « Estrogen receptor »
 ERO : Espèces Réactives de l'oxygène
 ERRα : Récepteur à l'œstrogène alpha

F

FABPc : « Fatty acid binding protein » (cytosolic)
 FABP : « Fatty Acid Binding Protein »
 FABPpm : « Fatty acid binding protein » (plasma membrane)
 FAD : Flavine adénine dinucléotide
 FAT/CD36 : Fatty acid translocase
 FATP : « Fatty acid transport protein »
 Fis1 : « Mitochondrial fission 1 protein »
 FMN : Flavine mononucléotide
 FOXO1 : « Forkhead Box O 1 »

G

GABP :« GA binding protein transcription factor »
 GNPAT : Glycerone phosphate acyltransferase
 GR : Récepteur aux glucocorticoïdes
 GSK3β : Glycogen synthase kinase 3β
 GTP :Guanidine triphosphate

H

H₂O₂ :Peroxyde d'hydrogène
 HEPES :Acide 4-(2-hydroxyéthyl)-1-pipérazine éthane sulfonique
 HMG :« High mobility group »
 HMGB :« High mobility group box »
 HNF4α :« Hepatic nuclear factor 4 alpha »
 HRP :« Horse Raddish Peroxidase »
 HSP :« Heavy strand promotor »

I

iNOS :« Inducible nitric oxide synthase »
 IRD :« Infantile Refsum Disease »

K

Kb : kilobases
 KCN : Cyanure de potassium
 kDa : kilodalton
 KO :« knock out »

L

LCACS : Acyl-CoA synthétase à longue chaîne
 L-PBE :« L-peroxisomal Bifunctional Enzyme »
 LSP :« Light strand promoter »
 LTb4 : Leucotriènes B4

M

MAPL : « Mitochondria-anchored Protein ligase »
 MDVs : Vésicules dérivés de la mitochondrie
 MEF2-C :« Myocyte enhancer factor 2C »
 MEM : Membrane Externe Mitochondriale MFP2 :
 « Multi-functional protein 2 »
 MIM : Membrane Interne Mitochondriale
 mPTS :« Membrane peroxisomal targeting signal »
 mTERF :« Mitochondrial transcription termination factor »
 Myop2 :« Myopalladin 2 »

N

NaCl : Chlorure de sodium
 NAD : Nicotinamide adenine dinucleotide
 NaN₃ : Azide de sodium
 NASH : Stéatose hépatique non alcoolique
 NO :Monoxyde d'azote
 NP40 : Nonidet P40
 NRF :« Nuclear Respiratory Factor »

O

OCTN3 : Transporteur de carnitine
 O_H : Origine de réplcation de brin lourd

ONOO : Peroxynitrite

P

PAF : Facteurs d'activation des plaquettes
 PBD :« Peroxisomal biogenesis disorder »
 PEPCK :Phosphoenolpyruvate carboxykinase
 PEX :Peroxine
 PFA :« Phenylfatty acid »
 PHYT : Acide phytanique
 PKA : Protein Kinase A
 PL : Plasmalogènes
 PMP : Proteine membranaire peroxysomale
 PMSF :Phenylmethanesulfonylfluoride
 P-NALD : Pseudo-NeonatalAdrenoleukodystrophy
 POLMRT : ARN polymérase mitochondriale
 PP : proliférateurs de peroxysomes
 PPARα :« Peroxisome Proliferator Activated Receptor α »
 PPRE : Élémentde réponse aux proliférateurs de peroxysome
 PRC :« PGC-1α Related Coactivator »
 PRIS : Acide pristanique
 pTH1 :Peroxisome thiolase 1
 PTS :« Peroxisomal Targetting Signal »
 PVDF :« Polyvinylidene fluoride »
 P38MAPK :« P38 Mitogen-activated protein kinase »
 P160MBP :« P160 Myb binding protein »

Q

qPCR : PCR quantitative

R

RCDP : Chondroplasie rhizomélique ponctuée
 RE : Réticulum endoplasmique
 RXRα : Récepteur à l'acide rétinoïque

S

SCP :« Sterol Carrier Protein »
 SCPx : « Sterol Carrier protein x »
 SDH : Succinate déshydrogénase
 SDS :Sodium dodecylsulfate
 SIRT1 : Sirtuine 1
 Sn : Numérotation stéréospécifique
 SP1 : « Stimulatory protein 1 »
 SNC : Système Nerveux central
 SRC :« Steroid Receptor Coactivator 1 »
 S6K1 : S6 kinase 1
 SVF : Sérum de Veau Fœtal

T

THCA : Acide Trihydroxycholestanoïque
 TFAM :« Mitochondrial transcription factor A »
 TFB1M :« Mitochondrial transcription factor B1 »
 TFB2M :« Mitochondrial transcription factor B2 »
 TNF-α :« Tumor Necrosis Factor-alpha »

U

UE : Unité enzymatique

UCPs : « Uncoupling Protein »

UQ : Ubiquinone

V

VLCACS : Acyl-CoA synthétase à très longue chaîne

VLCS1 : « Very long chain acyl-CoA synthetase »

X

X-ALD : « X-linked Adrenoleukodystrophy »

Y

YY1 : « Ying Yang 1 »

Z

Zn-SOD : Superoxyde dismutase à zinc

ZS : « Zellweger Syndrome »



Introduction

Les peroxysomes sont des organites ubiquitaires découverts en 1954 par Rhodin. La première fonction peroxysomale, découverte par De Duve en 1966, a été la décomposition de l' H_2O_2 en H_2O et O_2 par la catalase. Chez les mammifères, les peroxysomes sont le siège de la β -oxydation des acides gras à très longue chaîne (AGTLC) et de l' α -oxydation des acides gras branchés. Quelques années plus tard, la découverte de l'implication des peroxysomes dans des maladies génétiques humaines a souligné le rôle physiologique de cet organite. Parmi ces maladies, la pseudo-adrénoleucodystrophie néonatale (P-NALD) est une maladie peroxysomale rare liée à la déficience en acyl-CoA oxydase 1 (ACOX1) qui catalyse la première étape de la voie classique de la β -oxydation permettant la dégradation des AGTLC. Cette maladie neurodégénérative est caractérisée par une accumulation des AGTLC, particulièrement l'acide lignocérique (C24:0) et l'acide cérotique (C26:0) dans le plasma et les tissus. Les patients atteints de P-NALD souffrent de symptômes sévères tels qu'une hypotonie généralisée, une hépatomégalie, un développement moteur retardé, une démyélinisation de la matière blanche au niveau du système nerveux central et meurent pendant l'enfance. Le modèle murin déficient pour l'ACOX1 a été développé dans le laboratoire du Pr. Reddy en 1996. Les souris *Acox1*^{-/-} sont viables mais non fertiles, présentent un retard important de croissance et accumulent les AGTLC au niveau plasmatique. Ces souris développent une stéatose hépatique suivie d'une régénération des hépatocytes qui s'accompagne d'une prolifération spontanée des peroxysomes. Les souris *Acox1*^{-/-} finissent par développer une hépatocarcinogenèse, due à l'activation chronique de PPAR α (peroxisome proliferator activated-receptor alpha).

L'objectif de mon travail de thèse a consisté à étudier les effets de la déficience en ACOX1, dans le seul modèle *in vitro* de fibroblastes provenant de patients atteints de P-NALD, sur les fonctions peroxysomales et sur le métabolisme du cholestérol. Ce modèle cellulaire a également servi à décrire la voie inflammatoire déclenchée suite à la déficience en ACOX1. Les fibroblastes humains de patients P-NALD et les foies de souris *Acox1*^{-/-} ont également été les modèles dans lesquels j'ai étudié les effets de la déficience en ACOX1 sur la morphologie et les fonctions mitochondriales.

Dans ce manuscrit, le travail est présenté sous forme de quatre parties principales :

- La première partie est composée des rappels bibliographiques où sont décrits les peroxysomes, le processus de leur biogenèse, leurs fonctions métaboliques, la description de l'ACOX1, les maladies peroxysomales, la P-NALD et le modèle murin

Acox1^{-/-}. Ceci est complété par un aperçu sur les interrelations peroxysome et mitochondrie, un rappel sur les fonctions mitochondriales ainsi que sur les voies de signalisation et les facteurs de transcription qui les régulent. Cette partie de rappels bibliographiques constitue une synthèse des connaissances récentes et actualisées sur le peroxysome, la mitochondrie et leurs interrelations.

- La seconde partie expose les différentes méthodes scientifiques qui ont été utilisées pour la réalisation de ce travail avec les conditions dans lesquelles les expériences ont été réalisées.
- La troisième partie aborde les résultats obtenus pour répondre à la problématique de cette thèse, à savoir les effets de la déficience en ACOX1 humaine ou murine sur les fonctions peroxysomales, sur le métabolisme lipidique et sur les fonctions mitochondriales. Cette partie est organisée sous forme de quatre chapitres de résultats : le chapitre I décrit la réponse inflammatoire dans les fibroblastes de patients P-NALD publiée dans le journal *Endocrinology* 2012, le chapitre II montre le comportement de la voie de synthèse du cholestérol en absence de l'activité Acyl-CoA oxydase 1 dans les fibroblastes humains, le chapitre III évoque les effets de l'absence de l'ACOX1 humaine sur la morphologie et les fonctions peroxysomales et finalement, le chapitre IV traite les effets de la déficience en ACOX1 humaine et en ACOX1 murine sur la morphologie et les fonctions mitochondriales.
- La quatrième partie est consacrée à la discussion générale de l'ensemble des résultats. Les conclusions et les perspectives de ce travail sont présentées à la fin de cette partie en proposant un certain nombre d'expériences qui permettraient de répondre aux interrogations soulevées par ce travail.



Rappels Bibliographiques

A. Le peroxysome

A.1 Découverte

L'histoire des peroxysomes remonte à 1954 quand Rhodin utilisa le terme « microbody » pour désigner un organite présent dans les reins de souris au niveau des tubules proximaux. Ces « microbodies » présentaient une membrane simple et une matrice finement granulaire (Rhodin, 1954). Cette même structure fut décrite en 1956 par Rouiller dans le foie de rat au niveau des cellules parenchymateuses (Bernhard et Rouiller, 1956).

Par la suite, les études menées par Baudhuin et *al.* en 1965, sur des sections de foie de rat, montrèrent que les « microbodies » sont le siège de 3 activités enzymatiques : celles de l'uricase, de la D-amino-acide oxydase et de la catalase (Baudhuin et al., 1965).

L'appellation « peroxysome » de cet organite a été proposée par De Duve suite à la découverte de sa première fonction, la décomposition du peroxyde d'hydrogène ($2\text{H}_2\text{O}_2$) en $2\text{H}_2\text{O}$ et en O_2 par la catalase (De Duve et Baudhuin, 1966). Le terme « glyoxysome » a aussi été utilisé pour les « microbodies » en 1967 par Breidenbach et Beevers dans les graines en germination en raison de la présence du cycle du glyoxylate (Breidenbach et Beevers, 1967). Ce terme est maintenant utilisé pour les « microbodies » contenant au moins la malate synthétase et l'isocitrate lyase, deux enzymes impliquées dans le cycle du glyoxylate.

Les peroxysomes, présents dans toutes les cellules eucaryotes (Hruban et al., 1972) et absents chez les procaryotes, se caractérisent morphologiquement comme des particules allant de 0,1 μm à 1,5 μm de diamètre. Ils sont délimités par une simple membrane phospholipidique de 6 à 8 nm d'épaisseur. Chez les rongeurs, les carnivores et les ongulés, les peroxysomes se trouvent souvent dans le cytoplasme à proximité du réticulum endoplasmique. Les peroxysomes présentent un corps dense aux électrons en microscopie électronique appelé « nucléoïde ». Ce nucléoïde correspondant à la présence de l'urate oxydase (Afzelius, 1965; Shnitka, 1966) et il est absent chez les humains et les oiseaux.

Le marquage histochimique spécifique en microscopie photonique et électronique du peroxysome (Figure 1) est devenu possible avec la réaction de la 3,3'-diaminobenzidine (DAB) en milieu alcalin mettant en évidence l'activité peroxydasique de la catalase (Fahimi, 1968; Fahimi, 1969; Novikoff et Goldfischer, 1969).

Les peroxysomes sont impliqués dans de nombreuses voies métaboliques importantes. D'une part, ils participent à la dégradation des AGTLC via la voie de la β -oxydation peroxysomale et la voie de l' α -oxydation de l'acide phytanique. D'autre part, ils sont

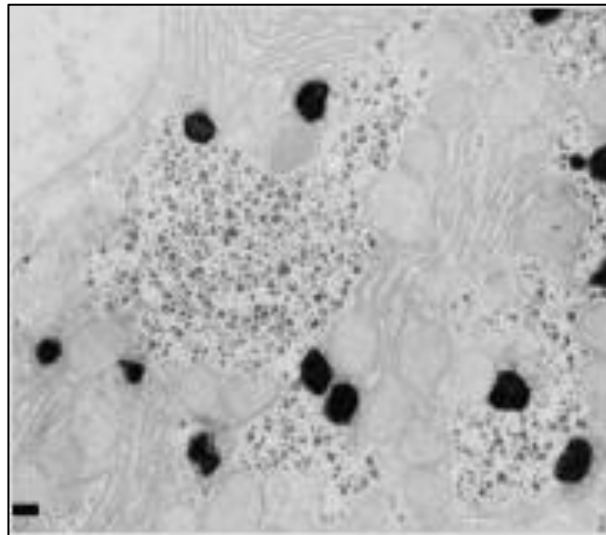


Figure 1. Image de peroxysomes en microscopie électronique.

Les peroxysomes hépatiques de rat ont été marqués grâce à l'activité peroxydasique de la catalase avec la diaminobenzidine (DAB) et apparaissent sous formes de points noirs. D'après (Gondcaille et al., 2005).

impliqués dans la synthèse des lipides tels que les esters de phospholipides, les plasmalogènes et les acides biliaires (Schrader et Fahimi, 2008).

A.2. La biogenèse des peroxysomes

Le mécanisme de la biogenèse du peroxysome a longtemps été controversé mais l'utilisation de souches mutantes de levures ainsi que des fibroblastes humains ont mieux aidé à éclaircir ce phénomène. La biogenèse des peroxysomes implique des protéines particulières appelées peroxines. Actuellement, on dénombre 32 peroxines codées par les gènes *PEX* (Brown et Baker, 2008). Chez l'homme, la déficience de certaines peroxines affectant la biogenèse des peroxysomes est associée à des maladies très sévères : les désordres liés à la biogenèse du peroxysome ou PBD (« Peroxisome Biogenesis Disorders »).

A.2.1. Origine des peroxysomes et rôle du réticulum endoplasmique

Deux théories ont été émises concernant l'origine du peroxysome. La première montrait que les peroxysomes proliféraient par croissance et division à partir de peroxysomes préexistants (Lazarow et Fujiki, 1985; Purdue et Lazarow, 2001). La deuxième théorie montrait que les peroxysomes dérivait du réticulum endoplasmique (RE) (Geuze et al., 2003; Titorenko et Rachubinski, 2001). La preuve en faveur de la contribution du RE à la biogenèse des peroxysomes est apportée grâce aux études effectuées chez la levure *Saccharomyces cerevisiae* (Hoepfner et al., 2005). En effet, deux peroxines interviennent précocement dans la biogenèse du peroxysome chez la levure : Pex3p et Pex19p. La peroxine Pex3p est une protéine membranaire intégrale qui se concentre tout d'abord au niveau de certains domaines du RE. Ces domaines bourgeonnent pour former des vésicules qui évoluent par la suite en peroxysomes. La peroxine Pex19p est localisée en premier dans le RE où se trouve également Pex3p puis ensuite ces deux peroxines se retrouvent dans les peroxysomes. En effet, Pex3p recrute Pex19p au niveau du RE pour former le complexe Pex3p/Pex19p qui va permettre d'importer d'autres protéines membranaires peroxysomales (PMP) conférant aux peroxysomes naissants la capacité d'importer toutes les protéines matricielles pour devenir fonctionnel (Figure 2) (Hoepfner et al., 2005; Kunau, 2005). Chez les mammifères, les peroxysomes dérivent également du RE (Titorenko et Mullen, 2006). Les études réalisées sur les cellules dendritiques de souris (riches en peroxysomes et ayant un système vacuolaire bien développé) ont montré que Pex3p et le transporteur ABC (« ATP binding cassette ») PMP70 (protéine de la membrane peroxysomale de 70 kDa) sont présents dans des régions localisées

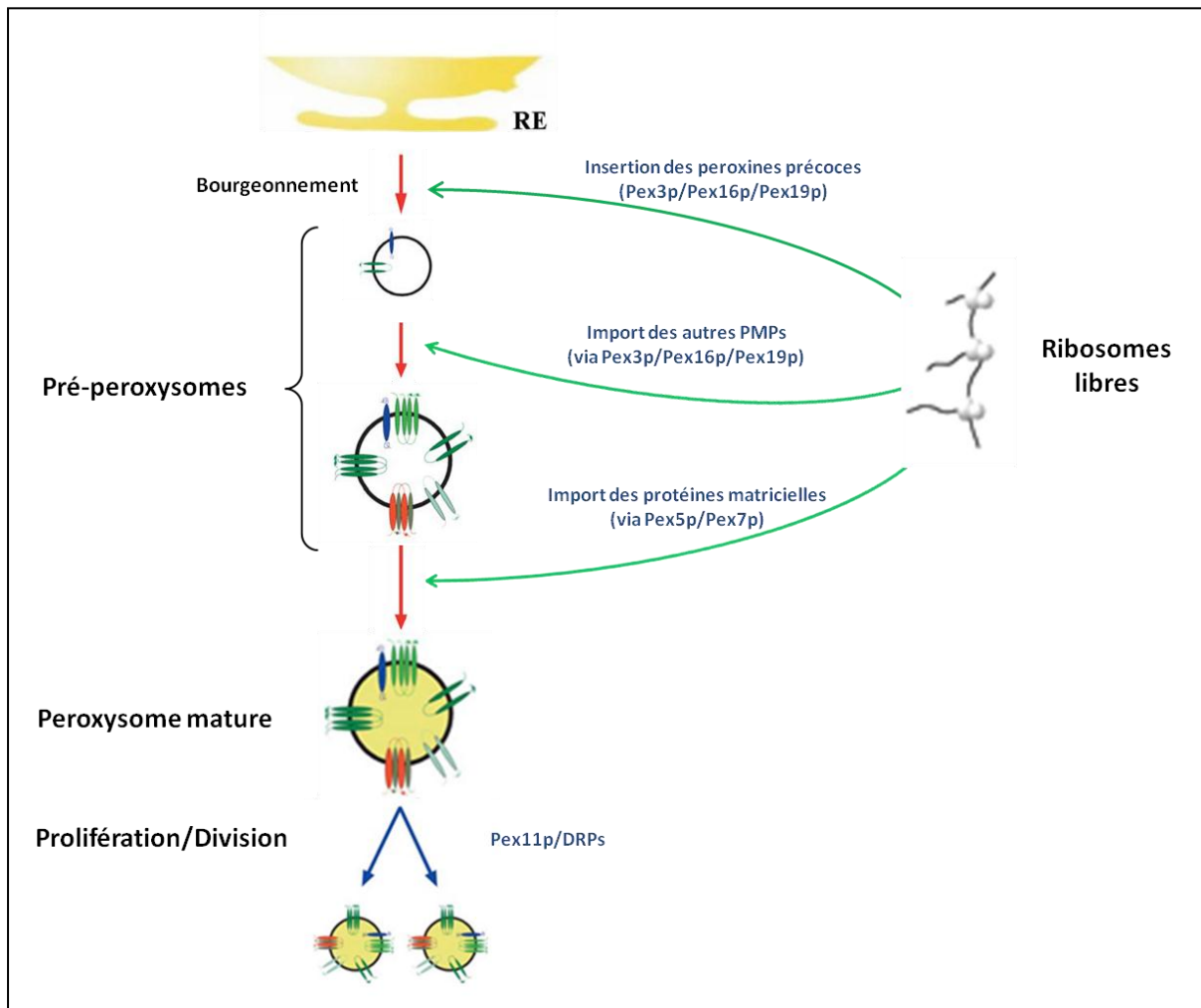


Figure 2. Modèle global du processus de biogenèse des peroxysomes.

Les vésicules pré-peroxysomales contenant les peroxines précoces (*pex3p* et *Pex16p*) bourgeonnent à partir du réticulum endoplasmique (RE). D'autres protéines de la membrane peroxysomale (PMPs) sont importées dans ces vésicules grâce aux peroxines précoces et à *Pex19p*. Finalement, les vésicules importent leurs protéines matricielles pour former des peroxysomes matures. Schéma adapté d'après (Holroyd et Erdmann, 2001) et (Eckert et Erdmann, 2003).

du RE en continuité avec des structures membranaires à partir desquelles dérivent les peroxysomes (Geuze et al., 2003). En plus de Pex3p et Pex19p, il a été observé que Pex16p, une protéine membranaire intégrale, est également indispensable à la biogenèse des peroxysomes chez les mammifères (Kim et al., 2006).

A.2.2. Import des protéines peroxysomales

A.2.2.1. Import des protéines membranaires

Les peroxysomes sont des organites dépourvus d'ADN qui ne peuvent pas synthétiser leurs protéines et doivent donc les importer (Subramani et al., 2000). Les protéines membranaires peroxysomales (PMP) sont synthétisées dans le cytosol au niveau de ribosomes libres et sont adressées par la suite, par des signaux d'adressage mPTS (membrane Peroxisomal Targeting signal), vers les membranes des peroxysomes ou elles y seront insérées (Platta et Erdmann, 2007). Deux classes de PMP se distinguent : les PMP de classe I qui nécessitent une reconnaissance du signal mPTS par la Pex19p, lequel interagirait par la suite avec Pex3p et Pex16p présentes dans la membrane du peroxysome naissant (Fang et al., 2004) et les PMP de classe II qui passent par le RE avant d'être adressés au peroxysome indépendamment de Pex19p (Heiland et Erdmann, 2005).

A.2.2.2. Import des protéines de la matrice peroxysomale

Après leur synthèse dans le cytosol au niveau des ribosomes libres, les protéines matricielles sont adressées au peroxysome grâce à des signaux PTS (Peroxisomal Targeting Signal). Il existe deux types de signaux PTS : PTS-1 et PTS-2 (Peroxisomal targeting signal Type 1 and Type 2).

Le signal PTS-1 (présent chez 95% des protéines de la matrice) est un tripeptide conservé présent à l'extrémité C-terminale de la protéine (Gould et al., 1989) constitué d'un triplé de résidus d'acides aminés séryl-lysyl-leucine (S-K-L). Cependant, il existe quelques substitutions d'aminoacyls pour ce signal et la séquence consensus du PTS-1 est : [S/A/C]-[K/R/H]-[L/M] (Erdmann et Schliebs, 2005). De plus, la présence de certains aminoacides en amont du tripeptide SKL jouerait un rôle important pour l'affinité au récepteur Pex5p ((Brocard et Hartig, 2006). Les protéines de la matrice peroxysomale sont importées vers le peroxysome via Pex5p qui reconnaît leur signal PTS-1, puis le complexe récepteur-protéine est transporté vers le peroxysome où il interagit avec Pex14p. Ensuite, le sous-complexe d'ancrage Pex14p/Pex13p/Pex17p permet le déplacement du complexe récepteur-protéine vers le sous-complexe de translocation Pex2p/Pex8p/Pex10p/Pex12p. La translocation des

protéines matricielles est couplée à la dissociation du récepteur Pex5 nécessitant Pex8p, une peroxine membranaire qui se trouve du côté de la matrice et permet la liaison des deux sous-complexes (Platta et Erdmann, 2007). Après l'import, Pex5p est soit monoubiquitinylée par Pex4p et Pex22p et est réutilisée pour un nouvel import, soit polyubiquitinylée et alors est dégradée par le protéasome dans le cytosol (Figure 3) (Platta et al., 2007).

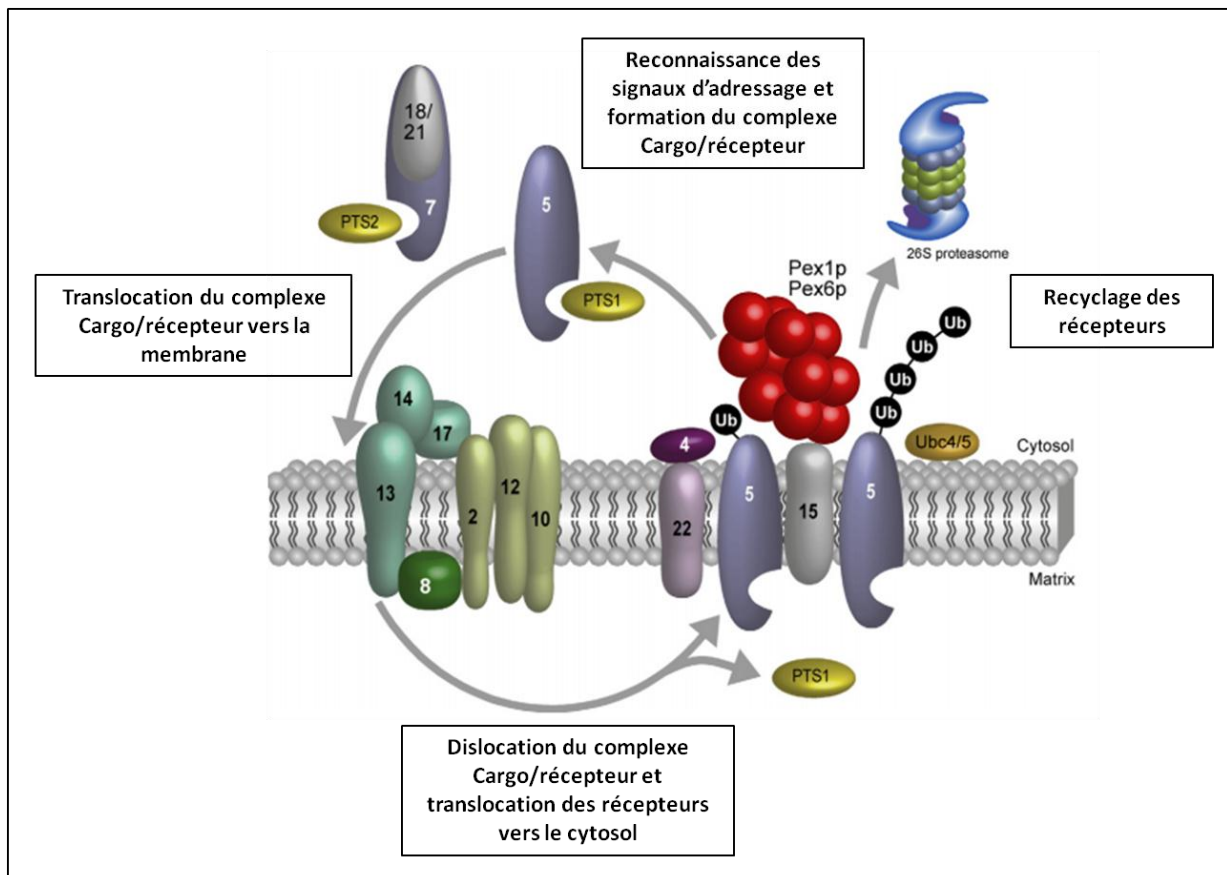


Figure 3. Importation des protéines dans la matrice peroxysomale.

La protéine Pex5p reconnaît le signal PTS-1 alors que Pex7p reconnaît le signal PTS-2 et se lie à Pex18p et Pex21p chez la levure (Pex2p et Pex5pL étant les homologues respectifs chez les mammifères). Une fois formé, le complexe cargo/récepteur se lie à la membrane peroxysomale grâce au complexe d'ancrage composé de Pex13p, Pex14p et Pex17p lui-même associé au complexe RING finger Pex2p/Pex10p/Pex12p via Pex8p. Cela permet l'import des protéines dans la matrice peroxysomale. Le cargo PTS-1 est ensuite recyclé par ubiquitinylation de Pex5p en présence de Pex1p, Pex4p, Pex6p et Pex22p. Le cargo retourne alors dans le cycle d'import. Quand Pex5p est polyubiquitinylée, le cargo est dégradé au niveau du protéasome. Schéma adapté de (Platta et Erdmann, 2007).

Le signal PTS-2 est localisé dans la partie N-terminale de la protéine et comprend une séquence variable composée d'un motif de 9 acides aminés [R/K]-[L/I/V]-X₅-[H/Q]-[L/A] (Platta et Erdmann, 2007). Bien que le mécanisme d'import des protéines à PTS-2 soit

similaire à celui des protéines PTS-1, quelques différences existent. Le signal PTS-2 est reconnu par le récepteur Pex7p dans le cytosol. Chez la levure, Pex7p se lie à Pex18p/Pex21p pour s'ancrer au complexe de fixation Pex13p/Pex14p de la membrane peroxysomale et est ensuite recyclée vers le cytosol. Chez l'homme, l'homologue de Pex21p est Pex5pL, une forme longue de Pex5p qui se lie à Pex7. Ainsi, dans les cellules de mammifères, l'adressage des protéines à PTS-2 dépend de Pex5pL pour acheminer le cargo Pex7p/protéine matricielle vers la matrice peroxysomale (Figure 3, p37) (Mukai et Fujiki, 2006; Schliebs et Kunau, 2006).

A.2.3. La dynamique peroxysomale

Dans la cellule, le nombre de peroxysome est régulé soit par fission pendant le cycle cellulaire, soit par prolifération, soit par pexophagie (lyse des peroxysomes).

A.2.3.1. La fission des peroxysomes

Les peroxysomes, comme tous les organites cellulaires, dupliquent leur contenu au cours de la division de la cellule (Figure 4). Ce phénomène, commun aux organites qui se multiplient de façon autonome, nécessite un ensemble de protéines pour la fission de l'organite et le maintien de leur nombre. Au cours de la division cellulaire, les peroxysomes sont repartis de manière équivalente entre la cellule fille et la cellule mère (Hoepfner et al., 2001) : une partie des peroxysomes est associée au cortex de la cellule mère et l'autre partie, dynamique, se déplace vers le bourgeon en formation. Chez la levure, les dynamines GTPases Vsp1p et Inp1p, jouent un rôle clé au cours de la division peroxysomale. La protéine Vsp1p est impliquée dans le processus de division du peroxysome alors qu'Inp1p, qui est associée au peroxysome, contrôle la répartition des peroxysomes entre cellule mère et cellule fille (Fagarasanu et al., 2007). Au cours de ce processus, les peroxysomes sont véhiculés vers le bourgeon le long des filaments d'actine via la protéine Myo2p (van der Zand et al., 2006).

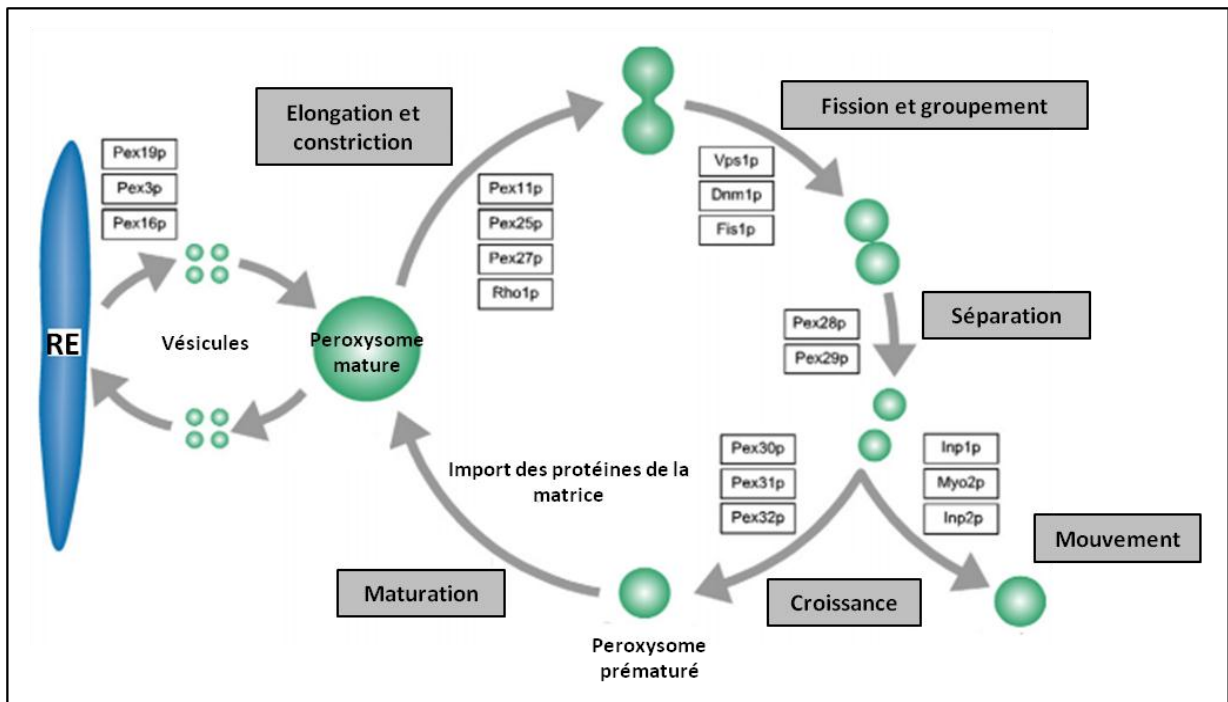


Figure 4. Modèle du processus de prolifération et de division du peroxysome chez *S. Cerevisiae*. Les PMPs *Pex19p*, *Pex3p* et *Pex16p* facilitent l'insertion des protéines membranaires peroxysomales. Chez *Y. lipolytica*, la formation des peroxysomes matures implique la fission de vésicule précurseur. Les peroxines *Pex11p*, *Pex25p* et *Pex27p* sont responsables de l'élongation et de la constriction du peroxysome mature. Celui-ci subit ensuite la fission sous l'action des dynamines *Vps1p* (*DLP1*) et *Dnm1p*. Les peroxysomes issus de la fission, sont groupés et sont, par la suite, séparés grâce à *Pex28p* et *Pex29p*. La taille des peroxysomes semble être contrôlée par *Pex30p*, *Pex31p* et *pex32p* (orthologue de *Pex24p* chez *Y. lipolytica*). Le mouvement des peroxysomes le long des filaments d'actine requiert *Inp1p*, *Myo2p* et *Inp2p*. Schéma adapté de (Platta et Erdmann, 2007).

A.2.3.2. La prolifération des peroxysomes

L'abondance des peroxysomes varie en fonction du type cellulaire et des besoins métaboliques. Plusieurs composés chimiques tels que des hypolipémiants, des antidiabétiques, des anti-inflammatoires, ou encore certains plastifiants alimentaires et herbicides, induisent l'augmentation de la taille et du nombre des peroxysomes dans le foie des rongeurs et sont donc nommés des proliférateurs de peroxysomes (PP) (Reddy et Hashimoto, 2001a). Chez les rongeurs, cette prolifération induite est observée essentiellement dans le foie, avec une moindre importance au niveau du cœur, de l'intestin, des poumons et des reins et est absente dans le cerveau, le pancréas (Reddy et Hashimoto, 2001a).

Toutes les espèces ne répondent pas de la même façon aux proliférateurs de peroxysomes : les rats et les souris y sont très sensibles (Pacot et al., 1993; Reddy et al., 1986) tandis que l'homme, le cobaye, le chien et le singe y sont insensibles (Foxworthy et al., 1990; Lake et Gray, 1985; Richert et al., 1996). Chez les rongeurs, la prolifération des peroxysomes nécessite l'activation du récepteur nucléaire PPAR α (Peroxisome Proliferator-Activated Receptor α) et s'accompagne d'une hépatomégalie et d'une induction de certaines voies métaboliques peroxysomales notamment la β -oxydation des acides gras. De plus, le traitement à long terme par ces PPs provoque une hépatocarcinogénèse liée au stress oxydatif, à l'activation de proto-oncogènes (Cherkaoui Malki et al., 1990b) et au stress du RE. En effet, suite à la prolifération peroxysomale, le contenu des hépatocytes en peroxysomes augmentent de 2 à 25% et la masse du foie peut atteindre 10% du poids total de l'animal contre 4 à 5% en conditions physiologiques normales (Reddy, 2004).

La prolifération des peroxysomes est un processus complexe qui implique des voies de signalisations, des modifications au niveau de l'expression génique ainsi que des modifications post-traductionnelles de certaines protéines. Chez les mammifères, Pex11 existe sous trois isoformes : Pex11 α , Pex11 β , et Pex11 γ (Abe et Fujiki, 1998; Schrader et al., 1998). Ainsi, les proliférateurs de peroxysomes activent la transcription des gènes cibles de PPAR α et induisent Pex11 α (Li et al., 2002). Le gène *Pex11 β* est exprimé de manière constitutive à des niveaux similaires dans tous les tissus et n'est pas inductible par les PPs. De plus, la délétion de ce gène ne trouble que modérément l'import des protéines peroxysomales et le métabolisme peroxysomal. L'inactivation des deux gènes Pex11 α et Pex11 β chez la souris provoque des troubles neurologiques graves et les souris meurent rapidement. Cependant, les peroxysomes sont présents dans les cellules et le métabolisme peroxysomal est peu affecté. Ces observations laissent penser que Pex11 α est responsable de la prolifération peroxysomale

en réponse à des stimuli externes et que Pex11 β est nécessaire à la biogenèse constitutive des peroxysomes (Li et al., 2002). La troisième isoforme Pex11 γ est exprimée constitutivement dans le foie et pourrait avoir une fonction redondante comparée à celle de Pex11 β (Tanaka et al., 2003).

Récemment, chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*, en plus de Pex11, de nouvelles peroxines semblent être impliquées dans la prolifération des peroxysomes: Pex25p, Pex27p, Pex28p, Pex29p, Pex30p, Pex31p et Pex32p (Rottensteiner et al., 2003; Vizeacoumar et al., 2003).

La prolifération peroxysomale ferait intervenir également des protéines à activités GTPase, la famille des Dynamin-Related Protein (DRP). Elles interagissent avec des protéines du cytosquelette impliquées dans les processus d'endocytose, de phagocytose et de fission des peroxysomes. La dynamine DLP-1 (ou Dynamin-Like Protein1) chez les mammifères serait impliquée dans la fission des peroxysomes. Alors que Pex11 semble intervenir tout d'abord dans l'étape d'élongation puis dans l'étape de division, DLP-1 semble participer uniquement à l'étape de division (Thoms et Erdmann, 2005).

A.2.3.3. La pexophagie

La régulation du nombre de peroxysome au sein de la cellule est un processus important. D'un côté, il permet l'augmentation de leur nombre en réponse à un stress physiologique et d'un autre côté, de les diminuer quand la période de stress est terminée. Le processus de régulation du nombre de peroxysome par dégradation sélective est une autophagie appelée pexophagie. Deux mécanismes seraient impliqués dans la pexophagie : la micropexophagie et la macropexophagie (Figure 5, p42).

Au cours de la micropexophagie, le peroxysome est pris en charge par une vacuole suivant un processus d'invagination. Il sera par la suite dégradé sous l'action des hydrolases dans la lumière du lysosome. La macropexophagie survient exclusivement quand le peroxysome mature subit une séquestration membranaire. La séquestration complète aboutit à la formation d'une structure appelée pexophagosome qui correspond à un peroxysome entouré de deux membranes. La membrane externe de ce pexophagosome fusionne avec la vacuole et conduit à la libération du peroxysome qui sera par la suite, dégradé dans la lumière de la vacuole par des hydrolases (Platta et Erdmann, 2007).

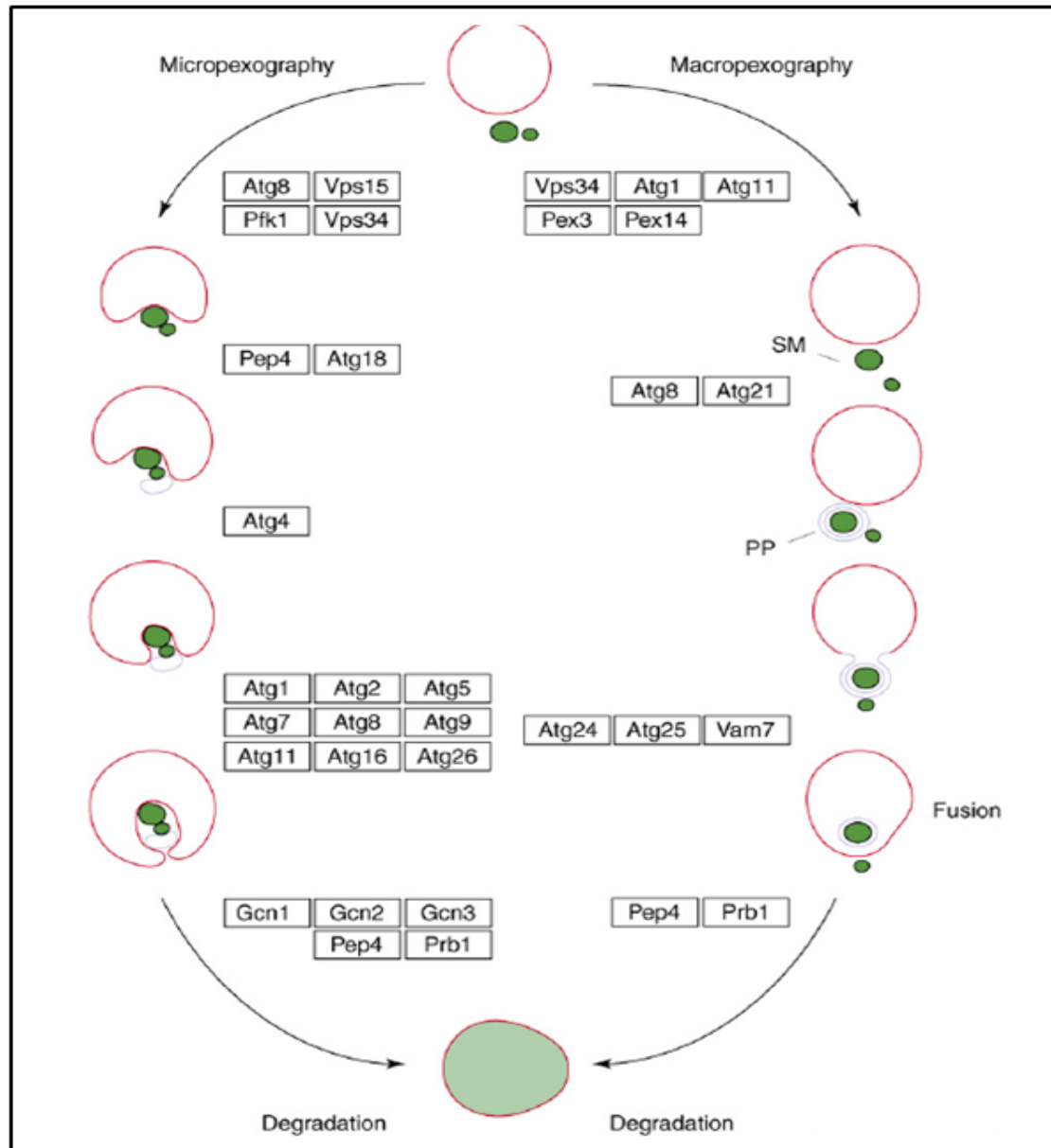


Figure 5. Modèles de pexophagie.

Représentation des deux voies de micropexophagie et de macropexophagie et de différents intermédiaires morphologiques et des protéines impliquées dans ces changements. Après l'initiation de la micropexophagie le peroxysome (en vert) sera englouti par invagination de la membrane vacuolaire (en rouge). Le peroxysome est finalement dégradé dans la lumière de la vacuolaire par des hydrolases. La macropexophagie est un processus spécifique pour les peroxysomes matures. Ces derniers sont reconnus grâce à leur membrane séquestrée (SM). Le processus de séquestration aboutit à la formation du pexophagosome (PP) qui correspond à un peroxysome entouré par deux membranes. La membrane externe du pexophagosome fusionne avec la membrane vacuolaire aboutissant à la libération du peroxysome dans la lumière de la vacuole puis à sa dégradation. Schéma adapté de (Platta et Erdmann, 2007).

B. Les fonctions métaboliques du peroxysome

B.1. Métabolisme des lipides

Les acides gras et leurs esters avec le Coenzyme A (CoA) jouent des rôles multiples dans le processus cellulaire notamment dans la composition des lipides cellulaires, le stockage du carbone sous forme de triacylglycérols, la régulation d'activités enzymatiques, le rôle de ligands des récepteurs nucléaires, de précurseurs d'hormones, de molécules de signalisation et de substrats pour les voies de l' α -, la β - et l' ω -oxydation.

B.1.1. Le système de β -oxydation peroxysomal des acides gras

L'hypothèse de la β -oxydation comme voie de dégradation des acides gras a été émise très tôt. Les études enzymologiques ont débutées dans les années cinquante avec la découverte de la structure du Coenzyme A et la démonstration de la localisation intracellulaire de la voie de β -oxydation dans la mitochondrie. La présence d'un système de β -oxydation des acides gras à l'extérieur du compartiment mitochondrial a été notée dans les glyoxysomes des graines de ricin en germination en 1969 (Cooper et Beevers, 1969). Un système similaire a été décrit dans le peroxysome de foie de rat par Lazarow et De Duve en 1976 (Lazarow et De Duve, 1976).

Chez les plantes et les microorganismes eucaryotes, le peroxysome est le seul site de la β -oxydation, ce qui le rend indispensable pour l'utilisation des acides gras dans ces organismes (Cooper et Beevers, 1969; Poirier et al., 2006). Chez l'homme et les rongeurs, la mitochondrie et le peroxysome sont les deux organites cellulaires au sein desquels se déroule la β -oxydation, principale voie de dégradation des acides gras (Lazarow et De Duve, 1976; Wanders, 2000). Actuellement, il est bien établi que les systèmes de β -oxydation mitochondrial et peroxysomal des acides gras sont présents au sein de la même cellule bien qu'ils jouent deux rôles fonctionnellement différents. Chez l'homme, les dysfonctionnements de la β -oxydation mitochondriale ou ceux de la β -oxydation peroxysomale sont à l'origine de différentes maladies génétiques sévères (Rinaldo et al., 2002)(Wanders, 2004a). Les acides gras, selon leur nature physico-chimique, sont oxydés préférentiellement dans l'un ou l'autre organite et cela souligne la complémentarité de ces deux voies de β -oxydation. Ainsi, selon la longueur de la chaîne carbonée, les AG à courte chaîne (<C6) et à chaîne moyenne (C6-C12) sont principalement oxydés dans la mitochondrie. Les AGLC (C12-C22) sont dégradés dans les mitochondries et les peroxysomes alors que les AGTLC saturés ou insaturés (AGTLC)

(>C22, notamment l'acide hexacosanoïque C26:0) sont métabolisés exclusivement dans le peroxyosome (Chu et al, 1995). Cependant, le peroxyosome est incapable de dégrader complètement les acides gras qu'il prend en charge. En effet, des études métaboliques ont montré que la β -oxydation peroxyosomale ne peut métaboliser un acyl-CoA d'une taille inférieure ou égale à huit carbones (octanoyl-CoA). Ce dernier est par la suite exporté vers la mitochondrie pour subir une β -oxydation complète (Reddy et Hashimoto, 2001a).

Bien que le peroxyosome et la mitochondrie contiennent leurs propres enzymes de β -oxydation qui sont codées par des gènes différents et qui se distinguent par leurs caractéristiques catalytiques et structurales (Wanders et Waterham, 2006a), le mécanisme d'oxydation des acides gras est similaire et implique la même cascade de réactions : (i) α , β déshydrogénation, (ii) hydratation (de la double liaison), (iii) déshydrogénation et (iiii) clivage thiolytique. A la fin de chaque cycle de β -oxydation peroxyosomale, les acides gras sont écourtés de deux atomes de carbones et l'acétyl-CoA libéré peut être transporté vers la mitochondrie et dégradé via le cycle de Krebs en CO₂ et H₂O.

Pour qu'un acide gras soit dégradé par l'une ou l'autre voie de β -oxydation, il doit d'abord être transporté vers l'organite puis activé sous forme d'ester d'acyl-CoA grâce aux acyl-CoA synthétases. Ces enzymes sont différentes du point de vue de leur localisation et de leur spécificité de substrat. Ainsi, les acides gras à longue chaîne (20 atomes de carbones) sont activés dans le cytosol par l'acyl-CoA synthétase à longue chaîne (LCACS) avant d'être transportés vers le peroxyosome alors que les acides gras saturés ou insaturés à très longue chaîne (C>22 atomes de carbone) sont transportés dans le peroxyosome puis activés par l'acyl-CoA synthétase à très longue chaîne (VLCACS) associée à la face interne de la membrane peroxyosomale (Smith et al., 2000).

Le peroxyosome oxyde un groupe d'acides gras que la mitochondrie ne pourrait pas prendre en charge, notamment les acides gras à très longue chaîne (AGTLC) à l'exemple de l'acide lignocérique (C24:0) et l'acide hexacosanoïque (ou acide cérotique, C26:0), mais également l'acide pristanique (l'acide 2, 6, 10, 14-tétraméthylpentadécanoïque) provenant directement de l'alimentation et indirectement de l' α -oxydation de l'acide phytanique ainsi que les acides di- et tri-hydroxycholestanoïques (Wanders et Waterham, 2006a).

Le système de la β -oxydation peroxyosomale métabolise les AGTLC mais également les acides dicarboxyliques à longue chaîne, les eicosanoïdes, les précurseurs des acides biliaires et certains dérivés xénobiotiques (Reddy et Mannaerts, 1994). Les trois enzymes du cycle de β -oxydation peroxyosomale notamment l'acyl-CoA oxydase 1 (ACOX1), l'énoyl-CoA

hydratase/L-3-hydroxyacyl-CoA déshydrogénase (L-PBE) et la 3-cétoacyl-CoA thiolase ont été purifiées il y a une trentaine d'années (Figure 6) (Hashimoto, 1996; Hashimoto, 2000).

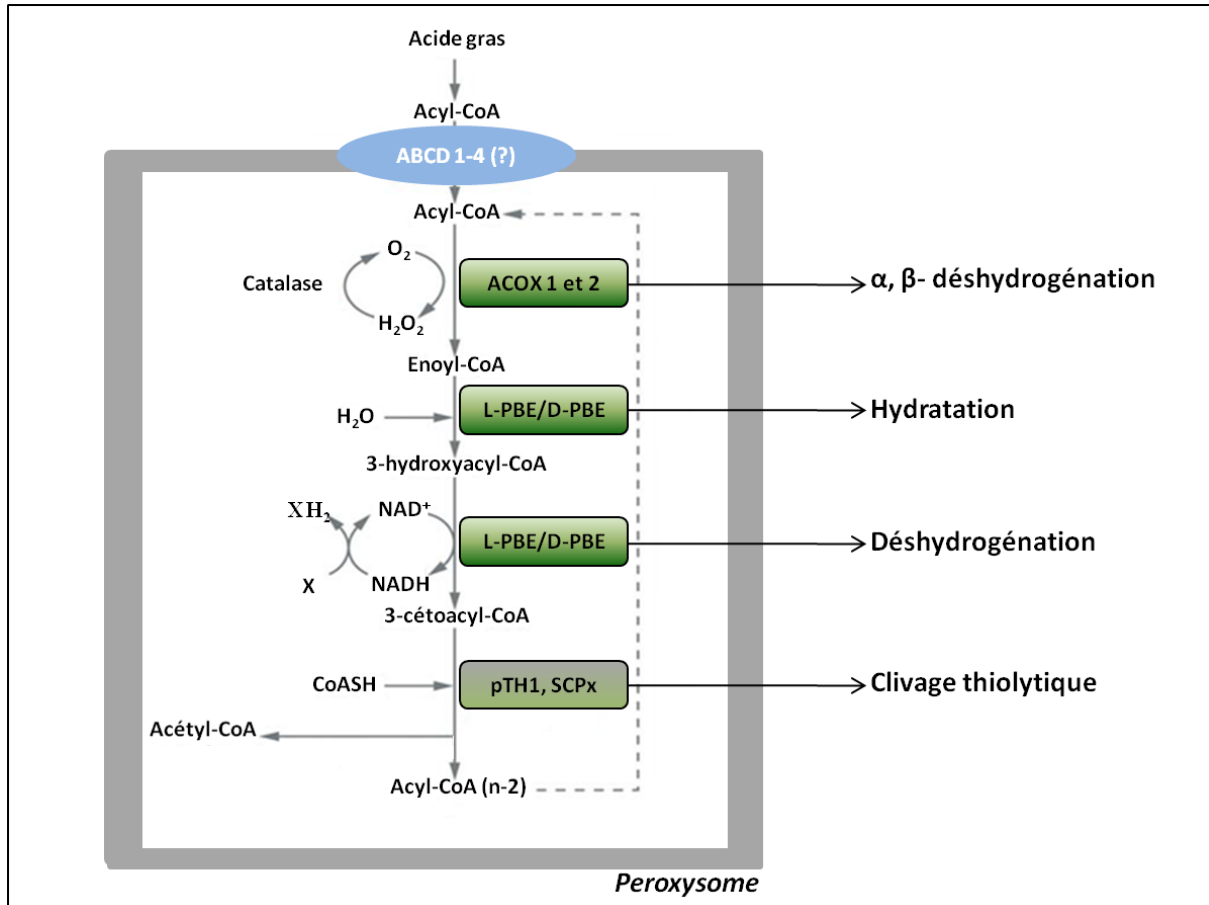


Figure 6. Schéma général de la voie de β -oxydation peroxysomale chez l'homme.

L'acyl-CoA est écourté de 2 atomes de carbone grâce à 4 enzymes: les ACOXs (α , β -déshydrogénation), L-PBE/D-PBE (Hydratation/déshydrogénation) et pTH1/SCPx (Clivage thiolique). Schéma adapté de (Wanders et Waterham, 2006a).

Des travaux plus récents ont identifié d'autres enzymes participant à l'oxydation peroxysomale des AG. Selon la spécificité des substrats et la stéréosélectivité, de nouvelles enzymes ont été découvertes. De ce fait, deux voies de β -oxydation peroxysomales différentes ont été établies : (i) la voie classique catalysée par l'ACOX1, la L-PBE et/ou la D-PBE et la thiolase responsable de l'oxydation des acides gras à chaîne linéaire (Figure 7). Les enzymes

de cette voie sont toutes inductibles au niveau transcriptionnel chez les rongeurs par les activateurs des PPAR α (Reddy et Hashimoto, 2001b), (ii) la voie des AG branchés catalysée par la BCOX, la L-PBE et/ou la D-PBE et la SCPx est responsable de l'oxydation des acides gras 2-méthyle branchés (acide pristanique) ainsi que les intermédiaires des acides biliaires (DHCA et THCA) issus de la dégradation du cholestérol (Figure 7) (Ferdinandusse et Houten, 2006; Verhoeven et Jakobs, 2001).

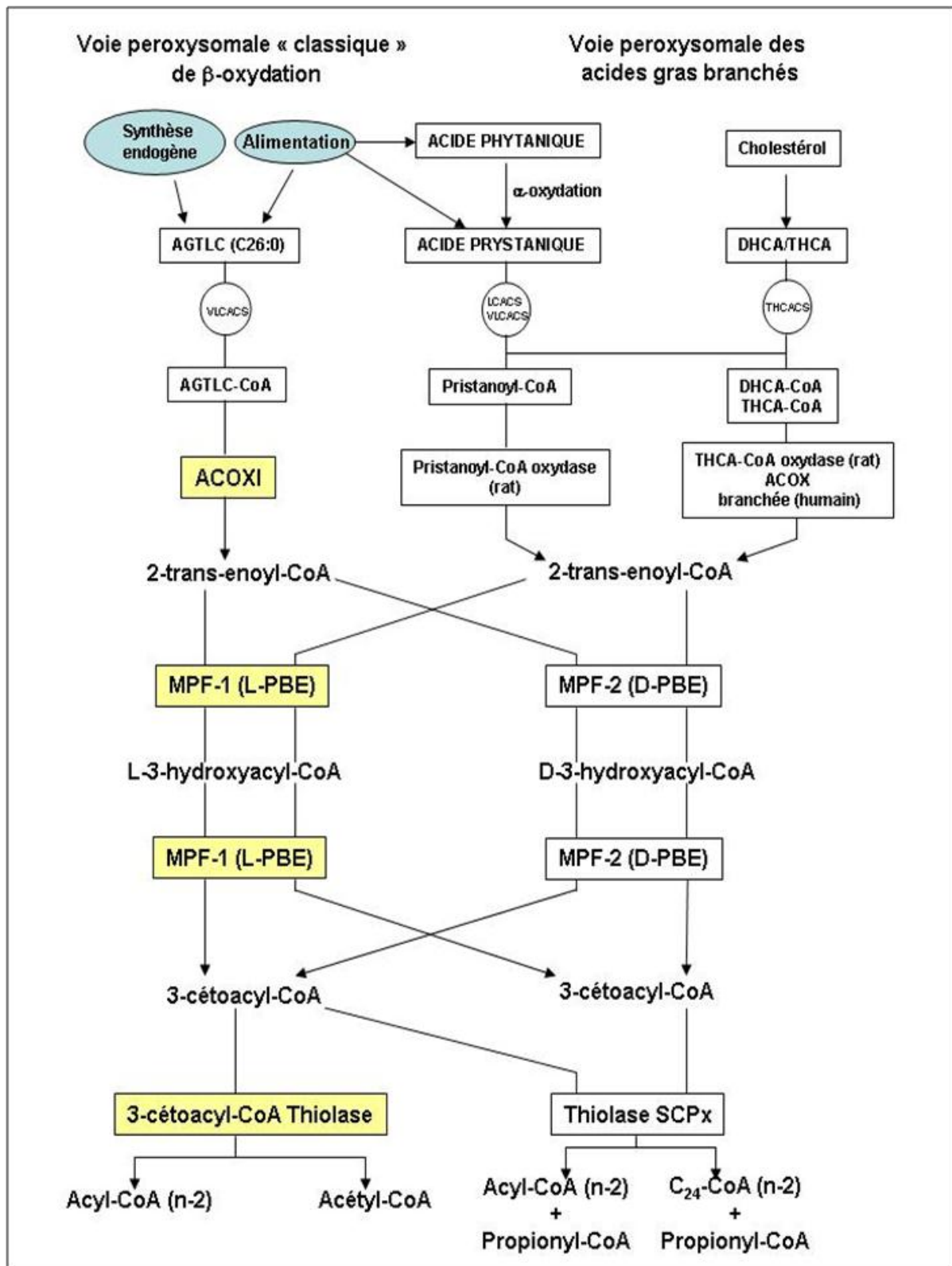


Figure 7. Représentation schématique de la voie et des enzymes impliquées dans la β-oxydation peroxysomale et des acides gras à chaîne linéaire et des acides gras à chaîne ramifiée (acide pristanique et les intermédiaires des acides biliaires).

B.1.1.2. Enzymologie du système peroxysomal de β -oxydation

Actuellement, il est établi que chez l'homme, le peroxysome renferme entre autres deux groupes d'enzymes (Hashimoto, 1999). Le premier groupe est composé de la palmitoyl-CoA oxydase, la L-PBE (PBE : peroxisomal bifunctional enzyme) et la 3-cétoacyl-CoA thiolase alors que le deuxième groupe est composé de l'acyl-CoA oxydase des chaînes ramifiées (Branched Chain Acyl-CoA oxidase), la D-PBE et la SCPx (sterol carrier protein x) (Wanders et Waterham, 2006a).

B.1.1.2.1. Les Acyl-CoA oxydases

Dans le cycle de la β -oxydation peroxysomale, la première étape limitante de la voie est catalysée par l'acyl-CoA oxydase 1 (ACOX1). Cette enzyme catalyse la réaction d' α , β -déshydrogénation de l'acyl-CoA en présence du coenzyme flavine adénine dinucléotidique (FAD) au cours de laquelle l'acyl-CoA est désaturé en 2-trans énoyl-CoA. Toutes les enzymes ACOXs connues sont des flavoprotéines dimériques appartenant à la même superfamille comme les acyl-CoA déshydrogénases tétramériques mitochondriales. Une caractéristique de cette superfamille est la présence d'un domaine central constitué de feuillet β suivi par un domaine en hélices α auquel le FAD est lié (Bhaumik et al., 2005). Lors de la réaction, les électrons du FAD de l'enzyme ACOX1 sont transférés directement sur un atome d'oxygène aboutissant à la génération d'une molécule d' H_2O_2 .

Des différences importantes existent entre les ACOXs chez l'homme et celles du rat. En effet, la diversité de substrats pris en charge par la β -oxydation peroxysomale est illustrée par l'existence de trois gènes codants les acyl-CoA oxydases chez les rongeurs. Chez le rat, trois ACOXs différentes sont présentes : l'ACOX1 (ou palmitoyl-CoA oxydase), l'ACOX2 (ou trihydroxycholestanoïl-CoA oxydase) et l'ACOX3 (ou pristanoyl-CoA oxydase). L'ACOX1 comme l'ACOX3 peroxysomale se trouve essentiellement dans les tissus intra- et extra-hépatiques. Parmi les 3 ACOXs, seule l'ACOX1 est inductible par les proliférateurs de peroxysomes. Cette enzyme catalyse l'oxydation des esters-CoA linéaires à moyenne et à longue chaîne, des acides dicarboxyliques (DCAs), des prostaglandines et des xénobiotiques à chaîne aliphatique mais montre une faible activité vis-à-vis des substrats à courte chaîne (Figure 8) (Osumi et al., 1980; Vamecq et Draye, 1989). L'ACOX2 réagit principalement avec les esters-CoA des intermédiaires des acides biliaires : le DHCA (acide dihydroxycholestanoïque) et le THCA (acide trihydroxycholestanoïque) (Casteels et al., 1990; Van Veldhoven et al., 1992). Contrairement à l'ACOX1 et 2, l'ACOX3 est uniquement hépatique et spécifique des AG ramifiés (i.e. pristanoyl-CoA) mais peut prendre en charge

aussi les acyl-CoA linéaires à longue et très longue chaîne (Figure 8) (Van Veldhoven et al., 1992; Wanders et Tager, 1998).

Chez l'homme, le peroxysome contient uniquement 2 acyl-CoA oxydases : (i) l'ACOX1, oxydase homologue à celle du rat, possède des caractéristiques moléculaires similaires et prend en charge les mêmes substrats (Vanhove et al., 1993), (ii) l'ACOX2 ou BCOX (Branched Chain Acyl-CoA oxidase) réagit avec les AG 2-méthyl ramifiés (ex : le pristanoyl-CoA et esters-CoA du DHCA et THCA) et les AG à chaîne linéaire (esters-CoA des AGTLC et les acides dicarboxyliques) (Vanhove et al., 1993). Le clonage du l'ADNc de la BCOX a révélé que cette dernière est l'homologue de l'ACOX2 hépatique du rat (Baumgart et al., 1996b). Contrairement au rat, laBCOX humaine est présente dans tous les tissus. L'homme possède un troisième gène codant une ACOX homologue à l'ACOX3 du rat mais ce gène n'est pas fonctionnel (Van Veldhoven et Mannaerts, 1999).

B.1.1.2.2. Les protéines bifonctionnelles

Chez le rat, le gène de la L-PBE est d'environ 30 kb et renferme 7 exons et 6 introns. Chez l'homme, le gène est localisé sur le chromosome 3q26.2-3q28 (Hoefler et al., 1994) et sa structure est similaire à celle du rat. La longueur du gène codant la D-PBE de rongeurs est supérieure à 100 kb. Ce gène est constitué de 24 exons et de 23 introns (Leenders et al., 1998). En effet, les séquences des ARNm codant les deux enzymes, L-PBE et D-PBE, montrent une très faible similarité entre elles (Caira et al., 1996).

Les peroxysomes chez l'homme et les rongeurs renferment deux enzymes bifonctionnelles (PBE ou peroxisomal bifunctional enzyme) distinctes : la L-PBE spécifique de l'énantiomère L du 3-hydroxyacyl-CoA et la D-PBE spécifique de l'isomère D du 3-hydroxyacyl-CoA. Ces deux enzymes catalysent ainsi la 2^{ème} et la 3^{ème} réaction de la β -oxydation peroxysomale au cours desquelles le 2-trans-énoyl-CoA est transformé en 3-hydroxyacyl-CoA par hydratation qui sera par la suite converti en 3-cétoacyl-CoA par déshydrogénation en présence de NAD⁺.

La L-PBE est une protéine monomérique de 79 kDa qui renferme les activités énoyl-CoA hydratase et Δ^3 , Δ^2 -énoyl-CoA isomérase dans sa partie N-terminale et une activité L-3-hydroxyacyl-CoA déshydrogénase dans sa partie C-terminale (Caira et al., 1996). La D-PBE est un homodimère de 2 sous-unités de 77 kDa chacune mais contrairement à la L-PBE, renferme dans sa partie N-terminale l'activité la D-3-hydroxyacyl-CoA déshydrogénase et dans sa partie centrale l'activité énoyl-CoA hydratase. La partie C-terminale de la L-PBE montre une similarité avec la SCP2 (Caira et al., 1995; Moller et al., 1999; Mori et al., 1991).

La protéine de 77 kDa est clivée dans la matrice peroxysomale en un fragment de 45 kDa contenant l'énoyl-CoA hydratase et en un fragment de 35 kDa contenant la D-3-hydroxyacyl-CoA déshydrogénase (Caira et al., 1998; Dieuaide-Noubhani et al., 1997a; Dieuaide-Noubhani et al., 1996).

Quels que soient les substrats, la réaction d'hydratation des énoyl-CoA peut être catalysée par la L-PBE ou la D-PBE qui produisent respectivement le L-3-hydroxyacyl-CoA et le D-3-hydroxyacyl-CoA. La réaction de déshydrogénation, quant à elle, est stéréosélective, la L-PBE ne prenant en charge que le L-3-hydroxyacyl-CoA et la D-PBE le D-3-hydroxyacyl-CoA (Caira et al., 1996; Dieuaide-Noubhani et al., 1996; Qin et al., 1997b). Bien que les 2 enzymes prennent en charge les énoyl-CoAs à chaîne linéaire, la D-PBE est spécifique des esters énoyl-CoA de l'acide pristanique, des THCA et des DHCA (Figure 8) (Caira et al., 1998; Dieuaide-Noubhani et al., 1997a; Dieuaide-Noubhani et al., 1996; Dieuaide-Noubhani et al., 1997b; Jiang et al., 1996; Jiang et al., 1997; Qin et al., 1997a; Qin et al., 1997b). Bien que le rôle physiologique de la L-PBE reste à élucider, des études récentes montreraient un rôle dans l'oxydation des acides dicarboxyliques (Ferdinandusse et al., 2004).

La L-PBE et la D-PBE possèdent toutes les deux un signal PTS1 dans la partie C-terminale (Caira et al., 1996; Leenders et al., 1998) et la L-PBE est la seule des deux qui est inductible par les proliférateurs de peroxysomes.

B.1.1.2.3. Les thiolases

La première thiolase peroxysomale a été identifiée et caractérisée par Hashimoto et ses collaborateurs (Miyazawa et al., 1981; Miyazawa et al., 1980). Les thiolases sont les enzymes catalysant la dernière étape de la β -oxydation peroxysomale qui consiste en un clivage thiolitique entre le carbone α et β du 3-cétoacyl-CoA libérant un acyl-CoA écourté de 2 atomes de carbone et un acétyl-CoA ou un propionyl-CoA (dans le cas d'un acide gras ramifié).

Chez l'homme, il existe 2 thiolases dans le peroxysome :

- 1) La thiolase pTH1 de la voie de β -oxydation classique est inductible par les PPs. Cette enzyme, codée par le gène *ACAA1* localisé sur le chromosome 3p23-p22, est un homodimère de 89 kDa. Elle est synthétisée comme précurseur de 44 kDa avant d'être clivée dans la matrice peroxysomale pour donner une forme mature de 41 kDa (Hashimoto, 1996). La pTH1 est spécifique des 3-cétoacyl-CoA à chaîne linéaire (Figure 8).

- 2) La SCPx (ou pTH2) de la voie des acides gras ramifiés n'est pas inducible par les PPs. Cette protéine de 58 kDa, codée par le gène *SCP2* (environ 80 kb) situé sur le chromosome 1 en position p32, renferme une activité 3-cétoacyl-CoA dans le domaine N-terminale et une fonction SCP2 (Sterol Carrier protein) dans le domaine C-terminale (Busquets et al., 1998).

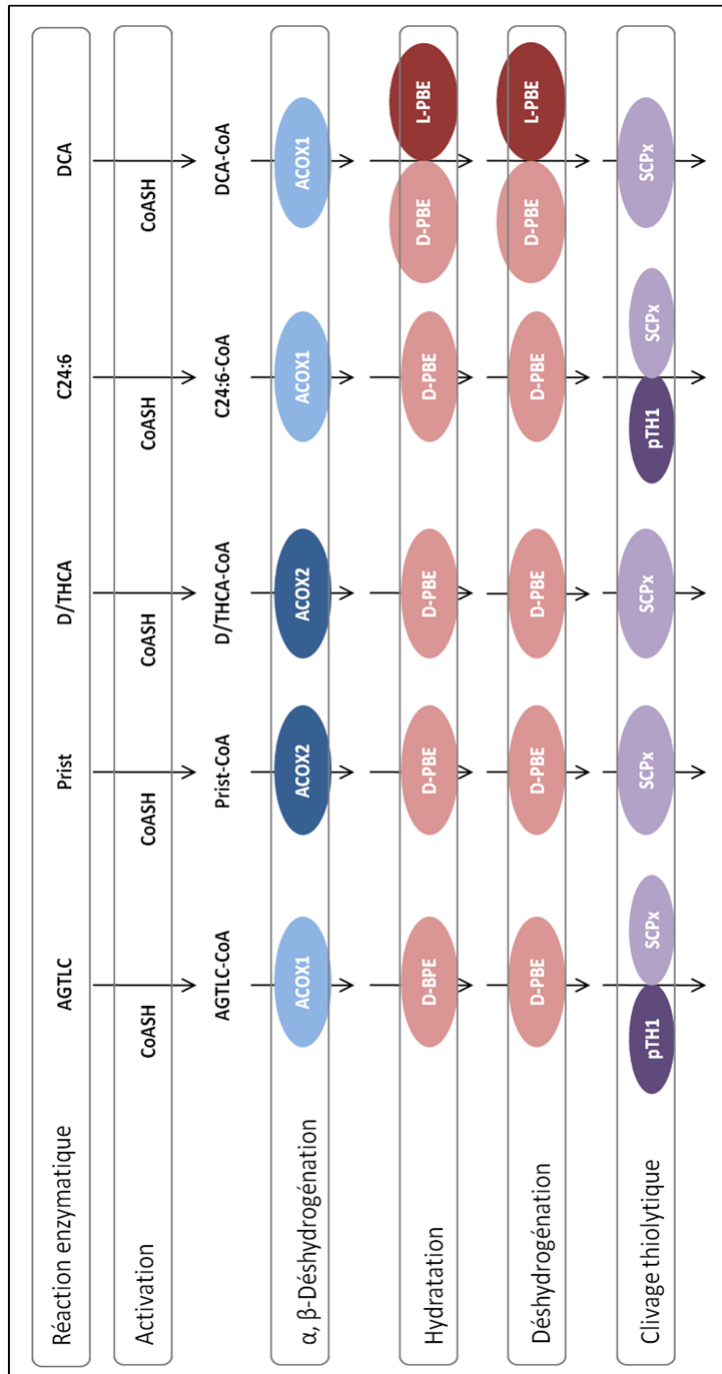


Figure 8. Représentation générale des différentes enzymes de la voie de β -oxydation peroxysomale. Cette voie est impliquée dans la dégradation des acides gras à très longue chaîne (AGTLC), de l'acide pristanique (Prist), des acides di- et tri-hydroxycoprostaniques (D/THCA), de l'acide tétracosahexaénoïque (C24:6) et les acides dicarboxyliques à longue chaîne (DCA). Schéma adapté de (Wanders et Waterham, 2006a).

La SCPx est comme la pTH1 spécifique des 3-cétoacyl-CoA à chaînes linéaires mais aussi des 3-cétoacyl-CoA des AG 2-méthyle branchés comme l'acide pristanique et les intermédiaires des acides biliaires DHCA et THCA (Figure 8) (Wanders et Waterham, 2006a).

Contrairement à l'homme, les rongeurs possèdent 3 enzymes thiolases : la thiolase A, la thiolase B et la SCPx. Chez le rat, 2 gènes A et B codent pour la thiolase A et B respectivement. Le gène A est faiblement exprimé de manière constitutive alors que le gène B est fortement inductible par les PPs (Caira et al., 1998; Cherkaoui Malki et al., 1990a). Les thiolases A et B, toutes les 2 spécifiques des 3-cétoacyl-CoA à chaîne linéaire, possèdent des propriétés biochimiques similaires mais montrent quelques différences au niveau de la partie N-terminale de la séquence d'acides aminés. Les thiolases A et B et la pTH1 humaine possèdent un signal PTS2 clivable en N-terminale. Les 2 gènes A et B montrent une forte similarité de séquence avec le gène codant la pTH1 chez l'homme (Hashimoto, 2000).

La SCPx du rat, l'orthologue de la SCPx humaine, possède la même spécificité de substrat et est adressée au peroxyosome par un signal PTS2 (Antononkov et al., 1999).

B.1.1.2.4. Les Enzymes auxiliaires

Les AG saturés non ramifiés et les 2-méthyle ramifiés avec le groupement méthyle en configuration 2-S sont les seuls AG qui peuvent entrer dans le cycle de β -oxydation directement. Cependant, les autres AG comme les AG mono- et polyinsaturés, les AG 2(R)- ou 3(R)-méthyle ramifiés et les AG 2-hydroxylés ont besoin d'être reconfigurés avant de devenir des substrats de la β -oxydation peroxyosomale.

La dégradation des AG 2(R)-méthyle ramifiés nécessite l'intervention de la 2-méthylacyl-CoA racémase qui peut convertir l'acide gras de la configuration 2R en 2S permettant ainsi sa prise en charge par l'acyl-CoA oxydase 2. Le gène qui code l'enzyme 2-méthylacyl-CoA racémase est l'*AMACR* et la protéine renferme dans sa séquence 2 signaux d'adressage, l'un mitochondrial et l'autre peroxyosomal expliquant sa présence essentiellement dans les 2 organites pour l'oxydation de l'acide pristanique (Wanders et Waterham, 2006a).

Les acides gras mono- et polyinsaturés avec les doubles liaisons en position paire requièrent les activités de 2 enzymes auxiliaires : (i) la Δ^3, Δ^2 -énoyl-CoA isomérase (une des activités de la L-PBE) qui catalyse de manière réversible le transfert de la double liaison de la position 3-*trans/cis* vers la position 2-*trans* (ii) la 2,4-diénoyl-CoA réductase qui convertit le 2-*trans*, 4-*cis/trans*-diénoyl-CoA en 3-*trans*-énoyl-CoA de manière NADPH-dépendante. Ces

2 activités enzymatiques existent également dans la mitochondrie où elles ont les mêmes activités mais sont codées par des gènes distincts (Poirier et al., 2006; Wanders et Tager, 1998).

La β -oxydation des acides gras mono- et polyinsaturés, avec les doubles liaisons en position impaire, emprunte 2 voies. La première implique la Δ^3, Δ^2 -enoyl-CoA isomérase et la deuxième nécessite la participation de 3 enzymes auxiliaires (i) la $\Delta^{3,5}, \Delta^{2,4}$ -diénoyl-CoA isomérase, une enzyme à double localisation mitochondriale et peroxysomale, codée par le même gène et avec 2 signaux d'adressage spécifiques de chaque organite et, (ii) la Δ^3, Δ^2 -énoyl-CoA isomérase et (iii) 2,4-diénoyl-CoA réductase (Wanders et Tager, 1998).

Le Coenzyme A est un cofacteur essentiel pour la β -oxydation des acides gras et pour la réaction de la 3-cétoacyl-CoA thiolase, dernière étape de β -oxydation peroxysomale. Sa disponibilité dans le peroxysome pourrait être limitante. Cependant, le rapport CoA estérifié sur CoASH peut varier selon les conditions physiologiques telles que l'état nourri, le jeûne et la variation des niveaux d'AG. Les thioestérases ou acyl-CoA thioestérases/hydrolases (ACOTs) sont des enzymes faisant partie du système d'enzymes auxiliaires du peroxysome qui catalysent l'hydrolyse des acyl-CoA en acides gras libre et en CoASH, suggérant ainsi leurs rôles dans la régulation du niveau de CoASH dans le peroxysome. Chez les mammifères, la famille des ACOTs possède au moins 12 membres (ACOT1-ACOT12) présents dans presque tous les compartiments cellulaires tels que le cytosol, la mitochondrie, le peroxysome et le réticulum endoplasmique. Chez l'homme, 3 ACOTs ont été identifiées, ACOT4, ACOT8 et ACOT12. L'activité combinée de ces 3 ACOTs permet l'hydrolyse des acyl-CoAs à chaîne courte, longue et 2-méthyl ramifiés ainsi que les dicarboxylyl-CoAs et les intermédiaires des acides biliaires (Hunt et Alexson, 2008).

B.1.2. La β -oxydation peroxysomale des acides dicarboxyliques

Les acides dicarboxyliques sont les produits de la voie d' ω -oxydation des acides monocarboxyliques qui a lieu dans le RE et dans le cytosol. Cette voie convertit ces acides gras dans le RE grâce au cytochrome P450 en acides ω -monohydroxycarboxyliques qui seront par la suite oxydés en acides ω -monocétocarboxyliques puis en acide dicarboxyliques dans le cytosol respectivement grâce à l'alcool déshydrogénase puis à l'aldéhyde déshydrogénase. Une fois activés par la dicarboxylyl-CoA synthétase cytosolique, les esters dicarboxylyl-CoA peuvent rentrer dans le cycle de la β -oxydation peroxysomale (Ferdinandusse et al., 2004). Les études menées sur des fibroblastes de patients déficients en peroxysome ou en une seule enzyme peroxysomale ont montré l'implication de l'ACOX1, de la D- et la L-PBE, de la

pTH1 et la SCPx dans la β -oxydation peroxysomale des acides dicarboxyliques à longue et très longue chaîne (Ferdinandusse et al., 2004). Après β -oxydation, ces acides dicarboxyliques sont éliminés dans l'urine.

B.1.3. La β -oxydation des eicosanoïdes

Les eicosanoïdes sont des composés dérivés des acides gras insaturés dont l'acide arachidonique est le principal précurseur. Ce sont des molécules constituées de 20 atomes de carbone, avec 2 chaînes latérales leur donnant une structure en épingle à cheveux. Les eicosanoïdes comprennent : les prostaglandines, les leucotriènes, les thromboxanes, les prostacyclines, les lipoxines, les hépoxylines, les anandamides, et les cystéinyl-leucotriènes. Ces molécules sont présentes dans tous les tissus et jouent un rôle dans l'inflammation, la contraction des muscles lisses, la régulation des métabolismes et l'agrégation plaquettaire (Ferdinandusse et al., 2002). Elles sont donc considérées comme des hormones. Le peroxysome permet la dégradation des prostaglandines et des leucotriènes (Mayatepek et al., 1993).

Les leucotriènes comprennent le LTB₄ et les cystéinyl-LTs tels que LTC₄, LTD₄ et LTE₄. Ils sont synthétisés principalement par les macrophages et les mastocytes et sont impliqués dans les communications intercellulaires, la transduction des signaux et la défense du soi. Le LTB₄ fonctionne comme un agent chimiotactique pour les cellules inflammatoires alors que les cystéinyl-LTs provoquent différents effets biologiques tels que la contraction des muscles lisses et l'augmentation de la perméabilité des microvaisseaux. Etant donné leurs rôles biologiques très importants, les leucotriènes sont inactivés puis dégradés. Le LTC₄ est converti dans le sang en LTD₄ puis en LTE₄, une forme très peu active. Ensuite, le LTB₄ et LTE₄ sont transformés par la voie d' ω -oxydation respectivement en ω -carboxy-LTB₄ et en ω -carboxy-LTE₄. Enfin, ces derniers sont dégradés par la β -oxydation peroxysomale en ω -carboxy-tétrano-LTB₃ et en ω -carboxy-tétrano-LTE₃ et éliminés dans la bile ou dans l'urine. Des analyses d'urines chez des patients atteints de différentes maladies peroxysomales démontrent que la D-PBE est nécessaire pour la dégradation de ces dérivés leucotriènes (Ferdinandusse et al., 2002).

B.1.4. Le transport et l'activation des acides gras

B.1.4.1. L'Importation des acides gras dans le milieu intracellulaire

Pour que les acides gras d'origine extracellulaire soient β -oxydés, ils doivent tout d'abord franchir la membrane plasmique. Jusqu'à présent, 3 types de protéines participeraient à

l'importation des AG dans la cellule : une protéine liant les AG (FABP : Fatty Acid Binding Protein), une translocase des acides gras (FAT/CD36 : Fatty Acid Transporter) et des protéines transporteuses des AG (FATPs : Fatty Acid Transport Proteins) (Coe et al., 1999; Schaffer, 2002; Stahl et al., 2001). La FABP_{pm} (pm : « plasma membrane ») est une protéine membranaire située du coté extracellulaire qui agit comme récepteur des AG. La FAT/CD36 est une protéine transmembranaire qui joue un rôle dans la translocation des AG. Ce transporteur est absent dans le foie et n'est pas le principal transporteur dans la plupart des tissus. Il fonctionne vraisemblablement en présence de faibles concentrations en AG en concentrant ces acides gras à la surface de la cellule puis en les transférant à la FATP. Les transporteurs FATPs ont été identifiés récemment. Cette famille de protéines pourrait être également impliquée dans l'activation des AG grâce à son activité acyl-CoA synthétase (DiRusso et al., 2005; Glatz et Storch, 2001; Stahl et al., 2001). Les AG transportés vers le compartiment intracellulaire peuvent être sous forme d'AG libres ou d'AG activés. Dans le premier cas, ils seront pris en charge par la FABP_c et dans le deuxième cas, par les protéines liant les AG, les ACBP (Acyl-CoA Binding Protein)(Glatz et Storch, 2001).

B.1.4.2. Activation des acides gras

Une fois dans la cellule, les AG doivent être activés car cela assure un taux faible d'AG libres et non-estérifiés et maintient un gradient de concentration favorable pour l'entrée de nouveaux AG libres dans le cytosol. Les AG qui sont activés ne peuvent plus sortir de la cellule car l'activation diminue leur degré d'hydrophobicité (Wanders et Waterham, 2006a).

Différentes Acyl-CoA Synthétases (ACS) catalysent l'activation des AG en acyl-CoA en fonction de leur localisation cellulaire et de leur nature. L'activation d'un AG est réalisée en 2 étapes : (i) formation d'un intermédiaire acyl-AMP à partir d'un AG et d'une molécule d'ATP, (ii) puis l'échange de l'AMP contre une molécule de CoASH pour obtenir la forme active en acyl-CoA.

Les AG à longue chaîne sont activés par les acyl-CoA synthétases à longue chaîne (ACSL) qui existent sous 5 isoformes (ACSL1, 3, 4, 5 et 6) localisées du côté cytosolique de la membrane mitochondriale et microsomale. Seule l'ACSL4 est localisée au niveau de la membrane peroxysomale. Au niveau du peroxysome, les ACSL sont spécifiques des AG à longue chaîne linéaire mais également des AG à chaîne branchée comme cela a été montré pour l'ACSL4 (Watkins, 1997).

La première enzyme catalysant l'activation des AGTLC, l'acyl-CoA synthétase à très longue chaîne (VLCS-1), a été isolée à partir des peroxysomes de foie chez plusieurs espèces

dont l'homme, la souris, le rat et la levure. La famille des VLCS qui intervient aussi bien dans l'activation des AGTLC que dans leur transport (Coe et al., 1999), est apparentée à la famille des FATP et c'est pour cela qu'elle fut renommée VLCS/FATP. Les VLCS sont absentes de la mitochondrie et sont localisées dans le RE du côté cytosolique et dans le peroxyosome du côté de la matrice (Smith et al., 2000). L'acyl-CoA synthétase biliaire (BACS) est un membre de la famille VLCS/FATP. Elle est spécifique des intermédiaires des acides biliaires et elle est localisée uniquement dans le foie au niveau du RE (Mihalik et al., 2002). La dicarboxylyl-CoA synthétase active les acides dicarboxyliques au niveau du RE avant leur entrée dans le peroxyosome (Vamecq et al., 1985).

B.1.4.3. L'importation et la translocation des AG à travers la membrane peroxyosomale

Au niveau mitochondrial, les AG à courte et moyenne chaîne entrent directement par diffusion pour être dégradés. Alors que les AG à longue chaîne empruntent un système de navette pour atteindre la matrice mitochondriale : une carnitine palmitoyl transférase I (CPT-I) associée à la membrane externe mitochondriale catalyse la formation d'acyl-carnitine à partir d'acyl-CoA et de carnitine libre. L'acyl-carnitine ensuite sera transportée dans la matrice mitochondriale en échange d'une carnitine libre grâce à la carnitine-acylcarnitine translocase (CACT), une protéine intégrale de la membrane interne mitochondriale. Dans la matrice, l'acyl-carnitine sera reconverti en acyl-CoA par la carnitine palmitoyl transférase II (CPT-II) qui est associée à la partie interne de la membrane mitochondriale. L'acyl-CoA est ensuite pris en charge par le système de β -oxydation mitochondrial et la carnitine est transportée par la CACT vers le cytosol (Kerner et Hoppel, 2000).

Au niveau du peroxyosome, l'importation et la β -oxydation des AG sont indépendants de la carnitine alors que l'exportation des AG écourtés nécessite la carnitine. En effet, le mode d'importation des AG dans la matrice peroxyosomale dépend de la longueur de la chaîne. Ainsi, les AG à moyenne chaîne, sous forme activée en acyl-CoA, traversent de façon passive la membrane peroxyosomale alors que les AGLC et les AGTLC sont d'abord activés en acyl-CoA du côté cytosolique de la membrane puis transportés vers la matrice peroxyosomale via les transporteurs ABC (« ATP Binding Cassette ») grâce à l'hydrolyse d'une molécule d'ATP (Rottensteiner et Theodoulou, 2006). Chez les mammifères, ce sont trois transporteurs ABC de la sous famille D (ABCD) qui assureraient le transport des AG dans la matrice peroxyosomale : ABCD1 (ou « ALDP: Adrenoleukodystrophy Protein »), ABCD2, et ABCD3 (ou PMP70). Ce sont des protéines intégrales de la membrane peroxyosomale (Rottensteiner et Theodoulou, 2006).

B.1.4.4. Exportation des acides gras β -oxydés de la matrice peroxysomale

Chez les mammifères, les produits de la β -oxydation peroxysomale (acétyl-CoA, propionyl-CoA ou le 4, 8-diméthylnanoyl-CoA) sont transformés dans la matrice peroxysomale en esters de carnitine grâce à 2 enzymes, la carnitine acétyltransférase (CRAT) et la carnitine octanoyltransférase (CROT) (Hashimoto, 1999). Ces esters de carnitine sont supposés diffuser de manière passive au travers de la membrane peroxysomale. Un transporteur de carnitine OCTN3 (Organic cation/carnitine transporter) a été identifié dans la membrane peroxysomale (Ferdinandusse et al., 1999; Lamhonwah et al., 2005; Reddy et Hashimoto, 2001a). Or, il a été montré que le transporteur OCTN2 (apparenté à OCTN3) localisé au niveau de la membrane plasmique transporte non seulement la carnitine dans la cellule, mais est également capable de transporter les acylcarnitines à chaîne courte (Wu et al., 1999a). Cela laisse penser que l'OCTN3 pourrait assurer l'import de la carnitine dans le peroxysome, mais aussi assurer l'export des produits de la β -oxydation peroxysomale sous forme d'acétyl-carnitine et de propionyl-carnitine. Un mécanisme alternatif de transport des produits finaux de la β -oxydation peroxysomale existerait via le clivage des acyl-CoA en AG libres et coenzyme A par les ACOT (cf. [B.1.1.2.4 Les enzymes auxiliaires, p52](#)).

B.2. Synthèse des acides gras polyinsaturés (AGPI)

Parmi les AGPI on trouve entre autres la famille des omégas 3 et la famille des omégas 6. Les omégas 3 sont impliqués dans divers processus physiologiques tels que les fonctions cognitives et visuelles, et dans le développement neuronal. Ce sont des composants essentiels des phospholipides membranaires et ils constituent des substrats pour la synthèse des eicosanoïdes.

L'acide docosahexaénoïque (DHA, C22:6 n-3) est le plus important AGPI de la famille des omégas 3 et il est très abondant dans les phospholipides du cerveau et de la rétine chez l'homme et les mammifères. Le précurseur direct du DHA est l'acide tétracosahéxaénoïque (C24:6n-3) qui provient lui-même de l'acide linoléinique (C18:3n-3). Cet AG essentiel, apporté uniquement par l'alimentation, subit une série de désaturations et d'élongations au niveau du RE pour donner le C24:6n-3 comme produit final. Le C24:6n-3 est alors transporté vers le peroxysome et sera écourté de 2 atomes de carbone par β -oxydation peroxysomale pour donner le DHA (Ferdinandusse et al., 2001; Moore et al., 1995). Les principales enzymes qui participent à la β -oxydation du C24:6n-3 et par la suite à la biosynthèse du DHA sont l'ACOX1, la D-PBE et les 2 thiolases, pTH1 et SCPx (Ferdinandusse et al., 2001) (Figure 9).

Les omégas 6 comme les omégas 3, d'une très grande importance pour l'organisme, sont apportés principalement par l'alimentation et servent de précurseurs essentiellement pour la synthèse de l'acide arachidonique (C20:4n-6). L'acide docosapentaénoïque (DPA, C22:5n-6) est le principal AGPI de la famille des omégas 6 est synthétisé à partir du précurseur acide linoléique (C18:2n-6) de manière similaire à la synthèse du DHA à travers une série de désaturations et d'élongations. L'étape finale de la synthèse du DPA, comme le DHA, se fait dans le peroxyosome après un cycle de β -oxydation (Sprecher, 2000).

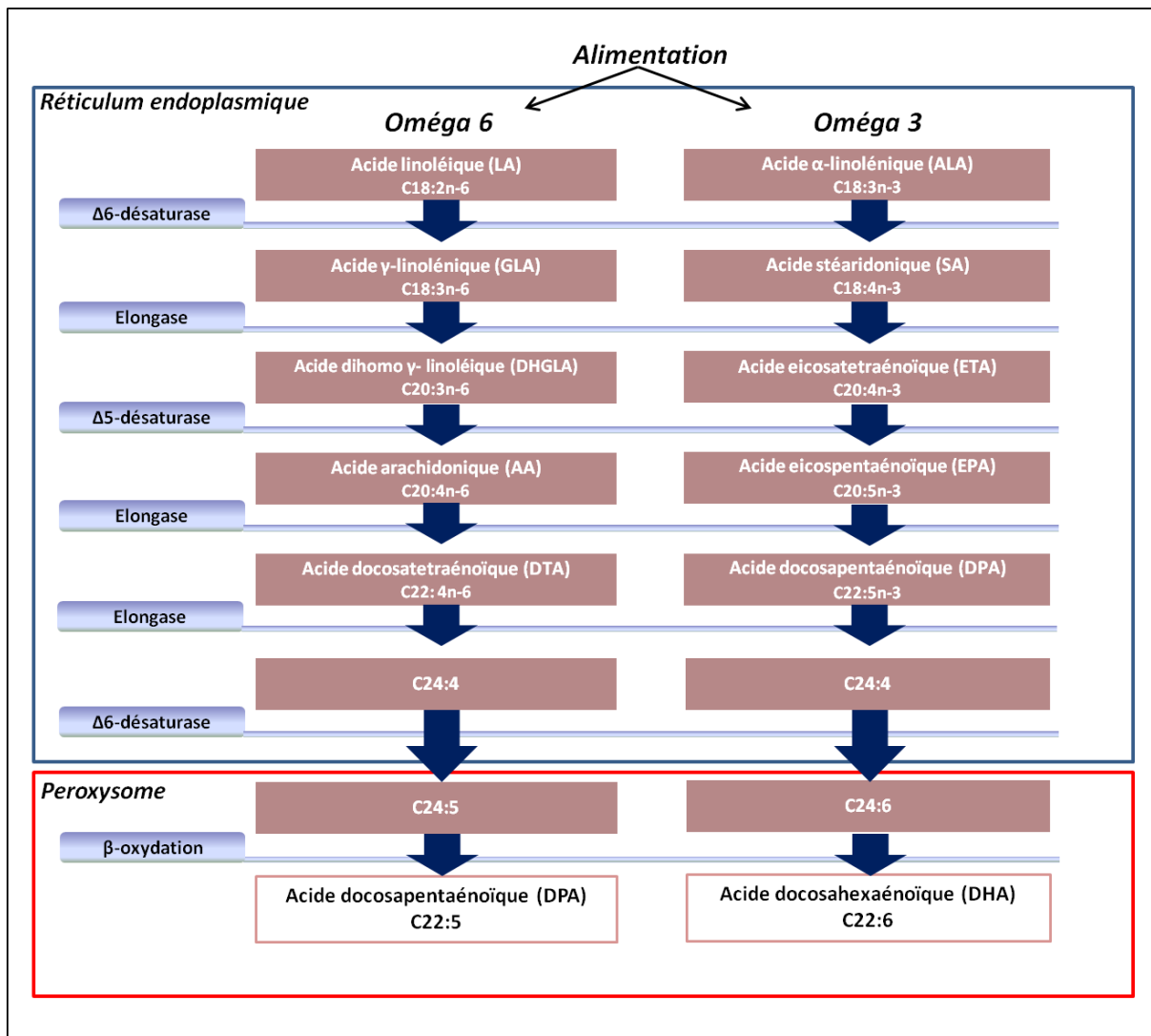


Figure 9. Schéma récapitulatif de la synthèse l'acide docosahexaénoïque (DHA, C22:6) et de l'acide docosapentaénoïque (DPA, C22:5). (Adapté des sites <http://www.cocnet.org> et <http://www.asl-lipides.com>).

B.3. Synthèse des acides biliaires

Le cholestérol en excès est éliminé par conversion en acides biliaires au niveau du foie. Cette conversion a lieu selon deux voies : une voie classique présente dans le réticulum endoplasmique et une voie alternative qui se déroule dans la mitochondrie. Ces deux voies se partagent les mêmes enzymes, excepté celles qui sont responsables de l'hydroxylation du noyau stéroïde à la position C-7. Cette étape est réalisée par la 7α -cholestérol hydroxylase (CYP7A1) pour la voie classique et par la 7α -oxystérol hydroxylase (CYP7B1). Approximativement 500 mg de cholestérol sont convertis en acides biliaires par jour dans le foie humain adulte et la voie classique contribue à la synthèse d'environ 90% d'acides biliaires chez l'homme et 70% chez la souris (Ferdinandusse et Houten, 2006). La biosynthèse des acides biliaires consiste en une modification du noyau stéroïde du cholestérol, son oxydation puis le clivage des chaînes latérales du stérol et finalement sa conjugaison avec un acide aminé, soit la taurine soit la glycine. L'oxydation des chaînes latérales du stérol a lieu dans la mitochondrie et aboutit à la formation des intermédiaires des acides biliaires, l'acide 3α , 7α dihydroxycholéstanoïque (DHCA) précurseur de l'acide chénodéoxycholique (CDCA) et de l'acide cholique (CA) et le 3α , 7α , 12α trihydroxycholestanoïque (THCA) précurseur de l'acide cholique (Ferdinandusse et al., 2009).

Il est à noter que les intermédiaires des acides biliaires sont activés en acyl-CoA biliaire avant leur transport dans le peroxyosome par la BACS et l'acyl-CoA synthétase à très longue chaîne au niveau du RE (cf. B.1.4.2 Activation des acides gras).

Le CDCA et le CA sont formés à partir des DHCA et THCA par un cycle de β -oxydation peroxyosomale de leur chaîne latérale (Figure 10). Au début, le groupe méthyle du carbone 25 de configuration *R* est transformé en configuration *S* pour qu'il soit pris en charge par la BCOX qui forme le 24-énoyl-CoA du DHCA ou THCA. Cette étape est suivie par une hydratation et une hydrogénation par la D-PBE qui forme l'ester 24-céto-CoA (Caira et al., 1996; Caira et al., 1998). Finalement, la SCPx effectue le clivage pour donner le CA-CoA/CDC-CoA et le propionyl-CoA. L'étape finale de la synthèse des acides biliaires *de novo* est leur conjugaison à la glycine ou à la taurine par la bile acyl-CoA : aminoacid N-acyltransférase (BAAT) qui converti l'acyl-CoA biliaire en acide biliaire tauro- ou glyco-conjugué et libère le CoA. Après leurs synthèses, les acides biliaires sont transportés à l'extérieur du peroxyosome par un mécanisme inconnu jusqu'à présent, puis à l'extérieur de l'hépatocyte vers la vésicule biliaire (Ferdinandusse et al., 2009).

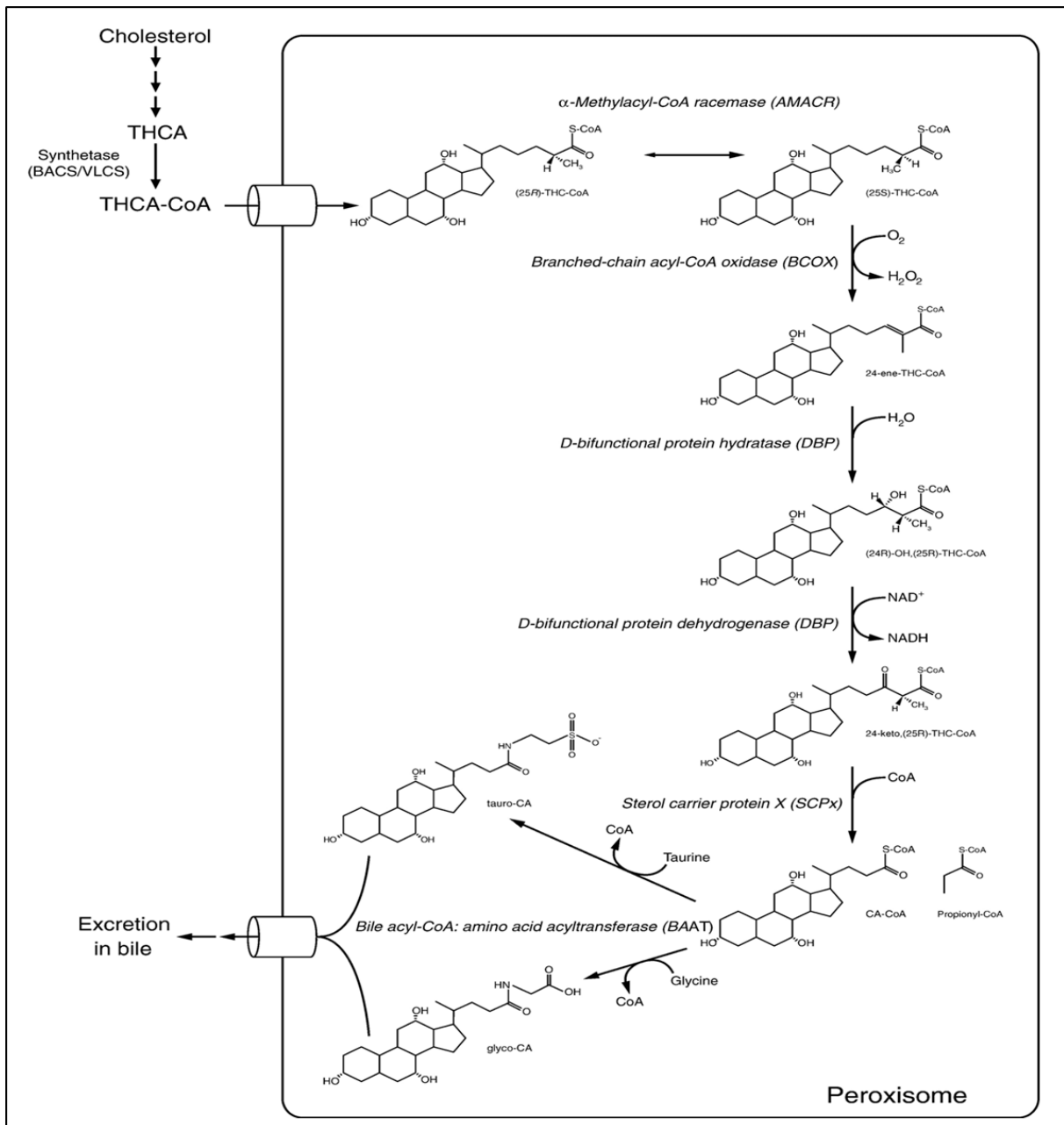


Figure 10. Représentation schématique des étapes de synthèse peroxysomale des acides biliaires. D'après (Ferdinandusse et Houten, 2006).

B.4. Synthèse des éthers de phospholipides

Les éthers de phospholipides constituent une classe distincte de phospholipides caractérisée par la présence d'une liaison éther en position *sn-1* (*numérotation stéréospécifique en 1*) du squelette glycérol. Deux types de liaisons éthers en *sn-1* existent dans les éthers de phospholipides : une liaison éther présente dans les facteurs d'activation des plaquettes (PAF) et une liaison vinyle-éther caractéristique des plasmalogènes. Généralement, la position *sn-1* des plasmalogènes est liée soit à l'acide palmitique (C16:0), soit à l'acide stéarique (C18:0), soit à l'acide oléique (C18:1), alors que la position *sn-2* est estérifiée par un AGPI. La tête polaire des plasmalogènes en position *sn-3* est généralement estérifiée par une éthanamine ou par une choline. Le taux de plasmalogène est très variable selon les tissus et parfois selon les types cellulaires au niveau du tissu. Par exemple, la myéline est la plus riche en plasmalogène éthanamine, le cœur est le tissu le plus riche en plasmalogène choline (taux modéré dans les reins, la rate, les cellules sanguines et le muscle squelettique) alors que le foie est pauvre en plasmalogène. Bien que le(s) rôle(s) physiologique(s) des plasmalogènes ne soit pas complètement élucidé, il semblerait que les plasmalogènes agissent comme des antioxydants (via la liaison vinyle éther), ou en modifiant les propriétés et la fluidité des membranes. Ils pourraient servir également de stockage des AGPI (Brites et al., 2004).

Durant ces dernières années l'implication des plasmalogènes dans de nombreuses pathologies liées aux peroxysomes a augmenté l'intérêt pour ces composés.

La première étape de la biosynthèse des plasmalogènes consiste en une estérification en *sn-1* de la dihydroxyacétone phosphate (DHAP) par un ester CoA à longue chaîne catalysée par la dihydroxyacétone phosphate acyltransférase (DHAP-AT) donnant le 1-acyl-DHAP (Figure 11). Ensuite, l'acide gras en *sn-1* du 1-acyl-DHAP est remplacé par un alcool gras à longue chaîne grâce à l'alkyl-dihydroxyacétone phosphate synthase (ADHAP-S) pour former le 1-alkyl-DHAP. La fonction cétone du 1-alkyl-DHAP en *sn-2* est réduite pour donner le 1-alkyl-*sn*-glycéro-3-phosphate. Cette réaction, qui peut avoir lieu au niveau peroxysomal ou microsomal, est catalysée par l'acyl/alkyl-dihydroxyacétone phosphate réductase (AADHAP-R). Le 1-alkyle-*sn*-glycéro-3-phosphate est ensuite exporté vers le RE et les réactions finales de synthèse des plasmalogènes ont lieu dans le cytosol (Wanders et Waterham, 2006a).

La DHAP-AT et la DHAP-S sont deux enzymes intraperoxisomales avec respectivement des signaux d'adressages PTS1 ou PTS2 alors que l'AADHAP-R a une double distribution,

peroxygomale et microsomale. L'AADHAP-R est située sur la face cytosolique de la membrane peroxygomale (Wanders et Waterham, 2006a).

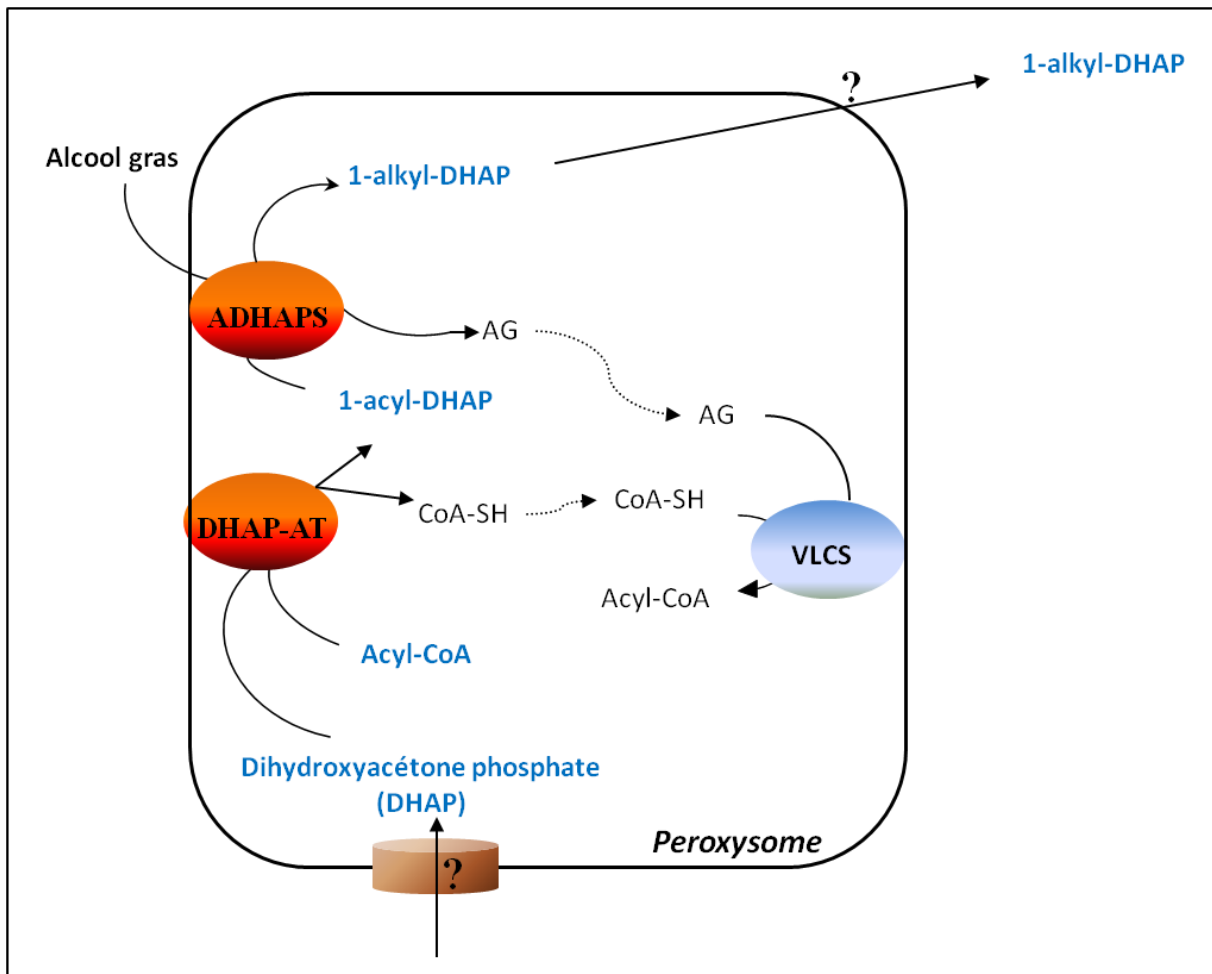


Figure 11. Représentation schématique des différentes étapes de la voie de synthèse des plasmalogènes dans le peroxygome. D'après (Brites et al., 2004).

B.5. L' α -oxydation

Chez l'homme, la voie de l' α -oxydation a lieu exclusivement dans le peroxyosome. Elle permet d'écourter la chaîne des acides gras de 1 atome de carbone. Cette voie permet la dégradation des acides gras 3-méthylés à chaîne ramifiée comme l'acide phytanique (l'acide 3, 7, 11,15-tétraméthylhexadécanoïque), un acide gras d'origine végétal issu de la dégradation du phytol et apporté uniquement par l'alimentation.

L' α -oxydation des acides phytaniques est une voie peroxyosomale qui commence par la formation du phytanoyl-CoA, suivi par une hydroxylation aboutissant à la formation du 2-hydroxyphytanoyl-CoA (Figure 12). Cette étape est catalysée par la phytanoyl-CoA 2-hydroxylase. Par la suite, le 2-hydroxyphytanoyl-CoA est clivé par l'enzyme 2-hydroxyacyl-CoA lyase en pristanal et en formyl-CoA. Ce dernier est ensuite hydrolysé en acide formique et en coenzyme A (CoASH) (Wanders et al., 2011). Le pristanal est oxydé en acide pristanique (l'acide 2, 6, 10,14-tétraméthylpentadécanoïque) et cette étape est catalysée par l'aldéhyde déshydrogénase peroxyosomale. Après activation de l'acide pristanique en pristanoyl-CoA, ce dernier peut enfin rentrer dans le cycle de β -oxydation peroxyosomale et le produit final, le 4,8-diméthylnanoyl-CoA, est transporté vers la mitochondrie pour une oxydation complète (Smith et al., 2000; Wanders et Komen, 2007).

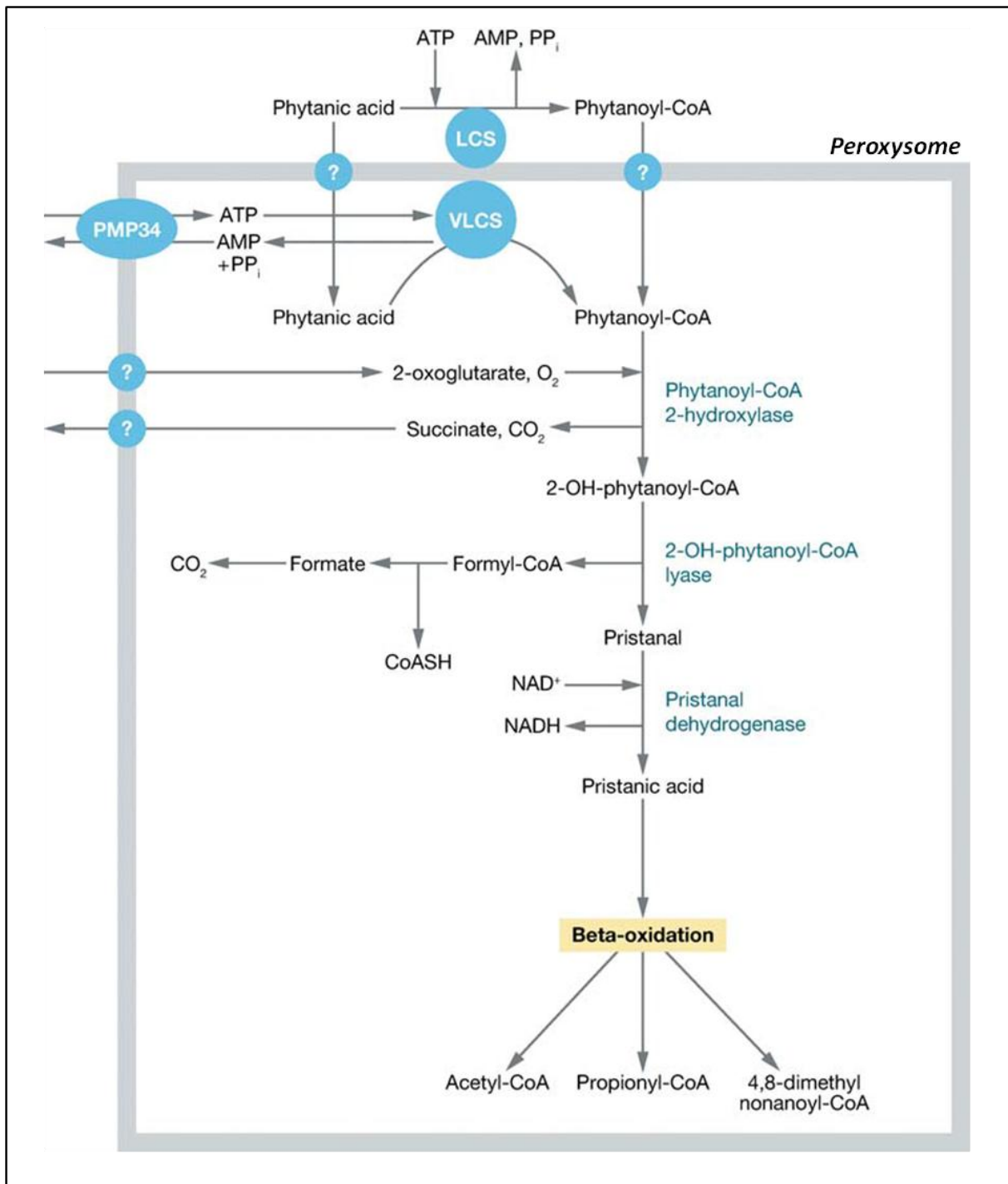


Figure 12. Schéma de la voie de l' α -oxydation peroxysomale de l'acide phytanique chez les mammifères.

D'après (Wanders and Waterham, 2006).

C. Autres fonctions du peroxysome

C.1. Métabolisme du glyoxylate

Chez l'homme, le peroxysome joue un rôle crucial dans le mécanisme de détoxification du glyoxylate. L'aminoglyoxylate aminotransférase, présente exclusivement dans les peroxysomes au niveau du foie, convertit le glyoxylate en glycine tout en utilisant l'alanine comme précurseur. Par son activité, cette enzyme empêche la formation de l'oxalate, produit toxique, à partir du glyoxylate par différentes hydrogénases et oxydases comme par exemple l'enzyme lactate déshydrogénase (Baumgart et al., 1996a).

C.2. Métabolisme des acides aminés

Chez les mammifères, le peroxysome contient d'une part une D-aminoacide oxydase qui oxyde les isomères D des acides aminés neutres et basiques et une D-aspartate oxydase qui oxyde les isomères D des acides aminés acides (Van Veldhoven et al., 1991) et, d'autre part, une glutaryl-CoA oxydase, une enzyme à la fois peroxysomale et mitochondriale qui convertit la lysine, l'hydroxylysine et le tryptophane en glutaryl-CoA (Van Veldhoven et al., 1992).

C.3. Dégradation des espèces réactives de l'oxygène (ERO)

Les peroxysomes ont été tout d'abord caractérisés par la production et la dégradation du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2). Ce produit, toxique pour la cellule, est généré dans la matrice peroxysomale par les différentes oxydases comme les ACOX par exemple. Le peroxysome possède plusieurs enzymes qui décomposent l' H_2O_2 comme la catalase soit directement grâce à leur activité catalasique, soit en utilisant des molécules tels que le méthanol, l'éthanol, le formaldéhyde, le formate ou les nitrites comme co-substrats par son activité peroxydasique. La glutathion peroxydase et la peroxyrédoxine (PMP20) permettent également la dégradation de l' H_2O_2 (Singh et al., 1994; Yamashita et al., 1999).

La présence de la xanthine oxydoréductase, qui intervient dans le catabolisme des purines, au niveau de la matrice peroxysomale, génère des anions superoxydes ($O_2\bullet$). Ces composés sont dégradés par la famille des superoxydes dismutases (Cu/Zn-SOD et Mn-SOD). De plus, il existe dans le peroxysome une NO synthase inductible (iNOS) (Stolz et al., 2002), enzyme produisant du monoxyde d'azote ($NO\bullet$) à partir de la L-arginine, qui en se combinant avec les radicaux O_2^- , conduit à la formation du peroxynitrite $ONOO^-$, un oxydant puissant. Ce dernier est décomposé par la peroxyrédoxine V qui possède une activité peroxynitrite réductase (Dubuisson et al., 2004).

De plus, les peroxysomes contiennent aussi l'époxyde hydrolase, une enzyme qui décompose les époxydes, ces derniers constituant la forme active de produits carcinogènes et mutagènes (Waechter et al., 1983).

L'équilibre entre la production de composés toxiques par les oxydases et leur élimination par les différentes enzymes décrites ci-dessus empêche le développement d'un état de stress oxydatif qui pourrait conduire à la désorganisation des structures membranaires, à l'attaque de l'ADN ainsi qu'à l'oxydation des protéines et des lipides dans les cellules.

D. L'acyl-CoA oxydase 1 (ACOX1)

L'ACOX1 est l'enzyme qui catalyse la première étape de la voie classique de la β -oxydation peroxysomale. L'étude du rôle physiologique de l'ACOX1 humaine est essentielle. En effet, l'importance du rôle de l'ACOX1 est soulignée par l'identification d'une maladie peroxysomale sévère, la pseudo-adrénoleucodystrophie néonatale (P-NALD, OMIM 609751), liée à une déficience de cette enzyme.

D.1. La nomenclature

Les acyl-CoA oxydases ont été nommées différemment selon les espèces. Chez la levure *Yarrowia lipolytica*, 5 acyl-CoA oxydases nommées Aox1 à Aox5, sont codées par 5 gènes POX1 à POX5 respectivement alors que *Saccharomyces cerevisiae* possède une seule Pox1/Fox1p (Wang et al., 1999). Chez les plantes, *Arabidopsis thaliana* est l'espèce végétale la plus étudiée pour les acyl-CoA oxydases et contient 6 gènes dont seulement 4 acyl-CoA oxydases ont été caractérisées biochimiquement : ACX1, ACX2, ACX3 et ACX4 (Poirier et al., 2006). Chez les rongeurs, rat et souris, l'ACOX1 correspond à la palmitoyl-CoA oxydase, l'ACOX2 à la choléstanoyl-CoA oxydase et l'ACOX3 à la pristanoyl-CoA oxydase. De plus les 2 isoformes issues de l'épissage alternatif de l'exon 3a et 3b du gène de l'ACOX sont désignées ACO-I et ACO-II (Setoyama et al., 1995). Chez l'homme, les acyl-CoA oxydases sont nommées ACOX1 et ACOX2 avec l'ACOX1 qui est présente en 2 isoformes ACOX1a et ACOX1b résultant d'un épissage alternatif des exons 3a et 3b à partir du même gène (Oaxaca-Castillo et al., 2007).

D.2. Le gène

Chez l'homme, le gène de l'ACOX1 a été localisé par hybridation *in situ* au niveau du chromosome 17 sur le bras court au locus 25 (Varanasi et al., 1994). Le gène, présent sous forme d'une copie par génome haploïde, s'étend sur 33 Kb et contient 15 exons dont 2 exons 3 (3a et 3b) et 14 introns (Figure 13). Cette structure du gène ACOX1 est conservée chez le rat

(Varanasi et al., 1994). Au niveau du gène, toutes les jonctions exons/introns sont conformes aux règles GT/AT. Le promoteur du gène de l'ACOX1 est riche en bases G+C (65%) composée de boîtes hexanucléotidiques GGGCGG ou CCCGCC présentes en 3 copies. Des séquences ressemblant aux boîtes TATA riche en A+T ont été identifiées également au niveau du promoteur mais des motifs CCAAT typiques sont absents aussi bien chez l'homme que chez le rat (Osumi et al., 1987; Varanasi et al., 1994). Le promoteur du gène de l'ACOX1 humain renferme un élément de réponse pour les proliférateurs de peroxyosome (PPRE) qui se trouve entre les positions -1918 et -1906 en amont du site d'initiation de la transcription. C'est une répétition directe (DR1) de la demi-séquence consensus AGGTCA séparée par un nucléotide. Cet élément de réponse fixe PPAR α /RXR α ce qui aboutit à une induction de la transcription du gène de l'ACOX1(Varanasi et al., 1996).

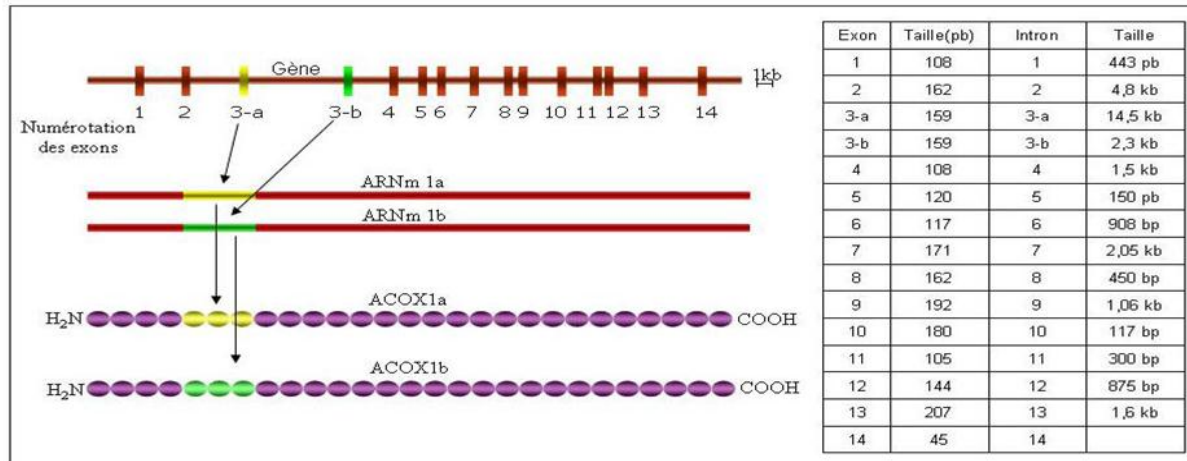


Figure 13. Schéma représentant le gène de l'ACOX1 humaine. Il est composé de 15 exons, dont deux exons 3. A partir d'un pré-ARNm, deux ARNm matures sont produits, chacun comportant soit l'exon 3a soit l'exon 3b (ARNm 1a et 1b). Deux protéines de 660 acides aminés, appelées ACOX1a et ACOX1b sont traduites à partir de ces deux ARNm. Le tableau résume les tailles des exons et des introns.

D.3. L'ARNm

Deux séquences nucléotidiques différentes d'ARNm ont été détectées aussi bien chez l'homme que chez le rat, l'ARNm 1a et l'ARNm 1b, issues du même gène de l'ACOX1 (Figure 14). Ces 2 transcrits sont le résultat d'un épissage alternatif de l'exon 3a et 3b et montrent une très forte similarité (52%) en particulier au niveau de l'extrémité 3' de leur séquence chez l'homme (Figure 13, p69). Les exons 3a et 3b sont formés par duplication de la séquence exonique. L'ARNm 1a et l'ARNm 1b renferment le même nombre de nucléotides 3741, dont 1983 nucléotides codant pour un polypeptide de 661 acides aminés chez le rat (Miyazawa et al., 1987) et 1980 nucléotides codant pour 660 acides aminés chez l'homme (Chu et al., 1995; Varanasi et al., 1994). Au niveau de l'ARNm, le site d'initiation de la traduction ATG est situé en position 291 et le codon stop TGA en position 2273 de l'ARNm (Varanasi et al., 1994).

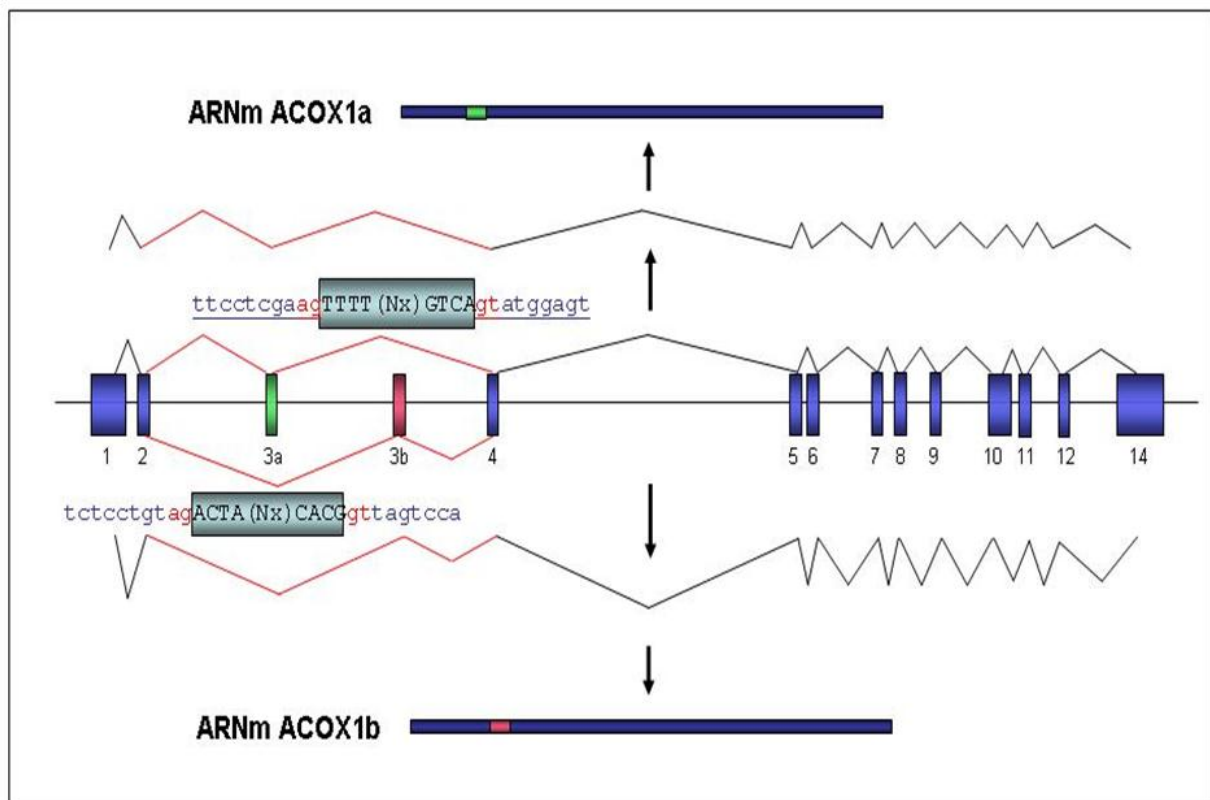


Figure 14. Représentation schématisée du mécanisme de l'épissage alternatif du gène de l'ACOX1. Les exons 3a et 3b sont impliqués dans le mécanisme d'épissage avec une autre partie de la séquence du gène. Un des ARN matures garderait la partie correspondant à l'exon 3a tandis que l'autre la partie correspondant à l'exon 3b donnant naissance à deux protéines de la même taille mais qui diffèrent au niveau de l'exon 3. Schéma obtenu à partir du site <http://www.bioinformatics.ucla.edu/ASAP/>

D.4. Acyl-CoA oxydase 1 : Isoformes, activité et substrats

L'acyl-CoA oxydase 1 humaine est un dimère de 140 kDa qui est composé de 2 sous-unités de 72 kDa (polypeptide A) chacune. Elle est importée dans le peroxyosome grâce à un signal d'adressage Sér-Lys-Leu (PTS1) localisé dans sa partie C-terminale. Après sa translocation dans le peroxyosome, 80% de l'ACOX1 est clivée entre la valine 468 et l'alanine 469 par une protéase spécifique dans la matrice pour donner naissance à 2 fragments : un fragment de 52 kDa (polypeptide B) et un fragment de 21 kDa (polypeptide C). L'enzyme active, de ce fait, est un dimère qui existe sous 3 formes : A₂, ABC et B₂C₂ (Chu et al., 1995; Reddy et Hashimoto, 2001a).

Les deux isoformes de la protéine ACOX1, ACOX1a et ACOX1b issues de l'épissage alternatif de l'exon 3 du gène de l'ACOX1, présentent une similarité très importante au niveau de leur séquence peptidique. Elles diffèrent uniquement par les 54 acides aminés codés par les exons 3a et 3b et qui sont situés dans la partie N-terminale de leur séquence. Ainsi, plusieurs combinaisons dimériques entre les polypeptides actifs A, B et C peuvent exister théoriquement (A₂^a; A₂^b; A^aA^b; A^a/B^aC; A^a/B^b/Cb; B₂^aC₂ etc...) (A ou B ou C pour polypeptide A, B et C respectivement; a ou b pour exon 3a ou 3b respectivement) (Hashimoto, 1996).

Les séquences polypeptidiques de l'ACOX 1a et 1b correspondant à la région de 54 acides aminés entre les 2 isoformes, montrent une similarité de séquence de 52% avec une forte identité au niveau de sa partie C-terminale. En effet, la différence entre les séquences d'acides aminés des 2 isoformes correspond essentiellement à une trentaine d'acides aminés situés entre les résidus 90 et 144 codés par les exons 3 comme le montre l'alignement.

Au cours de l'évolution, les séquences polypeptidiques de chacune des isoformes de l'ACOX1 ont été conservées dans différentes espèces comme les rongeurs, le koala, les poissons zèbres et les hommes (Morais et al., 2007). La comparaison des séquences polypeptidiques codées par les exons 3a entre elles ou 3b entre elles, chez l'homme et les rongeurs, montre une identité de séquence d'environ 90%. Lorsque les séquences polypeptidiques codées par les exons 3a et 3b sont comparées entre elles chez la même espèce, on trouve 52% d'identité de séquence chez l'homme, 55% chez le rat et 50% chez la souris (Morais et al., 2007).

L'ACOX1 est une flavoprotéine qui fixe une molécule de FAD (flavine adénine dinucléotide) par sous-unité comme groupement prosthétique (Inestrosa et al., 1979). Elle

catalyse la première étape de la β -oxydation peroxysomale qui consiste en deux demi-réactions : la première demi-réaction consiste en l'oxydation du substrat acyl-CoA qui est α , β -déshydrogéné, entre les carbones 2 et 3, en 2-trans-énoyl-CoA par le FAD qui est donc réduit en FADH₂ (EC 1.3.3.6). Au cours de la deuxième demi-réaction, le FADH₂ est ré-oxydé en FAD par l'oxygène moléculaire en générant du peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) (Figure 15). L'H₂O₂ formé est dégradé par la suite par la catalase (De Duve et Baudhuin, 1966).

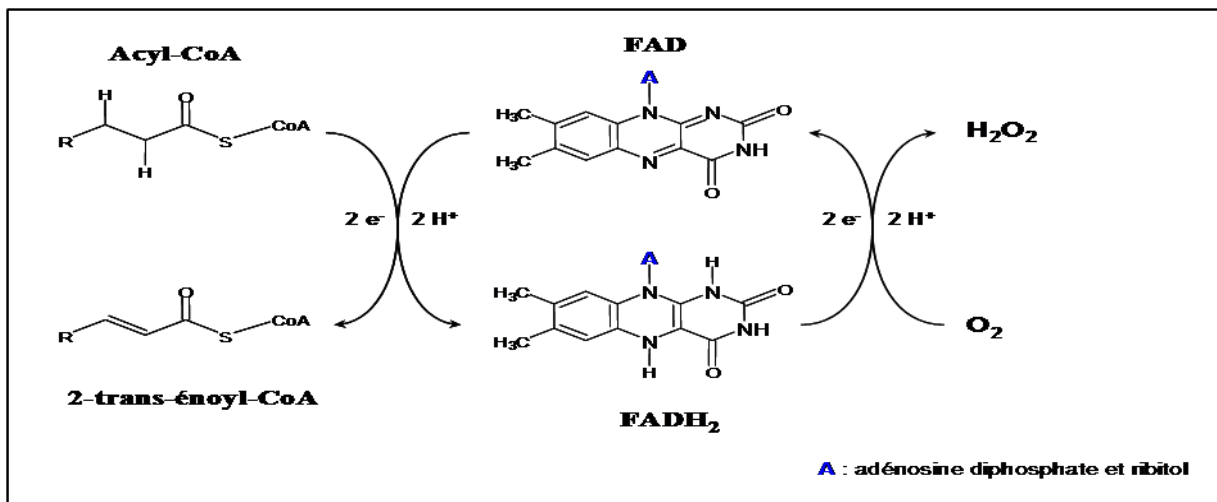


Figure 15. Mécanisme réactionnel de l'ACO1 lors de la transformation de l'acyl-CoA en 2-trans-énoyl-CoA.

Les études menées par Inestrosa et *coll.*, en 1979, sur le foie de rat ont montré des activités maximales pour l'acyl-CoA oxydase vis-à-vis des acides gras saturés à longue chaîne allant du C₁₂ (lauroyl-CoA) jusqu'au C₁₈ (stéaroyl-CoA). Ces mêmes résultats sont aussi obtenus lorsque l'ACOX1 humaine est exprimée dans des cellules d'insecte *Spodoptera frugiperda* (Chu et al., 1995) mais sans aucune précision sur la nature de l'isoforme concernée. Par la suite, des travaux réalisés sur les isoformes ACO-I et ACO-II du foie de rat ont montré une activité optimale de l'ACO-I pour le C₁₀ (caproyl-CoA) et de l'ACO-II pour le C₁₄ (myristoyl-CoA) (Setoyama et al., 1995). Récemment, une étude réalisée dans notre laboratoire et portant sur les isoformes humaines ACOX1a et ACOX1b exprimées séparément chez *E. coli*, a montré une activité optimale de chaque isoforme vis-à-vis du lauroyl-CoA (C₁₂) (Oaxaca-Castillo et al., 2007). De plus, la complémentation du mutant fox1Δ de *Saccharomyces cerevisiae* (ayant une délétion du gène FOX1 codant pour l'orthologue de l'ACOX1 humaine chez la levure) a été réalisée grâce à l'expression des deux isoformes de l'ACOX1 humaine. En effet, dans ces conditions, l'isoforme 1a humaine a montré une activité maximale pour le C₁₀ et une faible activité pour les AGTLC. Alors que l'isoforme 1b montre une forte activité vis-à-vis des AGTLC (Ferdinandusse et al., 2007).

Chez la souris *Acox1*^{-/-}, l'étude de l'expression tissulaire des 2 isoformes montre une expression plus forte pour l'ACOX1a dans le foie et les reins. Alors que l'ACOX1b est plus exprimée au niveau du cerveau, des poumons, du muscle, du tissu adipeux blanc et des testicules. Cette expression différentielle montre l'existence d'une régulation tissu-dépendante de l'épissage des ARNm 1a et 1b de l'ACOX1 (Vluggens et al., 2010).

E. Les maladies peroxysomales

Les peroxysomes sont des organites d'une très grande importance au sein de la cellule car ils sont impliqués dans différentes voies métaboliques notamment la β-oxydation des acides gras (cf. B.1.1 Le système de β-oxydation des acides gras). Cette importance est soulignée par les désordres peroxysomaux aboutissant à des maladies sévères chez l'homme. Les maladies peroxysomales sont classées en 2 groupes : (1) les maladies associées à un défaut de la biogenèse du peroxysome et (2) les maladies causées par une déficience d'une seule enzyme peroxysomale (Tableau 1, p75).

E.1. Les maladies associées au un défaut de la biogenèse du peroxysome (PBDs)

Ce groupe est divisé en 2 sous-groupes. Le premier est connu sous le nom de « Zellweger Spectrum » et comprend le syndrome de Zellweger (ZS) qui est la forme la plus sévère des

maladies peroxysomales, l'adrénoleucodystrophie néonatale (NALD) et la maladie infantile de Refsum (IRD), la moins sévère de ce sous-groupe (Tableau 1, p75). Pour le « Zellweger Spectrum », de nombreuses mutations affectant 11 gènes différents, *PEX 1, 2, 3, 5, 6, 10, 13, 14, 16, 19* et *26*(codant chacun pour une peroxine différente), ont été décrites. Les peroxines sont des protéines indispensables à la biogenèse des peroxysomes et à l'importation des protéines peroxysomales. Le deuxième sous-groupe des PBDs comprend la chondroplasie rhizomélique ponctuée de type I (RCDP type I), une maladie liée à une mutation du gène *PEX7* codant pour la PEX7, un récepteur pour les protéines à PTS2 peroxysomales (Wanders et Waterham, 2006a).

E.2. Les maladies causées par une déficience d'un enzyme/transporteur peroxysomal

De nombreuses maladies peroxysomales appartiennent à ce groupe. Elles sont associées à des anomalies cliniques sévères et différents phénotypes sont observés en fonction de la nature de l'enzyme déficiente et de sa fonction dans le peroxysome. Dans ce groupe, 4 maladies sont associées à la déficience de la β -oxydation peroxysomale (Tableau 1, p75) : l'adrénoleucodystrophie liée au chromosome X (X-ALD, MIM 300100), la pseudo-adrénoleucodystrophie néonatale (P-NALD), la déficience en D-PBE (MIM 261515) et la déficience en 2-méthyl-CoA racémase (AMACR, MIM604489).

L'adrénoleucodystrophie liée au chromosome X : elle est due à la déficience du gène *ABCD1* (ATP binding cassette) qui code pour l'enzyme/transporteur ALDP (adrenoleukodystrophy protein) responsable vraisemblablement du transport des esters-CoA des AGTLC à travers la membrane peroxysomale (Genin et al., 2011). Cette maladie est caractérisée par une accumulation du C26:0 et du C24:0 sous forme d'esters de cholestérols et une réduction de 30% de l'oxydation des AGTLC et de leur activation. Il existe actuellement 1058 mutations du gène *ABCD1* décrites (Van Veldhoven, 2010). Selon l'âge de l'apparition de la maladie et les organes affectés, différents phénotypes cliniques existent. Parmi eux : (i) la forme cérébrale ou CCALD (35% des cas) qui se manifeste entre 4 et 8 ans et est caractérisée par une démyélinisation inflammatoire progressive du système nerveux centrale et (ii) l'adrénomyélonéuropathie (AMN) qui se manifeste à l'âge adulte et qui est caractérisée principalement par une démyélinisation périphérique non inflammatoire (Van Veldhoven, 2010).

Tableau 1. Récapitulatif des différentes maladies peroxysomales.

Les maladies peroxysomales sont classées en 2 groupes : le groupe 1 des maladies liées aux désordres de biogenèse des peroxysomes et le groupe 2 des maladies liées à la déficience en une enzyme peroxysomale. Chaque maladie est liée à une déficience en une protéine peroxysomale et possède des profils différents de déficience en acides gras métabolisés dans le peroxysome et par la suite des signes cliniques différents. (AGLTC, acides gras à très longue chaîne ; PRIS, acide pristanique ; PHYT, acide phytanique ; D/THCA, di- et tri-hydroxycholestanoïque ; PL, plasmalogènes). Adapté de (Wanders et Waterham, 2006a).

Maladies	Désordres peroxysomaux	Protéines impliquées	Manifestations biochimiques					Signes cliniques et symptômes
			AGLTC	PRIS	PHYT	D/THCA	PL	
Groupe 1 : Maladie liée à la biogenèse des peroxysomes	Spectre de Zellweger (ZS, NALD, IRD)	PEX1, 2, 3, 5, 6, 10, 13, 14, 16, 19, 26	↑	↑	↑	↑	↓	ZS, NALD et IR représentent un spectre de maladies sévères, ZS étant la forme la plus grave, puis NALD et IRD. Ce sont des maladies du foie accompagnées d'un retard variable du développement neuronal, une rétinopathie et une surdité. Les patients atteints du ZS sont hypotoniques dès la naissance et meurent avant l'âge de 1 an.
	RDCP de type I	PEX7	N	N	↑	N	↓	Les patients ont des membres anormalement courts ; ils présentent des anomalies au niveau du visage, une cataracte, des déformations au niveau des articulations, un retard de croissance physique et mentale.
Groupe 2 : Maladie liée à la déficience d'une enzyme peroxysomale	X-ALD	ALDP	↑	N	N	N	N	Deux formes majeures : la forme cérébrale infantile sévère (CCALD : Childhood cerebral ALD) et l'adrénomyélonéuropathie (AMN). Dans la forme sévère CCALD, le développement du patient est normal jusqu'à l'âge de 6 ans puis leur santé se détériore rapidement et conduit à la mort dans les 2 ans.
	P-NALD	ACOX1	↑	N	N	N	N	Hypotonie, convulsions, perte de l'audition, rétinopathie, retard mental (troubles semblables à ceux observés dans , décès avant l'âge de 10 ans). La différence entre ces 2 maladies provient du fait que les cellules hépatiques des enfants atteints de P-NALD possèdent des peroxysomes de grosse taille et accumulent les AGLTC.
	Déficience de l'enzyme D-PBE	D-PBE	↑	↑	↑	↑	N	Phénotype apparenté à celui des enfants atteints par le ZS
	Déficience de la 2-méthyl-CoA racémase (AMACR)	AMACR	N	↑	↑	↑	N	Perte progressive de la vision, atteintes neurologiques, maladie hépatique
	RDCP de type II	DHAP-AT	N	N	N	N	↓	Retard de croissance physique et mentale, rhizomélie, mort précoce
	RDCP de type III	ADHAPS	N	N	N	N	↓	Retard de croissance physique et mentale, rhizomélie, mort précoce
	Maladie de Refsum	Phytanoyl-CoA hydroxylase (PAHX/PHYH)	N	N	↑	N	N	Rétinopathie pigmentaire, ataxie cérébelleuse (défauts de coordination des mouvements volontaires), ichtyose (desquamation cutanée) et parfois des problèmes cardiaques.
	Hyperoxalurie de type I (défaut de la conversion du glyoxylate)	Alanine glyoxylate Aminotransférase (AGT)	N	N	N	N	N	Perte progressive de la fonction rénale (à cause de la formation de calculs d'oxalate de calcium)
Acatalasémie	Catalase	N	N	N	N	N	Ulcération et gangrène au niveau de la bouche	

La P-NALD est une maladie associée à la déficience en ACOX1. Les patients présentent des symptômes et des signes cliniques similaires à ceux observés chez les enfants atteints de NALD sauf que dans le cas de la P-NALD, les peroxyosomes sont présents dans les cellules (Fournier et al., 1994; Poll-The et al., 1988).

La déficience en D-PBE présente des symptômes cliniques sévères ressemblant à ceux observés pour le syndrome de Zellweger. Chez les patients déficients en D-PBE, la β -oxydation peroxyosomale des tous les substrats majeurs est perturbée suite à l'implication de cette enzyme dans la β -oxydation des AGTLC, de l'acide pristanique, du DHCA et du THCA qui s'accumulent dans le plasma et les tissus (van Grunsven et al., 1998; Wanders, 2004a).

La déficience en α -méthyl-acyl-CoA racémase (AMACR) présente des signes cliniques modérés ressemblant à ceux observés dans la maladie de Refsum. Elle est caractérisée par une accumulation de l'acide pristanique, du DHCA et du THCA puisque l'AMACR convertit les acides gras branchés de la configuration 2R en 2S (Ferdinandusse et al., 2000; Setchell et al., 2003).

Parmi les maladies peroxyosomales causées par une déficience d'autres enzymes peroxyosomales, on trouve la chondroplasie rhizomélique ponctuée de type 2 ou de type 3, la maladie du Refsum, l'hyperoxalurie de type I et l'acatalasémie.

La chondroplasie rhizomélique ponctuée de type 2 ou de type 3 (MIM 222765 et MIM 600121) est due aux mutations respectives des gènes *DHAP-AT* (ou *GNPAT*) et *ADHAPS* (ou *AGPS*) codant respectivement la dihydroxyacétone-phosphate acyltransférase (DHAP-AT) et l'alkyl-dihydroxyacétone phosphate synthase (ADHAPS). Les patients atteints de ces déficiences présentent un défaut de la synthèse des éthers de phospholipides notamment les plasmalogènes (Brites et al., 2004).

La maladie du Refsum (MIM 266500) est due à une déficience de la phytanoyl-CoA hydroxylase, une enzyme de la voie de l' α -oxydation conduisant à l'accumulation de l'acide phytanique (Wanders et al., 2001a).

L'hyperoxalurie de type I (MIM 259900) est une maladie liée à une mutation du gène *AGAT* codant pour l'alanine/glyoxylate aminotransférase, une enzyme qui convertit le glyoxylate formé dans le peroxyosome en glycine. L'accumulation du glyoxylate aboutit à la formation de l'oxalate qui précipite sous forme d'oxalate de calcium dans les tissus et provoque des pertes des fonctions rénales (Wanders et Waterham, 2006a).

L'acatalasémie (MIM 614097) est une maladie très rare associée à une mutation du gène codant la catalase et par conséquence, un défaut du métabolisme de l' H_2O_2 (Wanders et Waterham, 2006a).

E.3. La pseudo-adrénoleucodystrophie néonatale (P-NALD)

La P-NALD (MIM 264470) est une maladie autosomale récessive qui se manifeste à la naissance, d'où l'appellation « néonatale », résultant d'une déficience de la première enzyme catalysant la β -oxydation peroxysomale, l'acyl-CoA oxydase 1. Les premiers patients atteints de cette maladie, ont été décrits en 1988 (Poll-The et al., 1988). Ce sont 2 patients, frères et sœurs nés de parents consanguins, souffrant d'hypotonie, de retard mental et psychomoteur, ainsi que de troubles de la vision et de l'ouïe, sans dysmorphisme facial. Les images de résonance magnétique réalisées sur ces patients indiquent une démyélinisation de la matière blanche cérébrale et les tests biochimiques révèlent une accumulation des AGTLC notamment le C26:0 (acide hexacosanoïque) et le C24:0 (acide lignocérique) dans le plasma et les tissus. Cependant, ces patients montrent des taux normaux d'acide pipécolique, de plasmalogènes, d'acide phytanique et des acides di- et tri-hydroxycoprostanoliques (Poll-The et al., 1988). Chez ces patients, l'ACOX1 est indétectable dans le foie par Western blot, et le marquage de la catalase sur des biopsies de foie réalisé en microscopie électronique montre des peroxysomes diminués en nombre et augmentés en taille et présentant des formes hétérogènes (ronds ou allongés). L'âge de décès de ces patients était de 4 à 5 ans. Des analyses par « Southern blotting » ont montrés chez ces patients une large délétion d'au moins 17 Kb du gène de l'ACOX1 à partir de l'exon 2 jusqu'au-delà de l'extrémité 3' (Fournier et al., 1994). Une autre étude menée sur 2 patients frère et sœur japonais nés aussi de parents consanguins montrent des symptômes et des signes cliniques et biochimiques ressemblant à ceux décrits par Poll-The et al (Poll-The et al., 1988), mais moins sévères, avec une ACOX1 détectable par Western blot de manière comparable à celle de sujets sains, mais sans activité catalytique (Suzuki et al., 1994). La recherche de mutations au niveau du gène de l'ACOX1 sur ces mêmes patients en plus d'un troisième présentant les signes cliniques et biochimiques de la déficience en ACOX1 ont permis l'identification d'une substitution 832A>G et d'une autre substitution 532G>T provoquant respectivement une mutation faux-sens M278V et G178C (Suzuki et al., 2002). Un cas rare d'un patient atteint de la P-NALD a été décrit avec un dysmorphisme facial (Kurian et al., 2004). Un garçon de 2 mois a été rapporté présentant une démyélinisation de la matière blanche cérébrale mais avec un taux normal de C26:0 dans le plasma (Rosewich et al., 2006). Ce patient porte une mutation IVS3-1G>A qui se situe au

niveau du site d'épissage de l'exon 3 conduisant à l'exclusion de l'exon 4. Cependant, le taux mesuré des AGTLC est élevé dans les fibroblastes de ce patient (Rosewich et al., 2006). Une étude récente regroupe vingt deux patients, diagnostiqués dans les précédentes études citées ci-dessus, avec les analyses de leurs mutations génétiques (Ferdinandusse et al., 2007). De nouvelles mutations sont décrites chez 2 patients ayant une déficience en ACOX1 : la première est une délétion homozygote d'une grande partie de l'exon 3 avec une délétion entière des exons 4 à 14 chez le premier patient et la deuxième est une mutation hétérozygote 692G>T (p.G231V) avec l'exclusion de l'exon 13 chez le deuxième patient (Carrozzo et al., 2008).

Jusqu'en 2008, tous les patients décrits, atteints de la P-NALD porteurs des différentes mutations du gène de l'ACOX1, présentaient des symptômes communs comme la démyélinisation de la matière blanche cérébrale et une accumulation du C26:0 dans le plasma et les tissus avec un rapport C26:0/C22:0 ou C24:0/C22:0 élevés. Les mutations observées chez ces patients se traduisent au niveau de la protéine soit par une perte de la liaison de l'ACOX1 avec son cofacteur (FAD), soit par une diminution de l'affinité de l'enzyme pour le substrat ou encore par la synthèse d'une protéine tronquée. Ces patients montraient des pertes progressives des fonctions motrices à partir de 28 mois en moyenne et l'âge moyen du décès était de 5 ans avec un patient qui a survécu jusqu'à l'âge de 19 ans (Funato et al., 2006). Deux patients frère et sœur atteints de P-NALD et âgés respectivement de 52 et 55 ans ont été récemment décrits. Ces patients présentent essentiellement une atrophie au niveau du cervelet et du tronc cérébral mais avec une absence de démyélinisation de la matière blanche cérébrale. Leur taux de C26:0 est élevé mais les rapports C26:0/C22:0 et C24:0/C22:0 sont, respectivement, légèrement élevés pour le frère et normaux pour la sœur, et de manière intéressante, le taux de DHA est normal et l'ACOX1 présente chez les deux patients. Les analyses des mutations révèlent, dans les 2 cas, une mutation homozygote faux-sens 629G→A aboutissant à une substitution R210H n'affectant ni le site catalytique ni le site de liaison du FAD dans la structure de l'ACOX1 (Ferdinandusse et al., 2010).

F. Modèle murin de déficience en Acyl-CoA oxydase1

Le modèle de souris *Acox1*^{-/-} a été obtenu par recombinaison homologe basée sur l'exclusion de l'exon 9 du gène de l'*Acox1* (Fan et al., 1996b). Dans ce modèle, les exons 8 et 9 ont été remplacés par une boîte de résistance à la néomycine PGK Néo. Les souris *Acox1*^{-/-} sont viables, non fertiles et comme dans le cas de la déficience en ACOX1 chez l'homme,

montrent un retard de croissance par rapport aux souris sauvages (45% de diminution de poids) mais contrairement à l'homme, ces souris ne montrent pas de manifestations neurologiques. L'ARNm ainsi que la protéine Acox1 sont absents. La conséquence de la perte de l'activité de l'ACOX1 est une augmentation du taux de C26:0 et un rapport anormal de C26:0/C22:0 dans le plasma sanguin. Les souris *Acox1*^{-/-} âgées de 3 à 4 mois, développent une hépatomégalie associée à une stéatose microvésiculaire due à la diminution de l'oxydation des acides gras dans les hépatocytes. A l'âge de 4 à 5 mois des lipogranulomas se forment dans le foie stéatosé allant de la région périportale jusqu'à la région centrale du lobule, contenant des lymphocytes, des macrophages et des éosinophiles. Etonnamment, chez ces souris, on observe une absence ou une réduction du nombre des peroxyosomes dans la majorité des hépatocytes due peut être à la perturbation de la perméabilité des peroxyosomes par l'accumulation excessive d'AGTLC toxiques qui interfèrent avec l'import des protéines. A l'âge de 6 à 8 mois, une remarquable et forte régénération spontanée des hépatocytes non stéatosés est observée, accompagnée d'une prolifération de peroxyosomes. Les nouveaux hépatocytes remplacent presque tous les hépatocytes stéatosiques dépourvus de peroxyosomes. Enfin, les souris *Acox1*^{-/-}, à l'âge de 10 à 15 mois, développent une hépatocarcinogénèse due à une activation permanente de PPAR α . Cette activation conduit à une expression élevée des gènes cibles de PPAR α tels que la L-PBE, la thiolase et les CYP4A. En effet, l'absence de l'ACOX1 provoque l'accumulation des AGTLC, dont un ou plusieurs constituerait un ligand endogène activant PPAR α et aboutissant à son activation et par la suite, à l'induction des ces gènes cibles (Fan et al., 1996b).

Le modèle des souris *Acox1*^{-/-} montre les effets de l'absence de l'ACOX1 sur le métabolisme des AGTLC qui s'accumulent et provoquent (i) l'activation de PPAR α qui, à court terme, provoque une stéatose et à long terme mène au développement de tumeurs du foie et (ii) un stress oxydatif dû à la réponse inflammatoire et à l'induction des enzymes génératrices d'H₂O₂. Ce modèle montre également le rôle crucial de l'ACOX1 dans la régulation physiologique de PPAR α (Fan et al., 1996a; Fan et al., 1998; Reddy et Hashimoto, 2001a).

G. Peroxyosomes et inflammation

Les patients atteints de la P-NALD et de la CCALD (forme cérébrale infantile d'adrénoleucodystrophie), deux maladies neurodégénératives (Tableau 1, p75), présentent respectivement une déficience en deux protéines peroxyosomales, ACOX1 et ALDP, et accumulent de ce fait les AGTLC (C24:0 et C26:0) dans leur plasma et leurs tissus. Bien que

les signes cliniques et les symptômes observés chez les patients atteints de la CCALD soient plus sévères que ceux observés chez les patients P-NALD (Tableau 1, p75), la démyélinisation de la matière blanche cérébrale au niveau du système nerveux central (SNC) est un processus qui se développe dans les deux maladies. Actuellement, les mécanismes de la pathogenèse de ces leucodystrophies peroxysomales associant une accumulation importante d'AGTLC avec un processus plus ou moins rapide de démyélinisation menant à des retards du développement sont encore malconnus.

De nombreux travaux réalisés sur des patients atteints de la CCALD ont permis d'éclaircir le processus inflammatoire impliqué dans la démyélinisation de la matière blanche au niveau du SNC. Ce processus inflammatoire est caractérisé par une infiltration majeure de lymphocytes T CD8⁺ (cytotoxiques) ainsi que des lymphocytes CD4⁺ (helper), des lymphocytes B et des macrophages vers les zones de démyélinisation suite à la rupture de la barrière hémato-méningée. De plus, au niveau de ces zones, des macrophages résidents (les cellules microgliales du cerveau et les astrocytes qui sont chargés de protéger les neurones et maintenir la barrière hémato-méningée) sont présents et hyper-réactifs. Il a été suggéré qu'au cours de la démyélinisation, les oligodendrocytes (cellules impliquées dans la formation de la myéline dans le SNC) meurent par cytolysse (Ito et al., 2001). D'autres travaux ont mis en évidence la présence de macrophages et des astrocytes dans les zones actives de démyélinisation ainsi que des lymphocytes T présents autour des vaisseaux à l'intérieur de la zone de démyélinisation (Powers et al., 1992). Du TNF- α (Tumor necrosis factor-alpha) a été détecté principalement dans les astrocytes mais aussi dans les macrophages suggérant que l'accumulation des AGTLC stimule les astrocytes et les macrophages qui secréteraient du TNF- α et des cytokines conduisant à la destruction de la myéline par les lymphocytes T et B (Powers et al., 1992). Les travaux menés par McGuinness *et coll.*,(1997) et Paintlia *et coll.*,(2003) sur des lésions cérébrales de patients atteints d'X-ALD par analyse de puces à ADN et par RT-PCR ont montré une augmentation de l'expression de TNF- α , des interleukines IL-1 α , IL-6 et d'IL-12 et des chimiokines CCL2, -4, -7, -11, -16, -21 ainsi que leurs récepteurs CXCL1 et CX3CL1 (McGuinness et al., 1997; Paintlia et al., 2003). Il a été également noté une hypertrophie et une hyperplasie des astrocytes au niveau des lésions cérébrales ainsi qu'une augmentation du taux des esters de cholestérol et une diminution du taux de cholestérol libre et des sphingomyélines suggérant une altération des radeaux lipidiques (rafts) (composés essentiellement de sphingomyéline et de cholestérol). Il en résulte une dèstabilisation des membranes aboutissant au relargage de fragments myéliniques

anormaux contenant des AGTLC. Ces derniers activeraient les astrocytes et les microglies qui secréteraient des cytokines et des chimiokines déclenchant ainsi une réponse inflammatoire permettant l'infiltration des leucocytes dans la matière blanche cérébrale (Paintlia et al., 2003). Dans la phase précoce de l'évolution de la lésion cérébrale, il a été décrit des cellules microgliales en apoptose dans la zone adjacente à la zone de démyélinisation, ce qui diminuerait leurs capacités de neuroprotection et provoquerait des dommages au niveau des oligodendrocytes (Eichler et al., 2008).

H. Interrelations peroxysome-mitochondrie

H.1. Morphologie

La mitochondrie et le peroxysome sont deux organites cellulaires ubiquitaires d'origines évolutives différentes. Bien que la fonction principale de la mitochondrie est de fournir de l'énergie sous forme d'ATP, elle est aussi impliquée dans le contrôle de l'état redox, dans l'homéostasie du Ca^{2+} et dans l'apoptose (McBride et al., 2006). Le peroxysome, considéré pendant longtemps comme la « corbeille » de la cellule, joue un rôle essentiel dans le métabolisme des lipides et s'avère d'une très grande utilité pour le bon fonctionnement de la cellule et pour le maintien d'une bonne santé chez l'homme (Wanders et Waterham, 2006b). Malgré les différences qui existent entre ces deux organites, ils présentent beaucoup de similarité aussi bien au niveau morphologique que fonctionnel. La mitochondrie et le peroxysome sont tous deux des organites dynamiques qui changent fréquemment de taille et de forme et qui se déplacent dans la cellule tout au long du cytosquelette (Schrader et al., 2003). Ils peuvent adopter plusieurs morphologies incluant des formes sphériques, réniformes ou tubulo-réticulaires (Okamoto et Shaw, 2005; Schrader et al., 2000).

H.2. Production d'énergie

Bien que ces deux organites possèdent chacun son propre système de β -oxydation des acides gras de spécificité différente et constitué d'enzymes différentes, le mécanisme est similaire et implique les mêmes étapes de réactions biochimiques (déshydrogénation, hydratation, déshydrogénation et clivage thiolytique) (Poirier et al., 2006; Wanders, 2004b). Alors que la première enzyme de la β -oxydation mitochondriale (acyl-CoA déshydrogénase) transfère indirectement les électrons aux protéines de la chaîne respiratoire, au cours de la β -oxydation peroxysomale, les électrons sont transférés directement à l'oxygène moléculaire pour la production d' H_2O_2 . L'énergie résultante de ce processus permet la formation d'ATP

au niveau des mitochondries alors qu'elle est dissipée sous forme de chaleur au niveau du peroxyosome contribuant ainsi à la thermogénèse (El Kebbaj et al., 2009; Wanders, 2004b).

H.3. Dégradation des espèces réactives de l'oxygène

La mitochondrie et le peroxyosome jouent un rôle clé dans la production et la dégradation des espèces réactives de l'oxygène (ERO). Au niveau de la mitochondrie, le complexe I (NADH-Coenzyme Q oxydoréductase) et le complexe III (cytochrome c oxydase) sont les 2 sites majeurs de formation d'ERO (radicaux superoxydes, peroxyde d'hydrogène, radicaux hydroxyles et peroxynitrites) (Jezek et Hlavata, 2005; Moldovan et Moldovan, 2004; Schrader et Fahimi, 2006). Au niveau du peroxyosome, les différentes oxydases produisent des ERO (peroxyde d'hydrogène, radicaux superoxydes et oxydes nitriques) (Schrader et Fahimi, 2006; Stolz et al., 2002). Les ERO, dangereux pour la cellule, peuvent attaquer et inactiver les protéines, les lipides et l'ADN nucléaire et mitochondrial (Moldovan et Moldovan, 2004). Cependant, les deux organites renferment des enzymes et des molécules antioxydantes capables de dégrader les ERO et d'éviter leur nocivité. Ce sont, par exemple, soit des molécules telles que le glutathion, l'athiorédoxine et le NADH soit des enzymes antioxydantes. Parmi ces enzymes, on en trouve au niveau de la mitochondrie la superoxyde dismutase à Mn (MnSOD), la glutathion réductase et la glutathion peroxydase (Jezek et Hlavata, 2005). Au niveau du peroxyosome, on en trouve la catalase, la superoxyde dismutase à Cu ou Zn (Cu/Zn-SOD), la glutathion peroxydase, l'époxyde hydrolase et la peroxyrédoxine V (Schrader et Fahimi, 2006).

H.4. Dialogue entre mitochondrie et peroxyosome

H.4.1. Processus de Fusion/Fission

Certains facteurs impliqués dans la fission sont partagés entre la mitochondrie et le peroxyosome (Camoses et al., 2009; Schrader, 2006). La dynamine GTPase 1 (DRP1: Dynamin related protein 1) et le facteur Fission 1 (Fis1) sont des protéines conservées au cours de l'évolution, adressées à la mitochondrie et au peroxyosome, et qui régulent le processus de fission des deux organites. Fis1, une protéine ancrée dans la membrane externe de la mitochondrie et dans la membrane peroxyosomale recrute DRP1 du cytosol vers la membrane. Cette dernière initie la constriction et la fission en réponse à l'hydrolyse GTP (Thoms et al., 2009). L'adressage de la protéine Fis1 vers les membranes mitochondriales ou peroxyosomales semble suivre un mécanisme indépendant mais il pourrait y avoir une concurrence entre les mitochondries et les peroxyosomes pour DRP1 et Fis1 (Delille et Schrader, 2008).

Récemment, une nouvelle ligase mitochondriale ancrée dans la membrane externe appelée MAPL (mitochondria-anchored protein ligase) (Li et al., 2008) a été trouvée concentrée dans des vésicules dérivées de la mitochondrie (MDVs pour mitochondrial derived vesicles) (Neuspiel et al., 2008). Les MDVs de 70 à 100 nm se forment à partir de la périphérie de la membrane mitochondriale externe et peuvent contenir une simple ou une double membrane. Cependant, leur mécanisme de biogenèse est indépendant de la DRP1 (Neuspiel et al., 2008).

Récemment, une voie de transport vésiculaire de la mitochondrie vers le peroxysome a été découverte (Neuspiel et al., 2008). Cette voie est médiée par des MDVs contenant la protéine MAPL. Les MDVs peuvent se former à partir de la mitochondrie suite à une surexpression de la protéine MAPL mais le mécanisme de biogenèse est indépendant de MAPL et de la DRP1 impliquée dans la fission des organites (Neuspiel et al., 2008). D'une manière surprenante, la majorité des MDVs contenant la protéine MAPL se retrouvent avec une sous-population de peroxysomes et l'analyse des images en vidéo microscopie a montré la fusion de ces vésicules MAPL positives avec les peroxysomes (Neuspiel et al., 2008). Bien que le contenu de ces vésicules reste jusqu'à présent inconnu, il a été suggéré que ces vésicules transportent des protéines, des métabolites et des lipides de la mitochondrie vers le peroxysome (Thoms et al., 2009). Une autre hypothèse a été émise concernant les MDVs suggérant que des AGTLC ou des acides gras modifiés pouvant entrer dans la mitochondrie mais ne pouvant pas être dégradés, constitueraient la majorité du cargo des MDVs. Ces acides gras pourraient être transportés aux peroxysomes soit pour y être β -oxydés ou soit pour constituer des substrats pour la synthèse de plasmalogènes (Andrade-Navarro et al., 2009).

H.4.2. Altérations mitochondriales et maladies peroxysomales

Plusieurs études ont décrit des altérations de la morphologie ou de certaines fonctions mitochondriales dans le cas d'un désordre de biogenèse du peroxysome. Chez les patients atteints du syndrome de Zellweger, les mitochondries sont morphologiquement affectées (Goldfischer et al., 1973). Ces mitochondries présentant des formes hétérogènes ont été observées avec des inclusions cristallines ou présentant des variations de la morphologie des crêtes ou bien des modifications de la densité matricielle. Au niveau fonctionnel, plusieurs études ont décrit des réductions des capacités oxydatives des mitochondries dans le foie, le cerveau, et les tissus musculaires chez les patients présentant des défauts de biogenèse du peroxysome (Hughes et al., 1990; Mooi et al., 1983; Vamecq et al., 1986). Chez les souris *Pex5^{-/-}*, un modèle murin du syndrome de Zellweger, des structures anormales des

mitochondries hépatiques ont été observées. Elles apparaissent gonflées et allongées avec des crêtes en forme de boucles. Ces changements morphologiques sont accompagnés d'une expression et d'une activité réduite des complexes I et IV et d'une augmentation du stress oxydant mais sans perturbation du niveau cellulaire de l'ATP (Baumgart et al., 2001). De plus, un modèle de souris *L-Pex5*^{-/-} présentant un défaut de biogenèse du peroxysome tissu-spécifique au niveau des hépatocytes a également montré des anomalies des crêtes de la membrane interne mitochondriale et une réduction des activités des complexes respiratoires I, III et IV ainsi qu'une diminution du potentiel de la membrane interne mitochondriale. A la différence des souris *Pex5*^{-/-}, les souris *L-Pex5*^{-/-} ne montrent pas d'indice de présence de stress oxydant (Dirkx et al., 2005). Des altérations mitochondriales ont également été observées dans les modèles murins déficients en *Mfp-2* (Huyghe et al., 2006), en *Abcd2* (Ferrer et al., 2005) ainsi que chez les souris *CNS-Pex5*^{-/-} déficientes en peroxysome au niveau du système nerveux central (Hulshagen et al., 2008).

I. La mitochondrie

I.1. Généralités

Les mitochondries sont des organites présents dans toutes les cellules eucaryotes à l'exception des globules rouges. De forme oblongue, les mitochondries ont une taille qui varie entre 1-2 à 10µm de long et de 0,5 à 1 µm de large et leur nombre varie chez l'homme entre 500 et 2000 mitochondries par cellule et cela en fonction du type cellulaire et des besoins énergétiques. La mitochondrie est entourée de 2 membranes, une externe (MEM) et une interne (MIM) qui délimitent 2 compartiments bien séparés : la matrice et l'espace intermembranaire. La MEM est caractérisée par la présence de canaux (porines) la rendant perméable aux molécules de poids inférieur à 10 kDa. Cependant la MIM est imperméable et est caractérisée par la présence d'un phospholipide particulier, la cardiolipine (Clostre, 2001). L'espace intermembranaire possède une composition proche du cytosol et est chargé positivement grâce à sa richesse en protons. La matrice, compartiment interne de la mitochondrie, est le siège de nombreuses voies métaboliques tels que la β-oxydation des acides gras et le cycle de Krebs, et renferme l'ADN mitochondrial (ADNmt), les ribosomes mitochondriaux et des ARN de transfert.

I.2. Principales fonctions

L'une des fonctions principales de la mitochondrie est la production d'énergie sous forme d'ATP. En effet, les réactions de phosphorylations oxydatives au niveau de la MIM permettent

de transformer l'énergie contenue dans les nutriments en énergie utilisable par la cellule, l'ATP. Le fonctionnement de la chaîne respiratoire provoque la génération des ERO, faisant de la mitochondrie une source majeure de ces oxydants puissants qui, en cas d'excès, sont responsables de nombreuses altérations au niveau de la cellule. La mitochondrie participe également à la production de chaleur grâce aux protéines de découplage UCPs (ou « uncoupling proteins ») qui dissipent le gradient d'électron au niveau de la chaîne respiratoire.

I.3. Les complexes de la chaîne respiratoire

Les complexes de la chaîne respiratoire sont des protéines localisées dans la membrane interne mitochondriale et sont spécialisées dans les réactions d'oxydo-réduction permettant le transport des électrons issus de l'oxydation du NADH et du succinate (générés par le cycle de Krebs) vers l'oxygène moléculaire. En effet, le NADH est oxydé au niveau du complexe I et le succinate au niveau du complexe II permettant le transfert d'électrons vers une molécule liposoluble et mobile, l'ubiquinone. Le complexe III assure ensuite le transfert des électrons de l'ubiquinol (forme réduite de l'ubiquinone) vers le cytochrome c qui, une fois réduit, transporte les électrons jusqu'au complexe IV où ils sont transférés à l'oxygène moléculaire. Le transfert d'électrons au niveau du complexe I, II et III est accompagné d'une expulsion de protons vers l'espace intermembranaire ce qui crée un potentiel membranaire ($\Delta\psi$) électrochimique et par la suite un gradient de pH à travers la membrane interne mitochondriale et provoque l'acidification de l'espace intermembranaire. Le retour des protons vers la matrice active l'ATP synthase ou complexe V qui catalyse la synthèse de l'ATP étape ainsi nommée la phosphorylation oxydative (Figure 16, **p86**).

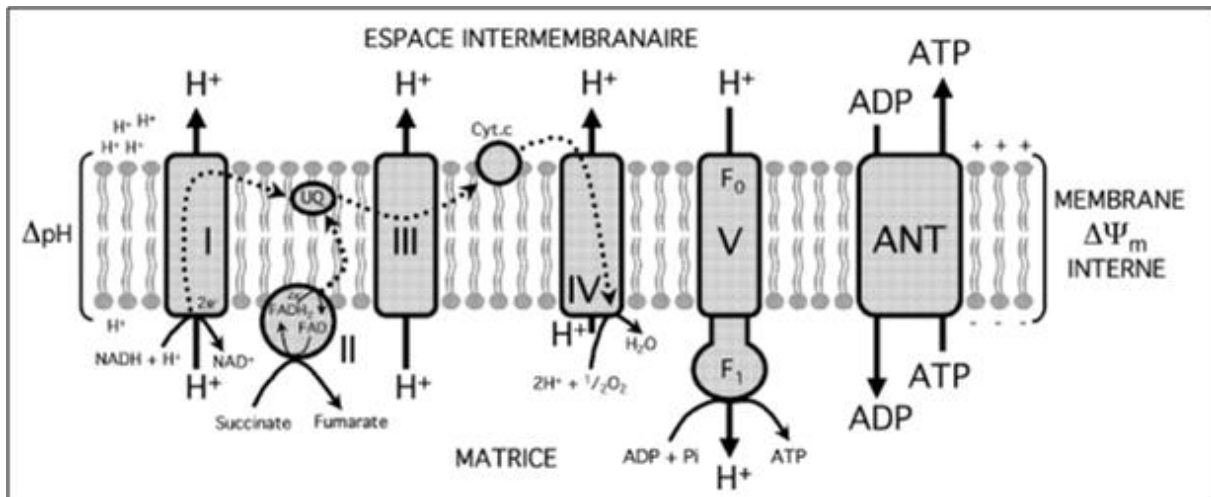


Figure 16. Représentation schématique des complexes de la chaîne respiratoire mitochondriale.

Le flux d'électrons (flèches en pointillés) est généré au niveau du complexe I (I) et du complexe II (II) à partir des coenzymes réduites $NADH$ et $FADH_2$, issues de manière respective du métabolisme énergétique mitochondriale. Ce flux est transféré grâce aux deux navettes ubiquinone (UQ) et cytochrome c (Cyt c) et au complexe III (III) et au complexe IV (IV) jusqu'à l'oxygène moléculaire. Cela s'accompagne de la sortie des protons H^+ de la matrice vers l'espace intermembranaire créant ainsi un gradient de pH (ΔpH) et un potentiel de membrane ($\Delta \Psi_m$). Le complexe V (V) ou F_0/F_1 -ATP synthase permet de convertir cette force protomotrice en ATP en faisant entrer les protons dans la matrice. Le transporteur des nucléotides adényliques (ANT) permet le bon fonctionnement de ces réactions de phosphorylations oxydatives en assurant en continu la sortie d'un ATP contre l'entrée d'un ADP. Schéma adaptée à partir du site [http://tel.archives-ouvertes.fr/docs/00/60/95/14/PDF/TH2009_Li - Bo.pdf](http://tel.archives-ouvertes.fr/docs/00/60/95/14/PDF/TH2009_Li_-_Bo.pdf).

I.3.1. Complexe I : NADH-Coenzyme Q oxydoréductase

La NADH-Coenzyme Q oxydoréductase ou complexe I catalyse la première réaction au niveau de la chaîne respiratoire mitochondriale. Cette réaction consiste en l'oxydation du NADH et le transfert de deux électrons à l'ubiquinone. La réaction est couplée à la translocation de deux protons de la matrice mitochondriale vers l'espace intermembranaire contribuant à la force motrice nécessaire pour la synthèse d'ATP (Walker, 1992; Yagi et Matsuno-Yagi, 2003). Le complexe I est constitué de 45 sous-unités dont 38 sont codés par le génome nucléaire et 7 par le génome mitochondrial (Carroll et al., 2006). La flavine mononucléotide (FMN) est le premier accepteur d'électrons et est situé au niveau du domaine hydrophile de ce complexe qui contient le site de liaison du NADH. Le site catalytique de l'enzyme est constitué de centres Fer/Soufre (Fe-S) (Sazanov, 2007). Le système de pompage des électrons est localisé dans la partie membranaire du complexe (Yagi et Matsuno-Yagi, 2003). De plus, ce complexe a été suggéré comme source de production d'ERO dans la mitochondrie et pouvant endommager l'ADNmt (Balaban et al., 2005).

I.3.2. Complexe II : Succinate déshydrogénase

Le complexe II ou succinate déshydrogénase (SDH) catalyse la réaction d'oxydation du succinate en fumarate par l'intermédiaire de l'oxydation du FADH₂ et la réduction de l'ubiquinone ce qui permet le transfert de deux électrons au complexe III. Cette enzyme est liée à la MIM avec une partie faisant face à la matrice (Lancaster, 2002). Cette enzyme est composée de quatre sous-unités de A à D codées par quatre gènes nucléaires différents (Rustin et Rotig, 2002). Des sites de liaison pour NRF-1, NRF-2 et SP1 ont été décrit au niveau des régions promotrices des quatre gènes codant ce complexe (Briere et al., 2005). Une forte activité du complexe II aboutie à une surproduction d'ERO (Briere et al., 2005).

I.3.3. Complexe III : Cytochrome c réductase

Le complexe III ou ubiquinol cytochrome c réductase est une protéine transmembranaire de la MIM. Elle catalyse la réaction de réduction du cytochrome c. Au cours de cette réaction, le coenzyme Q est oxydé et deux protons passent de la matrice mitochondriale vers l'espace intermembranaire (Schagger et al., 1995).

I.3.4. Complexe IV : Cytochrome c oxydase

Le complexe IV ou cytochrome c oxydase catalyse la réaction d'oxydo-réduction de l'oxygène moléculaire en H₂O et les électrons produits sont transférés à l'ATP synthase (complexe V). Au cours de cette étape, 2 protons sont consommés et 2 autres sont transférés de

la matrice vers l'espace intermembranaire. Des défauts d'activité de cette enzyme ont été associés au développement de myopathies (Zeviani et al., 1991) et à plusieurs types d'encéphalopathies (Savasta et al., 2001). Chez l'homme, le complexe IV est composé de 13 sous-unités. Trois sous-unités (COX I, COX II et COX III) sont codées par l'ADNmt et les 10 autres sont codées par le génome nucléaire. Ces protéines sont synthétisées au niveau du cytoplasme et sont transportées vers la mitochondrie (Borisov, 2002).

I.3.5. Complexe V: L'ATP synthase

L'ATP synthase est composée principalement de 2 parties F_0 et F_1 . La partie F_0 est localisée dans la MIM (Schon et al., 2001). Cette partie a pour rôle de conduire les protons de l'espace intermembranaire vers la matrice. La partie F_1 est localisée dans la matrice. Cette partie utilise le gradient de pH formé par l'expulsion des protons par le complexe I, III et IV pour convertir l'ADP en ATP associé au retour des protons de l'espace intermembranaire vers la matrice (Schon et al., 2001). L'ATP formé au cours de cette réaction est exporté vers le cytosol en échange d'ADP. Les 2 parties sont liées entre elles par la sous-unité c de F_0 et la sous-unité γ de F_1 qui agissent comme un rotor qui utilise le passage des protons à travers le stator pour fonctionner.

I.4. L'ADN mitochondrial

Les mitochondries possèdent leur propre génome ou ADN mitochondrial (ADNmt) et sont capables de la réplication et de la transcription de cet ADN d'une manière semi-autonome. L'ADNmt chez l'homme est circulaire, double brin, d'environ 16 kb et présent en 10^3 à 10^4 copies dans les cellules humaines (Figure 17) (Satoh et Kuroiwa, 1991). Il code pour 2 ARNr (12S et 16S), 22 ARNt et 13 parmi les 90 sous-unités des complexes de la chaîne respiratoire. Les deux brins de l'ADNmt diffèrent par leur contenu en G+T avec un brin lourd (H-strand : Heavy strand) et un brin léger (L-strand : Light strand). L'ADNmt est dépourvu d'introns et la seule région non-codante, la D-loop (Displacement-loop), contient les éléments qui contrôlent sa réplication et sa transcription (Shadel et Clayton, 1997). En effet, la D-loop (1121 bp) est une région régulatrice contenant les promoteurs bidirectionnels, HSP et LSP, pour la transcription respective du brin lourd et du brin léger ainsi que le point d'origine (O_H) de la synthèse du brin lourd par où commence la réplication de l'ADNmt (Figure 17) (Clayton, 2000).

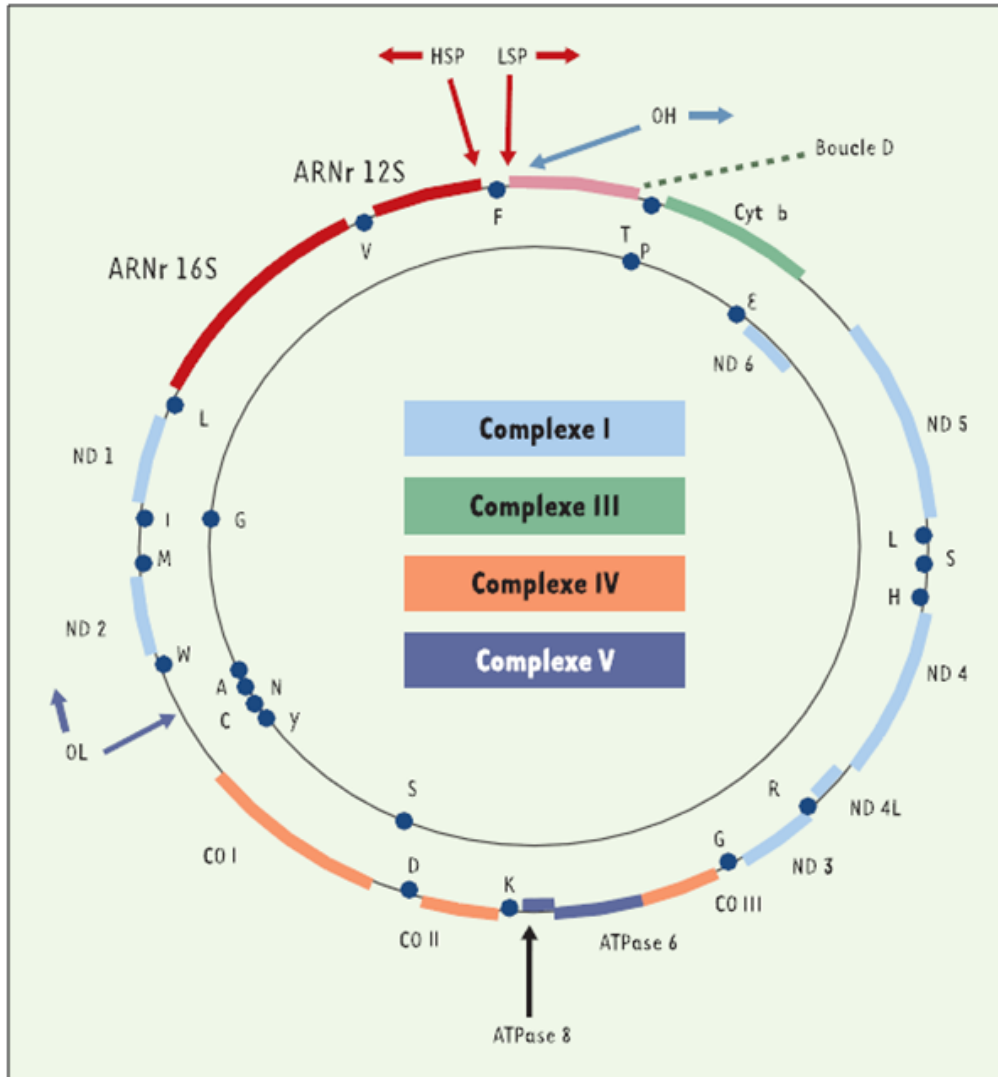


Figure 17. Représentation schématique de l'organisation de l'ADN mitochondrial. Le génome mitochondrial (ADNmt) est une molécule d'ADN circulaire double brin de 16,5 kb. Il renferme la boucle D qui est la région de contrôle de la réplication et de la transcription et qui comporte les deux promoteurs de transcription (HSP et LSP) ainsi que l'origine de réplication (OH). Cette molécule d'ADN contient les gènes suivants : 2 gènes d'ARN ribosomiques (12S et 16S), 22 gènes d'ARN de transfert (représentés par les points) et 13 gènes codant les protéines de la chaîne respiratoire: la NADH déshydrogénase (ND1, ND2, ND3, ND4L, ND4, ND5 et ND6), la cytochrome c réductase (Cyt b), la cytochrome c oxydase (CO I, CO II et CO III) et l'ATP synthase (ATPase 6 et ATPase 8). Adapté de (May-Panloup et al., 2004).

I.4.1. Transcription

L'ADNmt est transcrit grâce à l'ARN polymérase mitochondriale (POLRMT) qui présente un degré de similarité élevé avec la partie C-terminale de l'ARN polymérase des bactériophages T7 et T3 (Masters et al., 1987; Tiranti et al., 1997). A la différence de l'ARN polymérase du bactériophage T7, la POLRMT ne peut pas à elle toute seule interagir avec le l'ADNmt et se lier aux promoteurs pour l'initiation de la transcription mais requiert la présence simultanée du facteur de transcription mitochondrial A (TFAM) (Fisher et Clayton, 1985; Fisher et Clayton, 1988) avec soit le facteur de transcription B1 (TFB1M) ou B2 (TFB2M) (Falkenberg et al., 2002; McCulloch et al., 2002) pour l'initiation de la transcription soit le facteur mitochondrial de la terminaison de la transcription (mTERF) pour la terminaison de la transcription (Fernandez-Silva et al., 1997).

I.4.2. Régulation de la transcription de l'ADN mitochondrial

TFAM, une protéine de 25kDa, appartient à la sous-famille HMGB (HMG-box) de la famille des protéines HMG (High Mobility Group) connues pour leurs activités dans la transcription, la réplication et la réparation de l'ADN (Parisi et Clayton, 1991). TFAM renferme dans sa structure 2 boîtes HMG qui lui confère une très grande affinité pour l'ADNmt et une queue de 25 acides aminés en C-ter (Parisi et Clayton, 1991). La queue en C-ter permet la liaison spécifique de TFAM aux sites de reconnaissance aux niveaux des promoteurs HSP et LSP et l'interaction directe avec TFB1M et TFB2M pour l'activation de la transcription des gènes mitochondriaux (Asin-Cayuela et Gustafsson, 2007; Dairaghi et al., 1995; Scarpulla, 2008b). Un rôle probable de TFAM a été décrit dans la modification structurale de l'ADNmt comme par exemple le déroulement de l'ADN au niveau de la région promotrice facilitant ainsi l'initiation de la transcription (Gaspari et al., 2004). Il a été suggéré que TFAM joue un rôle également de stabilisation et de maintenance de l'ADNmt (Scarpulla, 2008b) et dans la régulation du nombre de copie de l'ADNmt (Kang et al., 2007).

Chez l'homme et les mammifères, deux isoformes du mtTFB ont été identifiées séparément, TFB1M et TFB2M (Falkenberg et al., 2002). Ces 2 facteurs de transcription sont apparentés aux ARNr méthyltransférases. Ils interagissent avec TFAM et la POLRMT pour initier la transcription de l'ADNmt (Falkenberg et al., 2002). De plus, les deux isoformes du mtTFB interagissent directement avec le domaine d'activation en C-ter du TFAM (McCulloch et Shadel, 2003). Il a été suggéré un rôle pour TFB2M comme facteur de transcription mitochondrial spécialisé dans la transcription dans les eucaryotes supérieures (Rantanen et al., 2003) alors que TFB1M joue essentiellement un rôle dans la régulation de la traduction

(Matsushima et al., 2005). Trois modèles possibles ont été décrits pour le fonctionnement de TFB1M et TFB2M : (i) TFB1M et TFB2M se lient à l'ARN nouvellement synthétisé pour prévenir la formation d'un hybride ARN-ADN au niveau du promoteur, (ii) TFB1M ou TFB2M interagissent avec l'ADNmt mono brin et stabilisent le complexe de transcription et (iii) TFB1M ou TFB2M interagissent avec des molécules régulatrices de l'ARN pour réguler la transcription de l'ADNmt (Asin-Cayuela et Gustafsson, 2007).

I.5. Contrôle nucléaire des fonctions mitochondriales

Les deux facteurs de transcription SP1 (Stimulatory Protein1) et YY1 (Ying Yang1) appartiennent à la famille des protéines à doigt de zinc et sont exprimés de façon ubiquitaire. Ils jouent un rôle dans la régulation de nombreux gènes dont certains codant pour des protéines de la chaîne respiratoire. Des sites fonctionnels pour SP1 sont trouvés au niveau du promoteur du gène de la COX (Virbasius et Scarpulla, 1991). Cependant, SP1 pourrait avoir aussi bien des effets négatifs réprimant ainsi l'expression de la sous-unité β de l'ATP synthase que des effets positifs en activant les différents promoteurs du gène codant les sous-unités de la COX (Scarpulla, 2008a). Le facteur YY1 joue un rôle dans l'expression de la majorité des sous-unités de la COX (Lenka et al., 1998). Tout comme SP1, le rôle de ce facteur semble différent selon les gènes : il stimule la transcription de la sous-unité VIIc de la COX (Basu et al., 1997) et de manière opposée il réprime l'expression de la sous-unité Vb de cette même enzyme (Seelan et Grossman, 1997).

NRF-1 est un facteur de transcription nucléaire identifié pour la première fois par Evans et Scarpulla en 1989 comme protéine pouvant se lier au promoteur du gène du cytochrome c chez le rat et comme principal activateur transcriptionnel de ce gène (Evans et Scarpulla, 1989). Par la suite, plusieurs sites de liaison fonctionnels pour NRF-1 ont été identifiés sur le promoteur de plusieurs gènes nucléaires codant des protéines de la chaîne respiratoire (Chau et al., 1992; Evans et Scarpulla, 1990). Bien que la plupart de ces gènes codent pour les sous-unités des 5 complexes respiratoires, d'autres sont impliqués dans l'expression, l'assemblage et le fonctionnement de la chaîne respiratoire (Virbasius et al., 1993a). De plus, NRF-1 peut potentiellement coordonner l'expression des sous-unités respiratoires codés par les 2 génomes, nucléaire et mitochondrial, à travers le contrôle des principaux régulateurs de la réplication et la transcription mitochondriales comme la POLRMT et les facteurs TFAM, TFB1M et TFB2M (Gleyzer et al., 2005; Virbasius et Scarpulla, 1994).

NRF-2, l'homologue humain du GABP chez la souris, a été identifié pour sa liaison spécifique sur le promoteur de plusieurs gènes codant des sous-unités de la COX, régulant ainsi leur transcription (Virbasius et al., 1993b). Bien qu'initialement ce facteur de transcription fut reconnu pour son rôle dans l'expression de COXIV et COXVb, de nouvelles études ont montré l'implication de ce facteur dans l'expression des 10 sous-unités de la COX codées par le génome nucléaire (Ongwijitwat et Wong-Riley, 2005). Comme pour NRF-1, des sites de liaison fonctionnels pour NRF-2 sont présents au niveau de promoteurs de gènes essentiels pour l'expression de la chaîne respiratoire. Ces gènes comprennent ceux qui codent les facteurs de transcription mitochondriaux TFAM, TFB1M et TFB2M (Gleyzer et al., 2005) ainsi que ceux qui codent 3 des 4 sous-unités de la succinate déshydrogénase (complexe II) chez l'homme (Au et Scheffler, 1998).

I.6. Régulation de la biogenèse et des fonctions mitochondriales

I.6.1. Le coactivateur PGC-1 α

Les coactivateurs de transcription sont des protéines essentielles à l'activation de l'expression des gènes. Ces corégulateurs ne se lient pas à l'ADN mais ils s'associent à des facteurs de transcription et servent de pont avec la machinerie basale de la transcription où ils sont impliqués dans le remodelage de la chromatine. PGC-1 α (ou peroxisome proliferator activated receptor γ coactivator 1 α) a été identifié à l'origine comme coactivateur du récepteur nucléaire PPAR γ (Puigserver et al., 1998). Ce coactivateur interagit avec divers facteurs de transcription tel que PPAR α , les récepteurs aux glucocorticoïdes (GR), le facteur de transcription hépatique (HNF4 α), le récepteur à l'œstrogène alpha (ERR α) et Foxo1 (Forkhead box O) (Puigserver et al., 2003; Vega et al., 2000; Yoon et al., 2001). Les différentes études portées sur PGC1- α l'ont décrit comme le principal régulateur de la biogenèse et des fonctions mitochondriales.

I.6.1.1. Structure

PGC-1 α est une protéine de 90 kDa qui appartient à une famille de coactivateurs comprenant aussi PGC-1 β et PRC (coactivateur apparenté à PGC-1 α ou PPAR γ related coactivator) et qui présentent entre eux un degré élevé de similarité des extrémités N- et C-terminale (Puigserver et Spiegelman, 2003). PGC-1 α a été identifié comme une protéine de 789 acides aminés. Sa partie N-terminale de 200 acides aminés contient un domaine d'activation de la transcription riche en acides aminés acides renfermant un motif LXXLL nécessaire pour l'interaction dépendante du ligand avec le récepteur à l'œstrogène (ER),

PPAR α , le récepteur de l'acide rétinoïque RXR α , et GR (Puigserver et Spiegelman, 2003). PGC-1 α utilise aussi des domaines différents du LXXLL pour interagir avec d'autres facteurs de transcription : un domaine entre 200 et 400 acides aminés qui interagit avec PPAR γ et NRF-1 (Wu et al., 1999b) et un domaine entre 400 et 500 qui interagit avec MEF2-C (Myocyte enhancer factor- 2C) (Michael et al., 2001). Chez l'homme et les rongeurs, PGC-1 α est présent dans le cœur, les muscles squelettiques, le rein, le foie, le pancréas et le cerveau. Il est également présent dans le tissu adipeux brun chez les rongeurs (Puigserver et al., 1998).

I.6.1.2. Fonctions

Chez les souris, au niveau du tissu adipeux brun, PGC-1 α contrôle la thermogénèse adaptative (définie comme la réponse à l'exposition au froid) en interagissant avec PPAR γ pour induire le gène *UCP-1* et en activant les gènes clés de la chaîne respiratoire mitochondriale (ATP synthase, COX II et COX IV). De plus, l'activation des récepteurs β -adrénergiques dans le tissu adipeux brun (BAT) en réponse à une exposition au froid conduit à l'activation de PGC-1 α qui induit la biogénèse mitochondriale. Ceci est accompagné par la dissipation de l'énergie produite par la mitochondrie sous forme de chaleur (Puigserver et al., 1998). Au niveau hépatique, chez les souris en état de jeûne, l'expression induite de PGC-1 α active le processus de la néoglucogénèse et inhibe la glycolyse induisant ainsi la production hépatique du glucose (Yoon et al., 2001). Dans les cellules musculaires C2C12, la surexpression de PGC-1 α entraîne une induction de l'expression de l'*UCP-2* favorisant le découplage suivi d'une augmentation de la consommation d'oxygène par la mitochondrie. Cette surexpression induit les gènes impliqués dans la phosphorylation oxydative et stimule la biogénèse mitochondriale en se liant à et en coactivant NRF-1 au niveau du promoteur du facteur de transcription mitochondrial TFAM, ce dernier régulant le processus de réplication/transcription de l'ADN mitochondrial (Wu et al., 1999b). L'implication de PGC-1 α dans le métabolisme des AG a été étudiée dans les myocytes cardiaques, les pré-adipocytes 3T3-L1 et les adipocytes blancs humains. En effet, l'expression de PGC-1 α dans ces cellules entraîne une augmentation du taux d'ARNm de la CPT-1 et de la MCAD (Lehman et al., 2000; Tiraby et al., 2003; Vega et al., 2000) et cette induction passe par l'interaction de PGC-1 α avec PPAR α ou ERR α selon les types cellulaires (Schreiber et al., 2003; Vega et al., 2000). PGC-1 α est également impliqué dans la voie de la néoglucogénèse. En effet, dans le foie de souris soumis au jeûne, PGC-1 α active les enzymes clés de cette voie, la phosphoénolpyruvate carboxykinase (PEPCK), la fructose-1,6-biphosphatase (F-1,6Bpase) et la glucose-6-phosphatase (G-6-Pase) (Yoon et al., 2001). PGC-1 α participe aussi à la

transition entre les types de fibres musculaires, la transdifférenciation des adipocytes, le transport du glucose dans les muscles et le contrôle de la sécrétion d'insuline dans le pancréas au cours du diabète de type 2 (Lin et al., 2002; Michael et al., 2001; Tiraby et al., 2003; Yoon et al., 2003).

Récemment, il a été décrit au niveau du tissu adipeux brun, que l'activation de PGC-1 α stimule la biogenèse du peroxyosome et induit la β -oxydation peroxyosomale (ACOX1 et PBE) d'une manière indépendante de PPAR α (Bagattin et al., 2010).

I.6.1.3. Mécanismes de régulation

I.6.1.3.1. Régulation de l'expression du gène PGC-1 α

Dans le muscle, après un exercice, la stimulation nerveuse induite par la signalisation du calcium active principalement deux protéines : la protéine kinase IV dépendante du Ca²⁺/calmoduline (CaMKIV) et la calcineurine (CnA). La CaMKIV active CREB qui se fixe sur l'élément de réponse à l'AMP-cyclique (CRE) au niveau du promoteur du gène PGC-1 α et induit ainsi son expression. De même, la CnA interagit et active MEF2C et MEF2D qui à leurs tours activent l'expression de PGC-1 α . Il est à noter que MEF2C et MEF2D sont 2 cibles de PGC-1 α permettant à ce dernier de s'autoréguler pour induire sa propre expression (Figure 18). L'activation de l'expression de PGC-1 α par CREB peut également emprunter la voie de la protéine kinase A (PKA). Un autre mécanisme de régulation a été décrit après un exercice dans le muscle impliquant la protéine P38MAPK qui active MEF2 et ATF2 induisant ainsi l'expression de. La protéine AMPK (AMP-Activated Protein Kinase), senseur de l'état énergétique de la cellule, est activée suite à l'augmentation du rapport AMP/ATP (Figure 18). Cette protéine induit l'activité de PGC-1 α par un mécanisme inconnu pour le moment, aboutissant à l'induction de la biogenèse et des fonctions mitochondriales. D'un autre côté, des biopsies de muscle squelettique effectuées sur des sujets sains ou des sujets présentant une insulino-résistance ont montré que l'insuline active la voie Akt qui phosphoryle et inhibe FoxO1 en l'excluant du promoteur de PGC-1 α ce qui diminue l'activité de ce dernier (Figure 18).

La voie PKA peut aussi activer P38MAPK conduisant à l'activation de l'expression PGC-1 α . Cette activation passe par le facteur de transcription ATF2. Un mécanisme identique a été décrit dans le foie à l'état de jeûne en réponse au glucagon ou à l'activation de PGC-1 α induisant la néoglucogenèse (Figure 18).

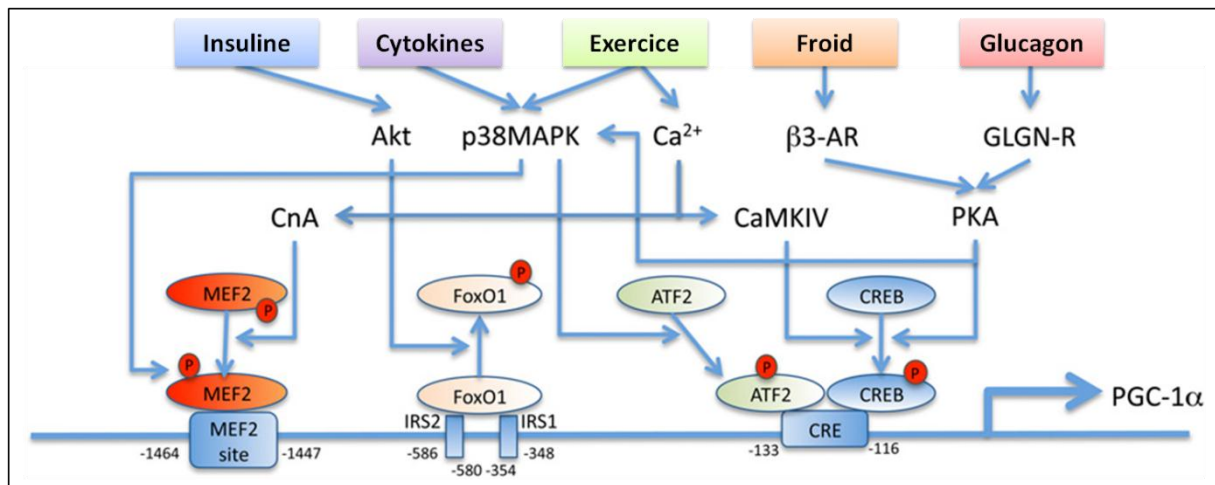


Figure 18. Schéma générale de la régulation de la transcription de PGC-1α. Schéma adapté de (Fernandez-Marcos et Auwerx, 2011).

I.6.1.3.2. Régulation de la protéine PGC-1 α

I.6.1.3.2.1. Par phosphorylation

En plus de son rôle dans l'induction de l'expression de PGC-1 α , l'AMPK active ce coactivateur par phosphorylation sur la thréonine-177 et la serine-538 favorisant ainsi la biogenèse mitochondriale (Jager et al., 2007). De même, l'insuline réduit aussi l'activité de PGC-1 α à travers la voie Akt qui phosphoryle et stabilise la protéine kinase Clk2 qui à son tour phosphoryle PGC-1 α au niveau la région riche en sérine et en arginine et réduit son activité réprimant ainsi la voie de la néoglucogénèse (Rodgers et al., 2010). Dans le muscle et en réponse aux cytokines (Figure 19), la P38MAPK régule aussi PGC-1 α par phosphorylation sur la thréonine T262 et la serine S265 augmentant son activité selon 2 mécanismes : (i) en augmentant sa durée de demi-vie et (ii) en perturbant l'interaction de PGC-1 α avec son corépresseur p160MBP (Fan et al., 2004; Puigserver et al., 2001). En état de stress oxydatif, une autre protéine phosphoryle PGC-1 α sur la thréonine T295 et inhibe son activité, la GSK3 β , mais la signification physiologique de cette inhibition n'est pas claire jusqu'à présent (Anderson et al., 2008). La serine/thréonine kinase, S6K1, une protéine appartenant à la famille Akt/PKB, est capable de phosphoryler PGC-1 α sur la serine S568 et S572 dans les hépatocytes de souris en état de jeûne. Cette phosphorylation inhibe l'activité de PGC-1 α et par la suite la voie de la néoglucogénèse en interférant au niveau de son interaction avec HNF-4 α , découplant ainsi le transport d'électrons au niveau de la mitochondrie et l'oxydation des acides gras (Figure 19) (Lustig et al., 2011). Récemment, une isoforme de PGC-1 α issue de l'épissage alternatif du gène, NT-PGC-1 α (appelée ainsi parce qu'elle lui manque la partie C-ter et le signal de localisation nucléaire NLS), a été décrite comme étant phosphorylée par PKA sur la serine S194 et S241 et la sérine S256. La phosphorylation de cette isoforme, impliquée dans l'import et l'export nucléaire, bloquerait l'export de PGC-1 α en bloquant son interaction avec son exportateur nucléaire CRM1 (Chang et al., 2010).

I.6.1.3.2.2. Par acétylation

La structure de coactivateur PGC-1 α renferme de nombreux résidus acétylés suggérant plusieurs mécanismes de régulations de l'activité de PGC-1 α par acétylation (Rodgers et al., 2005). Plusieurs acétyl transférases sont connues pour interagir avec PGC-1 α telle que p300, SRC-1, SRC-3 et GCN5 ainsi que des désacétylases comme SIRT1 (Canto et al., 2009; Coste et al., 2008; Lerin et al., 2006; Puigserver et al., 1999). SIRT1 et GCN5 sont 2 protéines sensibles aux variations de l'état énergétique dans la cellule. En effet, quand la demande cellulaire en énergie augmente, le taux de NAD⁺ ou le rapport NAD⁺/NADH augmente, ce qui

provoque la désacétylation de PGC1- α par SIRT1 et par conséquence, l'induction du métabolisme mitochondrial pour la production d'énergie dans le muscle squelettique ou bien pour l'induction de la voie de la néoglucogénèse dans le foie à l'état de jeûne (Canto et al., 2009; Rodgers et al., 2005). Contrairement à SIRT1, GCN5 et SRC-3 inhibent l'activité de PGC-1 α en acétylant ce dernier en condition d'excès caloriques (Figure 19) (Coste et al., 2008; Kelly et al., 2009).

I.6.1.3.2.2. Par ubiquitinylation

Le taux de PGC-1 α peut être régulé par dégradation protéasomale dans le noyau suite à la phosphorylation par GSK-3 β (Anderson et al., 2008). En effet, cette phosphorylation induit une E3 ubiquitine ligase, SCF^{Cdc4} (Skp1/Cullin/F-box-cell division control 4), qui se lie avec PGC-1 α activant ainsi sa dégradation au niveau du protéasome (Figure 19) (Olson et al., 2008).

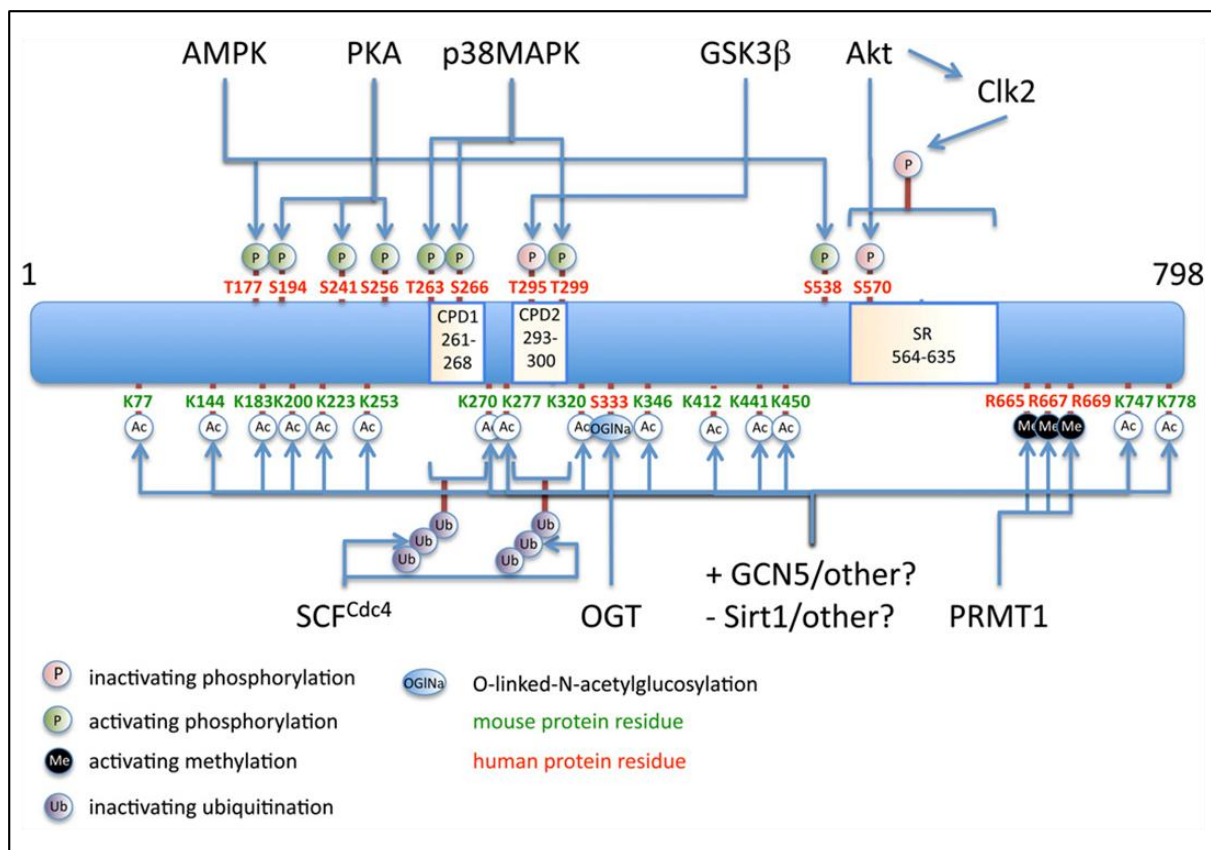


Figure 19. Modification post-traductionnelles de PGC-1 α . Schéma adapté de (Fernandez-Marcos et Auwerx, 2011).



Matériels et Méthodes

A. Tissus, lignées et culture cellulaire

A.1. Origine des tissus de souris *Acox1*^{-/-}, hACOX1 et sauvages

- Les tissus hépatiques utilisés au cours de ce travail proviennent du laboratoire du professeur JK.Reddy (Feinberg Medical School, Northwestern University, Chicago, Etats-Unis). Les foies ont été prélevés sur des souris âgées de 8 à 10 mois (Huang et al., 2011).
- Des fragments de tissu hépatique ont été immédiatement congelés dans l'azote liquide et stockés à -80°C. D'autres fragments ont servi à la préparation de mitochondries pour la mesure des activités des complexes respiratoires.

A.2. Origine des fibroblastes

Différentes lignées cellulaires de fibroblastes humains ont servi de modèle d'étude au cours de ce travail (Tableau 2).

Tableau 2. Liste des lignées de fibroblastes humaines.

*Au cours de ce travail, deux types de fibroblastes ont été utilisées : les fibroblastes contrôles provenant de patients sains (C1 à C4) et des fibroblastes de patients atteints de P-NALD (*ACOX1*^{-/-}, P3 à P11). Les fibroblastes proviennent soit de chez Coriell (Etats-Unis) soit du laboratoire du Pr. Ronald Wanders (Université d'Amsterdam, Pas-Bas).*

Fibroblastes humaines	Référence	Origine
Contrôle C1	GM3348	Coriell
Contrôle C2	C109	Wanders RJ, Amsterdam
Contrôle C3	C114	Wanders RJ, Amsterdam
Contrôle C4	C126	Wanders RJ, Amsterdam
<i>ACOX1</i> ^{-/-} P3	GM18346	Coriell
<i>ACOX1</i> ^{-/-} P4	GM18364	Coriell
<i>ACOX1</i> ^{-/-} P5	GM18365	Coriell
<i>ACOX1</i> ^{-/-} P6	11E1064	Wanders RJ, Amsterdam
<i>ACOX1</i> ^{-/-} P7	11E1065	Wanders RJ, Amsterdam
<i>ACOX1</i> ^{-/-} P8	11E1066	Wanders RJ, Amsterdam
<i>ACOX1</i> ^{-/-} P9	11E1067	Wanders RJ, Amsterdam
<i>ACOX1</i> ^{-/-} P10	03E0475	Wanders RJ, Amsterdam
<i>ACOX1</i> ^{-/-} P11	03E0476	Wanders RJ, Amsterdam

A.3. Conditions de culture des fibroblastes

Les cellules ont été cultivées dans du milieu DMEM avec du SVF 10%, du pyruvate de sodium 1 mM et des antibiotiques à 1% (pénicilline/Streptomycine), à 37°C, en atmosphère humide contenant du CO₂ à 5%. L'entretien a été réalisé en boîte de pétri de 50 cm² de surface d'adhérence, en changeant le milieu tous les 2-3 jours. Lorsque les cellules arrivaient à une confluence de 100%, elles sont lavées avec 6 ml de DPBS, puis trypsinées avec 1 ml d'une solution de trypsine 0,05 %/EDTA 0,02%. Les cellules sont alors reprises dans 9 ml de milieu frais avant d'être centrifugées à 200 g pendant 6 minutes.

B. Traitements appliqués sur les cellules

B.1. Traitement des cellules à l'acide cérotique (C26:0)

Les cellules ont étéensemencées dans des plaques de 24 puits à raison de 5x10⁴cellules/puits puis laissées adhérees dans un milieu DMEM avec du SVF 10%, du pyruvate de sodium 1 mM et des antibiotiques à 1% (pénicilline/Streptomycine) à 37°C sous atmosphère humide contenant du CO₂ à 5%. Après 24 heures d'incubation, les cellules sont lavées 2 fois avec du PBSIX puis mises en contact avec du milieu HAM-F10 frais avec des antibiotiques à 1% contenant ou non du C26:0 (Sigma) à 5 ou à 10 µM pendant 6, 12, 18, 24 et 48 heures. Les cellules sont ensuite lavées au PBSIX, trypsinées et le culot cellulaire obtenu, après centrifugation pendant 6 minutes à 200g,est conservé à -80°C. Après l'extraction des ARN totaux, le niveau d'expression des ARNm des cytokines inflammatoires et des isoformes de l'ACOX1 a été évalué par RT-qPCR (cf.Matériels et Méthodes G.1. Mesure de laquantité de transcrits).

La solution du C26:0 a été préparée en dissolvant le C26:0 cristallisé dans une solution d' α -cyclodextrine (Sigma) à 1mg/ml dans du milieu HAM-F10 avec des antibiotiques à 1%. La solution a été ensuite incubée dans un bain à ultrasons pendant 1 à 3 heures jusqu'à dissolution de la poudre.Le bain est refroidi par de la glace tout au long du processus. La solution est ensuite diluée à la concentration de 5µM et de 10 µM dans du milieu HAM-F10 avec des antibiotiques à 1% pour le traitement.

B.2. Traitement avec les inhibiteurs des voies de signalisation

Les cellules ont étéensemencées dans des plaques de 24 puits à raison de 5x10⁴cellules/puits puis laissées adhérees dans un milieu DMEM avec 10% SVF, 1 mM de pyruvate de sodium et des antibiotiques à 1% (pénicilline/Streptomycine) à 37°C sous

atmosphère humide contenant du CO₂ à 5%. Après 24 heures d'incubation, les cellules sont lavées 2 fois avec du PBS1X puis mise en contact avec du milieu DMEM frais avec 1 mM de pyruvate de sodium et 1% d'antibiotiques sans SVF contenant ou non séparément les inhibiteurs des voies de signalisation PD98059, U0126, SB 203580, SP600125 et le Z-VAD à 5 µM et 10 µM. L'incubation des cellules avec ces différents produits a été réalisée pendant 24 heures à 37°C sous atmosphère humide contenant du CO₂ à 5%. Le milieu de culture est ensuite récupéré et après deux lavage avec du PBS1X, les cellules ont été trypsinées puis lysées. Finalement le milieu de culture ainsi que le lysat cellulaire sont analysés en cytométrie en flux pour le dosage du taux des interleukines (voir matériels et méthodes [H. Cytométrie en flux](#)).

Inhibiteur	Concentrations utilisées	Mécanismes d'actions
PD98059	5 et 10 µM	Inhibiteur non compétitif de la MAPK kinase (MEK1 et MEK2)
U0126	5 et 10 µM	Inhibiteur non compétitif de la MAPK kinase (MEK1 et MEK2)
SB 203580	5 et 10 µM	Inhibiteur spécifique de la P38 MAP Kinase
SP600125	5 et 10 µM	Inhibiteur de Jun Kinase (JNK)
Z-VAD	5 et 10 µM	Inhibiteur des caspases 1,3,4 et 7

C. Mesure de l'activité enzymatique de l'ACOX1 par dosage fluorimétrique

C.1. Extraction des protéines

Le protocole d'extraction de protéines à partir des cellules en culture pour la mesure de l'activité enzymatique de l'ACOX1 est le suivant : les cellules d'une boîte confluente de 50 cm² sont lavées avec du PBS1X puis sont grattées à l'aide d'un racloir et reprises dans 200 µl de PBS1X. Les cellules sont lysées par 3 cycles de congélation/décongélation dans l'azote liquide et par sonication (5 cycles de 10 secs à 70W). L'extrait obtenu est centrifugé à 20000 g pendant 30 minutes. L'extrait brut obtenu est congelé à -80°C. La concentration en protéines totales des extraits cellulaires a été déterminée par la méthode de Bradford (BioRad Protein Assay, BioRad) en utilisant la SAB comme référence. Deux essais, de 2 et 5 µl, ont été réalisés pour chaque échantillon.

C.2. Mesure de l'activité enzymatique acyl-CoA oxydase 1

La mesure de l'activité enzymatique de l'ACOX1 a été réalisée par mesure de la fluorescence émise à 420 nm par un composé fluorescent excité à 310 nm. Ce composé

provient de la réaction, catalysée par une peroxydase, entre une molécule d' H_2O_2 produite lors de la réaction catalysée par l'ACOX1 et deux molécules d'acide homovanillique (Brocard et al., 1993). Dans un premier temps, une gamme étalon d' H_2O_2 de $0\mu\text{M}$ à $5\mu\text{M}$ a été réalisée en préparant un milieu réactionnel composé de tampon Tris 55 mM pH $8,3$, d'acide homovanillique 27 mM et de peroxydase HRP 1 mg/ml . La réaction est déclenchée par l'addition des solutions d' H_2O_2 de concentrations connues. Le volume réactionnel final est de $200\mu\text{l}$. Dans un deuxième temps, la mesure de l'activité ACOX1 a été réalisée en utilisant le même milieu réactionnel que précédemment dans lequel est ajouté du palmitoyl-CoA à $50\mu\text{M}$ (substrat de l'ACOX1). La réaction est déclenchée par l'addition de $10\mu\text{l}$ d'extrait cellulaire. La fluorescence est mesurée grâce à un fluorimètre à plaques (FLx 800, Bio-Tek instruments) thermostaté à 30°C . Le temps de lecture est de 13 min . Pour chaque réaction, un blanc ainsi qu'un témoin positif (acyl-CoA oxydase d'*Arthrobacter*, réf. A2167, Sigma-Aldrich) sont réalisés en parallèle dans les mêmes conditions.

D. Mesure de l'activité enzymatique des complexes de la chaîne respiratoire mitochondriale par dosage spectrophotométrique

D.1. Préparation des mitochondries de foies de souris et homogénéisation des cellules

Les mitochondries de foie de souris ont été préparées selon la méthode de Fleischer et coll.(Fleischer et Kervina, 1974).

Le tampon (tampon A) utilisé pour homogénéiser les mitochondries est commun au dosage de tous les complexes de la chaîne respiratoire. Sa composition est la suivante :

Réactifs	Concentration finale
Saccharose (Fluka)	250 mM
Tris-base (Sigma-Aldrich)	20 mM
EDTA (Sigma-Aldrich)	2 mM
BSA (Sigma-Aldrich)	1 mg.ml^{-1}

Le pH du tampon A est ajusté à $7,2$ avec du HCl 5N et le volume est complété à 100 ml avec de l'eau distillée.

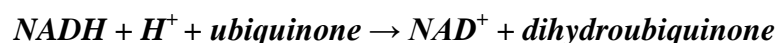
D.2. Réactifs

Réactifs	Concentrations	Solvants	Remarques
Tampon KH₂PO₄ pH 7,4 (Euromedex)	100 mM	Eau	Ajuster le pH avec du KOH 5N
Tampon KH₂PO₄ pH 7,8 (Euromedex)	20 mM	Eau	Ajuster le pH avec du KOH 5N
Tampon KH₂PO₄ pH 6,5 (Euromedex)	100 mM	Eau	Ajuster le pH avec du KOH 5N
Tampon Tris pH 8,1 (Euromedex)	1 M	Eau	Ajuster le pH avec du HCl 5N
Ubiquinone-1 (Sigma)	2,5 mM	Ethanol	
NADH, H⁺ (Euromedex)	15 mM	Eau	Préparation à l'abri de la lumière
Roténone (Sigma)	2,5 mM	Ethanol/DMSO (1:1)	Inhibiteur du complexe I
Azide de sodium (NaN ₃) (Sigma)	1 M	Eau	Inhibiteur du complexe IV
Cyanure de potassium (KCN) (Fluka)	0,5 M	Eau	Inhibiteur du complexe IV
Acide succinique (pH 7) (Euromedex)	400 mM	Eau	Ajuster le pH avec du KOH 5N
EDTA (pH 7) (Euromedex)	20 mM	Eau	Ajuster le pH avec du KOH 5N
BSA (Euromedex)	50 mg/ml	Eau	Sans acides gras
Dichlorophénolindophénol (DCPIP)	4 mM	Eau	Préparation au moment du dosage
Triton X-100 (Euromedex)	10%	Eau	Incubation 1h à 37°C avant le dosage
Antimycine A (Sigma)	1 mg/ml	Ethanol	Inhibiteur du complexe III
Thénoltrifluoroacétone (Sigma)	40 mM	Ethanol	
Cytochrome c oxydé (Sigma)	1 mM		Préparation au moment du dosage
Décylubiquinol	25 mM		Voir préparation Complexe III
Laurylmaltoside (Sigma)	125 mM	Eau	
Cytochrome c réduit (Sigma)	220 µM	DTT	Préparation à l'abri de la lumière (Voir préparation Complexe III)
Acide 5,5'-dithiobis 2-nitrobenzoïque (DTNB)	1 mM	Tris 1M pH 8,1	Préparation à l'abri de la lumière au moment du dosage
Oxaloacétate	10 mM	Eau	
Acétyl-CoA (Sigma)	15 mM	Eau	

D.3. Complexe I :NADH-Coenzyme Q oxydoréductase

D.3.1. Principe

La technique de mesure de l'activité du complexe I a été adaptée à partir de celle décrite par Kuznetsov et Gnaiger (Mitochondrial Physiology Network 8.15, 2003). Le complexe I catalyse la réaction suivante :



Au cours de cette réaction, le NADH qui absorbe la lumière à 340 nm est oxydé en NAD⁺ (quin'absorbe pas la lumière à cette longueur d'onde) et la diminution de l'absorbance du NADH à 340 nm sera proportionnelle à l'activité du complexe I.

D.3.2. Préparation de la suspension cellulaire

Les cellules en culture, arrivant à confluence, sont trypsinées et le culot secs contenant au moins 2×10^6 de cellules est congelé à -80°C dans un tube eppendorf. Avant la réalisation du dosage, le culot cellulaire est décongelé puis repris par un faible volume de tampon A à raison de 50 μl par 1×10^6 de cellules. Les cellules sont ensuite lysées par un cycle de congélation/décongélation dans l'azote liquide. La suspension cellulaire est ensuite centrifugée à 16 000 g pendant 30 secondes. Une fois le surnageant éliminé, le culot est repris par un volume plus important de tampon A (250 μl pour 1×10^6 de cellules de départ) pour faciliter l'étape de sonication. La suspension est soumise à 6 cycles de sonication (chaque cycle est de 30 secondes, 70W) avec 30 secondes de repos entre chaque cycle. Il est indispensable de garder le tube contenant la suspension cellulaire dans un bain d'eau et de glace pendant la sonication pour éviter le réchauffement du tube et l'inactivation des enzymes par protéolyse. La sonication améliore l'accessibilité au complexe I au cours du dosage.

D.3.3. Mesure de l'activité du complexe I par spectrophotométrie

La mesure de l'activité du complexe I doit être réalisée juste après la préparation des extraits cellulaires. Pour réaliser le dosage, un mélange réactionnel est préparé :

Réactifs	Volume pour 1 essai	Concentration finale
KH ₂ PO ₄	815 μl	80 mM
Ubiquinone-1	40 μl	0,1 mM
NaN ₃	2 μl	2 mM
KCN	2 μl	1 mM
Eau distillée	6 μl	-

Ce mélange est incubé à 37°C pendant au minimum 5 minutes avant le dosage. Le volume total réactionnel est de 1 ml. Cent vingt cinq microlitres de la suspension cellulaire sont ajoutés à 865 μl de mélange réactionnel et la réaction est déclenchée par l'ajout de 10 μl de NADH à 15 mM. Le mélange est ensuite rapidement transféré dans une microcuve thermostatée à 37°C et la cinétique de diminution de l'absorbance à 340 nm est suivie pendant

3 minutes. Sans stopper la lecture, 4 µl de roténone 0,5 mM sont ajoutés dans la microcuve et l'absorbance est suivie pendant 2 minutes supplémentaires. Un blanc est réalisé par l'ajout de 865 µl du mélange réactionnel à 125 µl de suspension cellulaire et l'addition de 10 µl d'eau.

D.3.4. Calcul de l'activité du complexe I

L'activité enzymatique (AE) du complexe I est calculée en utilisant la formule suivante :

$$AE = \frac{\Delta A(-R) - \Delta A(+R)}{\epsilon \cdot l \cdot S n_{NADH}}$$

$\Delta A(-R)$: variation d'absorbance par minute avant l'addition de la roténone.

$\Delta A(+R)$: variation d'absorbance par minute après addition de la roténone.

l : longueur de traversée du faisceau optique en cm soit 1cm.

ϵ_{NADH} : coefficient d'extinction molaire du NADH à 340 nm et pH 7,4, soit 6,22 en $mM^{-1}.cm^{-1}$.

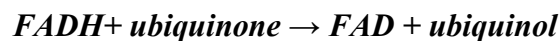
$S n_{NADH}$: nombre stœchiométrique du NADH dans l'équation de la réaction, soit 1.

L'activité enzymatique est exprimée en $mM.min^{-1}$ et en unité enzymatique ($\mu mol.min^{-1}$).

D.4. Complexe II : Succinate ubiquinone réductase

D.4.1. Principe

La technique de mesure de l'activité du complexe II a été adaptée à partir de celle décrite par James et coll., (James et al., 1996). Le complexe II catalyse la réaction suivante :



Au cours de cette réaction, le succinate réduit l'ubiquinone en ubiquinol. Le dosage du complexe II fait intervenir une deuxième réaction impliquant de dichlorophénolindophénol (DCPIP), un composé de couleur bleue qui absorbe à 600 nm, qui va être réduit par l'ubiquinol formé lors de la première réaction. Le DCPIP devient incolore et n'absorbe plus de lumière à 600 nm. Le dosage du complexe II consiste alors à suivre la diminution de l'absorbance du DCPIP à 600 nm, celle-ci étant proportionnelle à la quantité d'ubiquinol formé.

D.4.2. Préparation de la suspension cellulaire

Les cellules en culture, arrivant à confluence, sont trypsinées et le culot sec contenant au minimum 2×10^6 de cellules est congelé à -80°C . Avant la réalisation du dosage, le culot cellulaire est décongelé puis repris par du tampon A (composition cf. dosage de l'activité du complexe I) à raison de $50 \mu\text{l}$ par 1×10^6 de cellules. Les cellules sont ensuite lysées par un cycle de congélation/décongélation dans l'azote liquide. La suspension cellulaire est ensuite centrifugée à 16000 g pendant 30 secondes. Une fois le surnageant éliminé, le culot est repris par du tampon A ($50 \mu\text{l}/1 \times 10^6$ de cellules).

D.4.3. Mesure de l'activité du complexe II par spectrophotométrie

La mesure de l'activité du complexe II doit être réalisée juste après la préparation des cellules. Pour réaliser le dosage, un mélange réactionnel est préparé :

Réactifs	Volume pour 1 essai	Concentration finale
KH_2PO_4 pH 7,5	$500 \mu\text{l}$	50 mM
Acide succinique	$50 \mu\text{l}$	20 mM
Roténone	$20 \mu\text{l}$	2 mM
EDTA	$5 \mu\text{l}$	0,1 mM
KCN	$4 \mu\text{l}$	2 mM
BSA	$20 \mu\text{l}$	$1 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$
Triton X-100	$2 \mu\text{l}$	0,02%
Antimycine A	$4 \mu\text{l}$	$4 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$
Eau distillée	$334 \mu\text{l}$	-

Ce mélange est incubé pendant 5 minutes à 37°C avant le dosage. Le volume total réactionnel est de 1 ml. Pour la mesure de l'activité du complexe II, $16 \mu\text{l}$ de DCPIP et $25 \mu\text{l}$ de suspension cellulaire ($0,5 \times 10^6$ cellules) sont ajoutés au $939 \mu\text{l}$ de mélange réactionnel et la réaction est déclenchée par l'ajout de $20 \mu\text{l}$ d'ubiquinone à 2,5 mM. Le mélange est ensuite rapidement transféré dans une microcuve thermostatée à 37°C et la cinétique de diminution de l'absorbance du DCPIP à 600 nm est suivie pendant 3 minutes. Sans stopper la lecture, $5 \mu\text{l}$ de thénoltrifluoroacétone 40 mM sont ajoutés dans la microcuve et l'absorbance est suivie

pendant 2 minutes supplémentaires. Un blanc est réalisé par l'addition de 16 µl de DCPIP, de 25 µl de la suspension cellulaire et de 20 µl d'eau distillée à 939 µl de mélange réactionnel.

D.4.4. Calcul de l'activité du complexe II

L'activité enzymatique (AE) du complexe II est calculée en utilisant la formule suivante :

$$AE = \frac{\Delta A(-T) - \Delta A(+T)}{\varepsilon \cdot l \cdot S_{n_{DCPIP}}}$$

$\Delta A(-T)$: variation d'absorbance par minute avant l'addition du thénoltrifluoroacétone.

$\Delta A(+T)$: variation d'absorbance par minute après addition du thénoltrifluoroacétone.

l : longueur de traversée du faisceau optique en cm soit 1cm.

ε_{DCPIP} : coefficient d'extinction molaire du DCPIP à 600 nm, soit 19,1 en $\text{mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$.

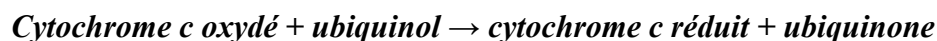
$S_{n_{DCPIP}}$: nombre stœchiométrique du DCPIP dans l'équation de la réaction, soit 1.

L'activité enzymatique est exprimée en $\text{mM} \cdot \text{min}^{-1}$ et en unité enzymatique ($\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1}$).

D.5. Complexe III : Ubiquinol cytochrome c réductase

D.5.1. Principe

La technique de mesure de l'activité du complexe III a été adaptée à partir de celle décrite par Rustin et *coll.*, (Rustin et al., 1993). Le complexe III catalyse la réaction suivante :



Au cours de cette réaction, le cytochrome c réduit absorbe la lumière à 550 nm. Le dosage du complexe III consiste alors à suivre l'apparition de la forme réduite du cytochrome c par mesure de l'augmentation de l'absorbance à 550 nm, celle-ci étant proportionnelle à l'activité du complexe III.

D.5.2. Préparation du Décylubiquinol

Le décylubiquinol est préparé à partir de décylubiquinone, un analogue de l'ubiquinone. Pour cela, 20 mg de décylubiquinone (Enzo life sciences) sont dissous dans 4,77 ml d'éthanol

absolu pour obtenir une concentration de 23 mM. Le spectre de l'ubiquinone oxydée est réalisé en diluant 10 µl d'ubiquinone dans 1 ml d'éthanol et en lisant l'absorbance entre 250 et 350 nm. Un pic à 275 nm doit apparaître avec une absorbance d'environ 2,6.

A partir de ce moment, toutes les étapes doivent être réalisées en plaçant la solution de décyubiquinone à l'obscurité dans un tube entouré de papier d'aluminium.

La solution de décyubiquinone est réduite par l'addition de quelques cristaux de borohydrure de sodium (Sigma Aldrich, Lyon, France) puis de 30 µl d'acide chlorhydrique fumant (à 37%). Le tube est bouché avec un parafilm percé d'un trou pour permettre aux gaz produits par la réaction de s'échapper. Lorsque la solution est totalement décolorée, elle est centrifugée pendant 15 minutes à 4000 rpm. Le surnageant est réparti dans deux tubes en verre dans lesquels sont ajoutés 2,5 ml de tampon KH_2PO_4 100 mM / Sorbitol 250 mM pH 7,4 et 1 ml de cyclohexane. Les tubes sont agités fortement puis bouchés avec un parafilm percé d'un trou. Les deux solutions sont regroupées dans un même tube et centrifugées pendant 10 minutes à 1000g. La phase supérieure (organique) est recueillie dans un tube et mise à l'obscurité. L'extraction de la phase inférieure par 1 ml de cyclohexane et centrifugation à 1000g pendant 10 minutes est répétée deux fois. Les phases organiques sont regroupées et évaporées sous azote. Le tube contenant l'extrait sec est pesé sur une balance de précision puis repris par 2 ml de cyclohexane qui sont repartis en aliquotes par 50 µl dans des tubes en verres. Les tubes sont alors mis à évaporer sous azote puis bouchés rapidement et mis à l'obscurité à -80°C . Le tube ayant contenu l'extrait sec est pesé à nouveau et son poids est retranché à celui en présence de l'extrait sec, ce calcul permet de déduire la masse de décyubiquinol contenu dans chaque tube. Le décyubiquinol ainsi préparé peut être conservé pendant 3 mois à -80°C . Le jour de la manipulation, un certain volume d'éthanol absolu est ajouté à un tube. Le volume d'éthanol sera calculé en fonction de la masse de décyubiquinol contenu dans les tubes de manière à obtenir une concentration de 25 mM.

D.5.3. Préparation de la suspension cellulaire

Les cellules en culture, arrivant à confluence, sont trypsinées et le culot secs contenant au moins 2×10^6 de cellules est congelé à -80°C . Avant la réalisation du dosage, le culot cellulaire est décongelé puis repris par du tampon A (composition cf. dosage de l'activité du complexe I) à raison de 50 µl par 1×10^6 de cellules. Les cellules sont ensuite lysées par un cycle de congélation/décongélation dans l'azote liquide. La suspension cellulaire est ensuite

centrifugée à 16000 g pendant 30 secondes. Une fois le surnageant éliminé, le culot est repris par du tampon A (50 µl/1x10⁶ de cellules).

D.5.4. Mesure de l'activité du complexe III par spectrophotométrie

La mesure de l'activité du complexe III doit être réalisée juste après la préparation des cellules. Pour réaliser le dosage, un mélange réactionnel est préparé :

Réactifs	Volume pour 1 essai	Concentration finale
KH ₂ PO ₄ pH 7,8	500 µl	10 mM
Roténone	10 µl	5 µM
EDTA	100 µl	2 mM
KCN	0,5 µl	240 µM
BSA	20 µl	1 mg.ml ⁻¹
Cytochrome c oxydé	40 µl	40 µM
Eau distillée	318,5 µl	

Ce mélange est incubé pendant 5 minutes à 37°C avant le dosage. Le volume total réactionnel est de 1 ml. Pour la mesure de l'activité du complexe III, deux séries de tubes sont réalisées, l'une constituée de 5 µl de suspension cellulaire (0,5x10⁶ cellules), de 4 µl d'antimycine A (1mg/ml) et de 989 µl du mélange réactionnel et l'autre contenant 5 µl de suspension cellulaire (0,5x10⁶ cellules), de 4 µl d'eau distillée et de 989 µl du mélange réactionnel. La réaction est déclenchée par l'ajout de 2 µl de décyubiquinone à 25 mM. Ce mélange est incubé pendant 2 minutes à 37°C. Le mélange est ensuite rapidement transféré dans une microcuve thermostatée à 37°C et la cinétique d'augmentation de l'absorbance du cytochrome c réduit à 600 nm est suivie pendant 5 minutes. Un blanc est réalisé par l'ajout de 991 µl de mélange réactionnel avec 4 µl d'antimycine A (1mg/ml) et 5 µl de la suspension cellulaire.

D.5.5. Calcul de l'activité du complexe III

L'activité enzymatique (AE) du complexe III est calculée en utilisant la formule suivante :

$$AE = \frac{\Delta DO(-A) - \Delta DO(+A)}{\epsilon_{\text{cytc}} \cdot l \cdot Sn_{\text{cytc}}}$$

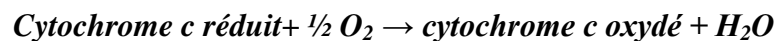
- $\Delta A(-A)$: variation d'absorbance par minute avant addition d'antimycine A.
- $\Delta A(+A)$: variation d'absorbance par minute après addition d'antimycine A.
- l : longueur de traversée du faisceau optique en cm soit 1cm.
- ϵ_{cytc} : coefficient d'extinction molaire du cytochrome c à 550 nm et pH 7,8, soit 18,5 en $\text{mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$.
- Sn_{cytc} : nombre stœchiométrique du DCPIP dans l'équation de la réaction, soit 1.

L'activité enzymatique est exprimée en $\text{mM} \cdot \text{min}^{-1}$ et en unité enzymatique ($\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1}$).

D.6. Complexe IV: Cytochrome c oxydase

D.6.1. Principe

Le complexe IV catalyse la réaction suivante :



Le cytochrome c réduit absorbe la lumière à 550 nm. Le dosage du complexe IV consiste alors à suivre la diminution de l'absorbance du cytochrome c réduit à 500 nm, celle-ci étant proportionnelle à l'activité de ce complexe.

D.6.2. Préparation du Cytochrome c réduit 220 μM

Une masse de 2,7 mg de cytochrome c (Sigma) est dissoute dans 1 ml d'eau distillée. Pour réduire le cytochrome c, 5 μl d'une solution de dithiothréitol (DTT) 0,1 M sont ajoutés à la solution de cytochrome c pour avoir une concentration finale de DTT de 0,5 mM. Les 2 réactifs sont bien mélangés et incubés pendant 15 minutes à température ambiante et à l'abri de la lumière. Quand la solution vire de la couleur rouge-orangé sombre à la couleur rouge-rose pale, le rapport des absorbances à 550 et à 565 nm (A_{550}/A_{565}) est mesuré. Ce rapport doit être compris entre 10 et 20 indiquant la réduction du cytochrome c. Un rapport inférieur à 10 signifie que le cytochrome c n'est pas suffisamment réduit et la préparation devrait être recommencée.

D.6.3. Préparation de la suspension cellulaire

Les cellules en culture, arrivant à confluence, sont trypsinées et le culot sec contenant au minimum 2×10^6 de cellules est congelé à -80°C . Avant la réalisation du dosage, le culot

cellulaire est décongelé puis repris par du tampon A (composition cf. dosage de l'activité du complexe I) à raison de 50 μl par 1×10^6 de cellules.

D.6.4. Mesure de l'activité du complexe IV par spectrophotométrie

La mesure de l'activité du complexe IV doit être réalisée juste après la préparation des cellules. Pour réaliser le dosage, un mélange réactionnel est préparé :

Réactifs	Volume pour 1 essai	Concentration finale
KH_2PO_4 pH6,5	200 μl	20 mM
BSA	20 μl	1 $\text{mg} \cdot \text{ml}^{-1}$
Cytochrome c réduit	68,5 μl	15 μM
Eau distillée	636,5 μl	

Ce mélange est incubé pendant au moins 5 minutes avant le dosage à 37°C . Le volume total réactionnel est de 1 ml. Pour la mesure de l'activité du complexe, 5 μl la suspension cellulaire ($0,5 \times 10^6$ cellules) sont ajoutés à 975 μl du mélange réactionnel et la réaction est déclenchée par l'ajout de 20 μl de laurylmaltoside à 125 mM. Le mélange est ensuite rapidement transféré dans une microcuve thermostatée à 37°C et la cinétique de diminution de l'absorbance du cytochrome c réduit à 550 nm est suivie pendant 3 minutes. Un blanc est réalisé par l'ajout de 5 μl de la suspension cellulaire ($0,1 \times 10^6$ cellules) et de 20 μl d'eau distillée à 975 μl du mélange réactionnel.

D.6.5. Calcul de l'activité du complexe IV

L'activité enzymatique (AE) du complexe IV est calculée en utilisant la formule suivante :

$$AE = \frac{\Delta DO}{\epsilon_{\text{cytc}} \cdot l \cdot S_{\text{cytc}}}$$

ΔA : variation absorbance par minute mesurée pendant 3 minutes.

l : longueur de traversée du faisceau optique en cm soit 1cm.

ϵ_{cytc} : coefficient d'extinction molaire du cytochrome c à 550 nm et pH 7,8, soit 18,5 en $\text{mM}^{-1}.\text{cm}^{-1}$.

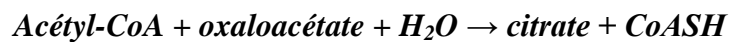
Sn_{cytc} : nombre stœchiométrique du DCPIP dans l'équation de la réaction, soit 1.

L'activité enzymatique est exprimée en $\text{mM}.\text{min}^{-1}$ et en unité enzymatique ($\mu\text{mol}.\text{min}^{-1}$).

D.7. Dosage de l'activité citrate synthase

D.7.1. Principe

L'enzyme citrate synthase est la première enzyme du cycle de Krebs, elle catalyse la réaction suivante :



Le dosage de l'activité de la citrate synthase fait intervenir l'acide 5,5'-dithiobis (2-nitrobenzoïque) ou DTNB. Le DTNB réagit avec les groupements thiols (SH) du CoASH formé dans la réaction et forme du CoATNB et du TNB. Le TNB est un composé qui absorbe la lumière à 412 nm. Le dosage de l'activité de la citrate synthase consiste alors à suivre la formation du TNB à 412 nm. L'augmentation de l'absorbance à cette longueur d'onde sera proportionnelle à l'activité de la citrate synthase.

D.7.2. Préparation de la suspension cellulaire

Les cellules en culture, arrivant à confluence, sont trypsinées et le culot sec contenant au minimum 2×10^6 de cellules est congelé à -80°C . Avant la réalisation du dosage, le culot cellulaire est décongelé puis repris par du tampon A (composition cf. dosage de l'activité du complexe I) à raison de 50 μl par 1×10^6 de cellules.

D.7.3. Mesure de l'activité citrate synthase par spectrophotométrie

La mesure de l'activité du complexe I doit être réalisée juste après la préparation des cellules. Pour réaliser le dosage, un mélange réactionnel est préparé :

Réactifs	Volume pour 1 essai	Concentration finale
DTNB	150 μl	150 μM
Acétyl-CoA	60 μl	300 μM
Oxaloacétate	50 μl	500 μM
Triton X-100	10 μl	0,1%
Eau distillée	725 μl	-

Ce mélange est incubé pendant au moins 5 minutes à 37°C avant le dosage. Le volume total réactionnel est de 1 ml. Pour la mesure de l'activité du complexe, 5 µl la suspension cellulaire ($0,5 \times 10^6$ cellules) sont ajoutés aux 995 µl du mélange réactionnel. Le mélange est ensuite rapidement transféré dans une microcuve thermostatée à 37°C et la cinétique de l'augmentation de l'absorbance du TNB à 412 nm est suivie pendant 90 secondes. Un blanc est réalisé par l'addition de 5 µl de tampon A à 995 µl de mélange réactionnel.

D.7.4. Calcul de l'activité de l'activité Citrate synthase

L'activité enzymatique (AE) citrate synthase est calculée en utilisant la formule suivante :

$$AE = \frac{\Delta DO}{\epsilon_{\text{TNB}} \cdot l \cdot \text{Sn}_{\text{TNB}}}$$

ΔA : variation d'absorbance par minute mesurée pendant 90 secondes.

l : longueur de traversée du faisceau optique en cm soit 1cm.

ϵ_{TNB} : coefficient d'extinction molaire du TNB à 412 nm, soit $13,6 \text{ en } \text{mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$.

Sn_{TNB} : nombre stœchiométrique du TNB dans l'équation de la réaction, soit 1.

L'activité enzymatique est exprimée en $\text{mM} \cdot \text{min}^{-1}$ et en unité enzymatique ($\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1}$).

D.8. Mesure de la β -oxydation peroxysomale

D.8.1. Principe

La mesure de la β -oxydation peroxysomale consiste à évaluer les capacités des cellules à cataboliser les acides gras à très longues chaînes tels que le C24:0 et le C26:0 radiomarqués via le système de β -oxydation peroxysomale, le seule capable de métaboliser ce type d'acides gras. La β -oxydation du C26:0 (American Radiolabeled Chemicals, ARC) par le peroxysome permet la production d'acétyl-CoA radioactif, des intermédiaires du cycle de Krebs radioactifs, de CO_2 radioactif libéré au cours du cycle de Krebs alors que le C24:0 produit à l'issue de la β -oxydation est non radioactif puisque la radioactivité (^{14}C) se trouve sur le carbone 1 du C26:0.

D.8.2. Protocole

D.8.2.1. Ensemencement des cellules dans les fioles

Les cellules sontensemencées dans des fioles en verre stériles à raison de 4×10^5 cellules/fiole dans du milieu DMEM/HAM-F12 (1/1) supplémenté en SVF5%. Les fioles sont fermées avec du papier aluminium et incubées pendant 48 heures à 37°C en atmosphère humide contenant 5% de CO₂. Le même nombre de cellules estensemencé dans des fioles qui seront destinées uniquement au dosage des protéines.

D.8.2.1.1. Préparation du mélange de β -oxydation

Les cellules sont par la suite mises en contact avec 8 μ M de C26:0 non radioactif et 4 μ M de C26:0 radioactif préalablement chauffés au bain-marie à 37°C. Ce mélange de C26:0 est préparé dans un tube en verre à l'aide de seringues Hamilton (les seringues sont lavées avec du HCl 0,1N puis avec de l'eau entre les différentes prises). Pour un point de mesure il faut ajouter 4 μ l de C26:0 non radioactif à 1 mM dans du chloroforme (4×10^{-9} mole) et 1,1 μ l de C26:0 radioactif à 1,818 mM dans du toluène (2×10^{-9} mole). Le mélange de C26:0 radioactif et non radioactif dans le tube en verre, est évaporé sous azote lentement, puis une solution d' α -cyclodextrine à 10 mg/ml est ajoutée. Le mélange est incubé dans un bain à ultrasons pendant une heure trente minutes puis 5 μ l de carnitine 200 mM sont ajoutés ainsi que 445 μ l de milieu HAM-F10 contenant d'HEPES 10 mM à pH 7,3. Des échantillons contrôles sont effectués dans les mêmes conditions en absence de cellules.

D.8.2.1.2. Initiation de la β -oxydation

Le mélange est de nouveau incubé dans un bain à ultrasons juste avant l'utilisation. Avant l'initiation de la β -oxydation, les cellules sont lavées 2 fois avec du PBS1X à l'aide d'une pipette pasteur puis un tube eppendorf sans bouchon est glissé à l'intérieur de la fiole. Sur les cellules, 500 μ l du mélange de C26:0 sont ajoutés avec une seringue Hamilton et la fiole est fermée hermétiquement. Ensuite, 500 μ l de NaOH 2M sont ajoutés dans le tube eppendorf placé dans la fiole avec une aiguille tout en perçant le bouchon, ce qui permettra de piéger le CO₂ radioactif. Les fioles sont ensuite incubées pendant deux heures au bain-marie à 37°C sous une légère agitation.

D.8.2.1.3. Contrôle de la solubilisation du C26:0

Un contrôle de la solubilisation du C26:0 dans le mélange de β -oxydation peut être réalisé en prélevant différents volumes (1 à 50 μ l) pour faire une gamme. Ces volumes sont mis dans des pots à scintillations contenant 5 ml de liquide de scintillation puis la radioactivité est comptée. Ceci permettra de vérifier la solubilisation du C26:0 dans le mélange de β -oxydation ainsi que de calculer l'activité spécifique globale (en pmol/dpm).

D.8.2.1.4. Arrêt de la β -oxydation

Après les deux heures d'incubation, la β -oxydation est arrêtée. Cela est réalisé en ajoutant sur les cellules 100 μ l de l'acide perchlorique 2,6N, en perçant le bouchon avec une seringue. Les fioles sont incubées pendant la nuit à 4°C ce qui permettra la captation du CO₂ par le NaOH.

D.8.2.1.5. Lyse des protéines

La lyse des protéines est effectuée sur les cellulesensemencées dans les fioles prévues à cet effet. Les cellules sont d'abord lavées 2 fois avec du PBS1X puis incubées pendant 30 minutes à 4°C avec 800 μ l de tampon de lyse (Triton X-1001%, Tris-HCl 50 mM pH8, NaCl 150 mM, phénylméthanesulfonylfluoride (PMSF) 100mM, et inhibiteurs de protéases (Roche)). Le lysat est ensuite centrifugé pendant 10 minutes à 1000 g. Le surnageant est prélevé dans un autre tube et les protéines sont dosées par la méthode de Bradford.

D.8.2.1.6. Comptage du CO₂ radioactif

Le bouchon de la fiole est enlevé et les 500 μ l de NaOH de l'ependorf sont prélevés et mis dans un tube à scintillation contenant 5 ml de liquide de scintillation Ultima Gold XR. Le tube est mélangé par retournement et la radioactivité est comptée pendant 3 minutes.

D.8.2.1.7. Hydrolyse des esters d'acides gras

Les esters-CoA et les esters de cholestérol, dans lesquels le C26:0 radioactif pourrait être présent, sont saponifiés dans le but de les rendre insolubles en phase aqueuse et pouvoir ainsi s'en débarrasser. Pour cela, les 600 μ l du mélange de β -oxydation avec l'acide perchlorique sont prélevés et centrifugés pendant 5 minutes à 420 g pour éliminer les débris cellulaires. Le surnageant est ensuite transféré dans un tube Sovirell de 13 ml et 200 μ l de NaOH 2N sont ajoutés donnant une couleur rose au surnageant. Le tube est entouré de parafilm puis mélangé au vortex pendant une minute (le pH doit monter à 14, indispensable pour la

saponification des esters-CoA) et incubé pendant 30 minutes à 50°C dans un bain-marie sous agitation. Ensuite, 150 µl d'acétate de sodium 1 M et 300 µl de H₂SO₄ 0,5 M sont ajoutés (le pH descend à 4). Le tube est entouré de parafilm et mélangé au vortex pendant une minute et le pH est vérifié (un ajout de H₂SO₄ est fait si nécessaire pour avoir un pH de 4).

D.8.2.1.8. Purification des fractions acido-solubles

Une fois le pH ajusté à 4,3 ml d'un mélange Méthanol/Chloroforme/Heptane (v/v : 1,41/1,25/1) sont ajoutés puis le tube est entouré de parafilm, mélangé au vortex pendant une minute et centrifugés pendant 5 minutes à 460 g. Après la centrifugation, 2 phases apparaissent dans le tube : une phase supérieure (aqueuse) contenant les composés acido-solubles et une phase inférieure (organique) contenant les acides gras, les 2 phases étant séparées par une interface blanchâtre composée de sels. La phase inférieure est prélevée avec une seringue de 1 ml et jetée. Un volume du mélange (Méthanol/Chloroforme/Heptane)/(Eau)(v/v : 3,25/1,25) est ajouté (volume équivalent à celui retiré). Le tube est de nouveau entouré de parafilm, mélangé au vortex pendant une minute et centrifugé pendant 5 minutes à 460 g. A partir de la phase supérieure obtenue (aqueuse) contenant les composés acido-solubles, 1 ml est prélevé avec une seringue et déposé dans un pot de scintillation contenant 10 ml de liquide de scintillation. Le contenu du pot est mélangé par retournement et la radioactivité est comptée pendant 3 minutes.

D.8.2.2. Calculs

A partir de l'étape de contrôle de la solubilisation de l'acide gras, une gamme étalon de la radioactivité (en dpm) est dressée en fonction du volume du mélange de β-oxydation prélevé (en µl).

En se servant de la gamme étalon, l'activité spécifique globale en pmol/dpm est calculée à partir : (i) la quantité d'acide gras radiomarqué ajoutée en pmol, (ii) la quantité d'acide gras non radiomarqué ajoutée en pmol et (iii) la quantité total d'acide gras ajoutée (radioactif et non radioactif) en pmol. La β-oxydation totale de l'acide gras est exprimée en pmol/h/mg de protéines totales. Elle additionne la radioactivité comptée au niveau gazeux et la radioactivité comptée au niveau des fractions acido-solubles.

E. Western blot

E.1. Préparation et dosage des extraits protéiques

Deux boîtes confluentes de 50cm² de chaque lignée, contenant au minimum 2x10⁶ cellules sont trypsinées puis centrifugées à 200g pendant 6 minutes à température ambiante. Le culot cellulaire est ensuite lavé 2 fois par 5ml de PBS1X et le culot est conservé à sec à -80°C. Au moment de la lyse, le culot est décongelé et lysé dans du tampon RIPA (Tris HCl 50 mM, NaCl 150 mM, EDTA 2 mM, NaF 50 mM, SDS 0,1%, désoxycholate de sodium 0,5%, NP40 1%, pH 8) contenant des inhibiteurs de protéases (Roche Applied Science) durant 30 minutes sur la glace. Le surnageant contenant l'extrait protéique est ensuite récupéré après centrifugation du lysat cellulaire à 20000g pendant 15 minutes à 4°C.

Les concentrations protéiques ont été mesurées selon la méthode de Bradford (BioRad Protein Assay, BioRad), en plaque 96 puits, basée sur des mesures d'absorbances à 595 nm, contre une gamme de BSA allant de 1 µg/puits à 10 µg/puits (le volume final de chaque essai est de 200 µl comprenant 40 µl de réactif de Bradford, 1 µl d'extrait protéique, 1 µl de RIPA, qsp 200 µl d'eau ultra pure). Le blanc a été fait sur 40 µl de Bradford auxquels sont ajoutés 1 µl de RIPA et 159 µl d'eau ultra pure).

E.2. Séparation des protéines en SDS-PAGE (PolyAcrylamid Gel Electrophoresis)

Trente microgrammes de protéines sont repris dans un tampon dénaturant (Tris HCl 250 mM, glycérol 40%, β-mercaptoéthanol 20%, SDS 10%, pH 6,8, quelques cristaux de bleu de bromophénol). Un gel de séparation de 8 à 14% (selon le poids moléculaire de la protéine cible) d'acrylamide/bisacrylamide (rapport :37,5/1) et d'épaisseur 1 à 1,5 mm est d'abord coulé puis un gel de concentration de 4% est coulé dans un système d'électrophorèse MiniPROTEAN (BioRad). Les trente microgrammes de protéines sont déposés et concentrés dans le gel de 4% (Tris HCl 125 mM, SDS 0,1%, acrylamide/bisacrylamide 4%, pH6,8) à 70V, puis séparés à 120V dans le gel de séparation (Tris HCl 375 mM, SDS 0,1%, acrylamide/bisacrylamide 8 à 14%, pH8,8). Après leur séparation, les protéines sont transférées sur membrane PVDF ou nitrocellulose (Biorad) en milieu liquide dans un tampon de transfert Tris/glycine/acide borique sous l'action d'un champ électrique de 50V pendant une à deux heures. Les membranes obtenues sont ensuite incubées durant une heure ou sur la nuit sous agitation dans une solution de saturation PBS1X Tween-20 0,1% à laquelle sont ajoutés du lait délipidées 5% ou de la BSA 5%. Les membranes sont ensuite incubées avec les anticorps primaires, dirigés spécifiquement contre les protéines étudiées diluées et incubées

dans une solution de PBS1X Tween-20 0,1%, de lait délipidé 5% ou de BSA 5% sur la nuit à 4°C sous agitation. Le lendemain, les membranes sont rincées trois fois pendant 5 minutes à chaque fois avec du PBS1X puis incubées pendant 1 heure en présence de l'anticorps secondaire couplé à la peroxydase HRP (Santa Cruz) dilué au 1/10000 dans PBS1X tween-20 0,1% lait 5%. Enfin, les membranes sont révélées par chimioluminescence en plaçant deux à trois films hyper sensibles (Amersham) sur la membrane qui a été incubée pendant une minute avec un substrat à base de luminol (Santa Cruz). Le temps d'exposition du film varie en fonction de signal obtenu de 1 à 30 minutes. Les films sont finalement révélés par des passages successifs dans une solution de révélateur (Kodak) puis rincés à l'eau puis dans une solution de fixateur (Kodak).

Il est possible sous certaines conditions, de révéler plusieurs protéines sur la même membrane (cas de la β -actine par exemple pour normaliser le signal). Dans ce cas, les membranes déjà utilisées, sont incubées ainsi avec un tampon acide de «stripping» (glycine-HCl 25mM, SDS 1%, pH2)(permettant de dissocier l'anticorps primaire de son antigène) pendant 30 minutes à température ambiante sous agitation. Après trois lavages de 10 minutes dans du PBS1X tween-20 0,1%, les membranes sont à nouveau saturées pour y être incubées de nouveau avec d'autres anticorps primaires.

F. Immunofluorescence

Les cellules arrivées à confluence sont trypsinées puisensemencées en raison de 50000 cellules /puits dans des plaques 6 puits contenant chacun une lamelle ronde pendant 24 h. Les cellules sont ensuite rincées 3 fois au PBS1X puis fixées au paraformaldéhyde (4%) pendant 15 minutes à température ambiante. Après deux lavages au PBS1X, les cellules sont perméabilisées pendant 10 minutes avec une solution PBS1X Triton X-1000,2%. Elles sont ensuite saturées après 2 lavages au PBS1X avec une solution PBS1X BSA 0,5% pendant 10 minutes et incubées avec un anticorps primaire déposé délicatement sur la lamelle (les anticorps primaire et secondaire sont dilués à la concentration voulue dans une solution de PBS1X BSA 1%) pendant 30 min à température ambiante. Les cellules sont alors lavées 3 fois avec du PBS1X et les cellules sont incubées à l'obscurité pendant 1 heure avec l'anticorps secondaire fluorescent. Une fois l'incubation terminée, 3 lavages au PBS1X sont nécessaires et les cellules sont contre-colorées avec du Hoechst pendant 10 minutes à température ambiante (colorant spécifique des noyaux cellulaires, excitation à 360nm et émission à 470nm, 1 μ g/ml). Finalement, les cellules sont lavées 2 fois au PBS1X et les lamelles sont montées sur lames

avec du « Fluorescent mounting medium » (Dako Cytomation) et laissées à sécher une nuit à 4°C. Les lames sont visualisées avec un microscope à fluorescence (AxioSkope, Zeiss).

Les anticorps primaires utilisés sont dilués à la concentration suggérée par le fournisseur. Les anticorps secondaires (Invitrogen) sont marqués à l’Alexa Fluor 488 nm vert (colorant fluorescent, excitation à 488 nm et émission à 520 nm) et/ou à l’Alexa Fluor 594 nm rouge (colorant fluorescent, excitation à 590 nm et émission à 617 nm).

G. RT-QPCR

G.1. Mesure de la quantité de transcrits

G.1.1. Extraction d’ARN totaux à partir de tissus

L’extraction des ARN totaux des tissus a été réalisée au moyen du kit d’extraction RNeasy de QIAGEN. Un échantillon de tissu (foie) est pesé très précisément (environ 30mg), puis placé dans un tube eppendorf de 2mL contenant 300µL de tampon de lyse RLT. Les échantillons sont rapidement broyés puis centrifugés à 12000g pendant 3 minutes à 4°C. La phase supérieure qui correspond à la phase aqueuse contenant les ARN est récupérée et transférée sur la colonne. La colonne est centrifugée puis soumise à une étape de lavage avec du tampon RW1. La colonne est de nouveau centrifugée et une étape de digestion à la DNase est ajoutée en incubant la colonne avec de la DNase (Qiagen) diluée dans du tampon RDD pendant 15 minutes à température ambiante. Les ARN sont précipités grâce à l’ajout de 300µL d’éthanol 70%. Les échantillons sont rincés puis élués de la colonne au moyen respectivement, de tampon RW1 et de tampon RPE. La colonne est transférée dans un tube Eppendorf stérile, les ARN sont élués avec 30 µl de H₂O « RNase-free ».

G.1.2. Extraction d’ARN totaux à partir de cellules

L’extraction des ARN totaux des tissus a été réalisée au moyen du kit d’extraction RNeasy de QIAGEN. Environ 1 à 2x10⁶ cellules en culture sont trypsinées et le culot secs est congelé à -80°C. Au moment de l’extraction, les culots décongelés sont repris par 315 µl de tampon RLT et 25 µl de β-mercaptoéthanol (Invitrogen) et mélangés avec une seringue pour bien lyser les cellules. Après, 350 µl d’éthanol 70% sont ajoutés et mélangés pour précipiter les ARN et les 700 µl sont alors transférés sur colonne RNeasy Spin. La colonne est centrifugée puis suivie d’une étape de lavage avec du tampon RW1. La colonne est de nouveau centrifugée et une étape de digestion à la DNase est ajoutée en incubant la colonne avec de la DNase (Qiagen) diluée dans du tampon RDD pendant 15 minutes à température

ambiante. Les échantillons sont rincés puis élués de la colonne au moyen de tampon RW1 puis de tampon RPE. La colonne est transférée dans un tube Eppendorf stérile, les ARN sont élués avec 30 µl de H₂O « RNase-free ».

La qualité des ARN purifiés a été vérifiée par analyse électrophorétique sur gel d'agarose 1 % préparé dans le tampon MOPS (MOPS ou acide 3-N-morpholino-propane sulfonique 20 mM, acétate de sodium 5 mM, EDTA 1 mM, pH 7) puis les échantillons sont chauffés à 70°C pour dénaturation. Les ARN sont visualisés sur gel après coloration au BET et exposition sur table UV.

G.1.3. Dosage des ARN totaux

Les ARN totaux extraits sont dosés par spectrophotométrie avec un spectrophotomètre UV1800 Shimadzu. La mesure de l'absorbance est effectuée à un intervalle allant de 240 à 320 nm de longueur d'onde avec 260 nm correspondant à l'absorption maximale des acides nucléiques. Une unité d'absorbance à 260 nm correspond à 40 µg d'ARN totaux/ml.

G.2. Transcription inverse

La transcription inverse est la synthèse d'ADN complémentaire (ADNc) monobrin à partir des ARN totaux extraits. Le principe repose sur l'utilisation d'oligo-dT qui se lie aux ARN et servent d'amorces pour une ADN polymérase ARN-dépendante. En présence de désoxyribonucléotides triphosphate (dNTP), il y a élongation des amorces et synthèse d'ADNc représentatifs de l'ensemble des ARN.

La réaction est réalisée avec in kit SuperScript® III Reverse Transcriptase (Invitrogen) dans un volume total de 10µL. Le mélange contient 1 µg d'ARN, 2 µL de Random Primers (Promega) 50 µg/ml, 0,5 µl de dNTP 10 mM (Promega) et le volume est complété à 6,5 µL à l'aide d'eau distillée. Le mélange est chauffé à 65°C pendant 5 minutes puis mis pendant au moins une minute sur la glace. A ce mélange est ajouté 3,5 µl d'un mix comprenant 2 µl du tampon First Strand 5X, 0,5 µl de DTT, 0,5 µl de RNase OUT (Invitrogen) et 0,5 µl de la SuperScript III (Invitrogen). La réaction de transcription inverse est réalisée selon le protocole suivant : 30 minutes à 50°C et 15 min à 70°C. Les produits de RT sont ensuite conservés à -20°C jusqu'à leur utilisation.

G.3. Réaction de polymérisation en chaîne en temps réel

Le principe de la réaction de la PCR quantitative repose sur la quantification du taux d'ARNm, après transcription reverse en ADNc par une reverse transcriptase, grâce à la

fluorescence émise par fluorophore qui s'intercale entre les brins de l'ADN néosynthétisé au cours de la réaction de PCR. Le fluorophore utilisé au cours de cette réaction est le SYBR[®] Green (PCRRarray-Qiagen). Les amorces utilisées pour chacun des gènes amplifiés ont été choisies grâce à la base de données qPrimer Depot (National Institute of Health) pour les amorces humaines et PrimerBank (Harvard Medical School) pour les amorces murines. Le gène de ménage utilisé code la phosphoprotéine ribosomale acide PO (36B4).

Cette méthode de PCR en temps réel nécessite le calibrage de la réaction et de l'appareil par l'amplification d'une gamme de dilution des ADNc. Des dilutions en série sont réalisées à partir d'un mélange de tous les produits de RT dilués.

G3.1. Préparations des échantillons

La réaction de transcription inverse est réalisée dans un volume final de 10 µl auquel 80 µl de H₂O ont été ajoutés pour obtenir un volume final de 100 µl. A partir de ces échantillons, une gamme de dilution a été réalisée pour servir de standard pour la réaction de qPCR. Un volume de 25 µl de chacun des échantillons est prélevé et mélangé pour constituer le premier point de gamme, nommé arbitrairement « 64 ». Les points suivants seront réalisés par dilutions au 1/2 en cascade et donneront les points « 32 », « 16 », « 8 », « 4 » et « 2 ». Les 75 µl de produit de RT restant sont complétés avec de l'eau distillée à 225 µl.

G.3.2. Réaction de qPCR

Chaque échantillon est analysé en double dans des plaques 96 puits (Applied Biosystems). Chaque puits contient un volume réactionnel de 12,5 µl constitué de la manière suivante : 6,25 µl de « RT² Real-Time SYBR Green/Fluorescein qPCR Master Mix » (Qiagen), 2,5 µl d'ADNc (produit de RT dilués) et 320 nM de chaque amorce. La PCR débute par une étape de chauffage à 95°C pendant 10 minutes, suivie de 40 cycles de dénaturation de 15 secondes à 95°C et 1 minute d'hybridation-élongation à 60°C.

Après chaque réaction d'amplification, une droite d'étalonnage est établie indiquant l'efficacité de la réaction de PCR pour chaque couple d'amorces. Au niveau expérimental, la quantité de produit formé dépend d'un facteur primordial qui est l'efficacité d'amplification (E) définie comme étant la proportion moyenne des molécules d'ADN cible se dupliquant à chaque cycle d'amplification. Pour que la PCR soit exploitable, l'efficacité doit être comprise entre 90 et 110%. Cette droite d'étalonnage a pour équation $Ct = \log(\text{facteur de dilution}) + Ct_{\text{ADNc non dilués}}$. Le Ct (« cycle threshold » ou cycle seuil) est défini comme la valeur du

cycle pour laquelle la quantité de fluorescence dépasse de manière significative le seuil de détection de l'appareil. En parallèle à cette gamme d'étalonnage, les échantillons sont amplifiés et les valeurs de Ct obtenues sont reportées sur la droite standard.

Chaque produit d'ADN double brin synthétisé possède une température de fusion (T_m) spécifique. Après le dernier cycle de PCR, la température est rapidement élevée à 95°C pour dénaturer l'ADN double brin puis redescendue à 55°C, ce qui provoque la renaturation de l'ADN. Ensuite, la température est augmentée lentement de 55°C à 95°C par palier de 0,5°C toutes les 10 secondes. La fluorescence est lue en continu pendant cette augmentation progressive de température. Le SYBR Green est fluorescent lorsqu'il est lié à l'ADN double brin et lorsque la température augmente, l'ADN double brin se dissocie, les molécules de SYBR Green sont libérées dans le milieu ce qui conduit à la diminution progressive de la fluorescence. La température à laquelle 50% de l'ADN double brin est dissocié correspond à la température de fusion (T_m : melting temperature) du produit synthétisé et pour l'amplification spécifique d'un gène donné, un seul pic d'intensité variable doit être observé sur la courbe de fusion.

G.4. RT-QPCR en plaque pour l'identification des voies d'inflammation

Une analyse quantitative de l'expression des ARNm codant 84 cytokines, chimiokines et de leurs récepteurs (Tableau 3) dans les différentes lignées de fibroblastes humains a été réalisée avec le kit « Human Chimiokines & Receptors RT² profiler™ PCR array » (Qiagen-SuperArray Bioscience). Des quantités égales d'ARN (1µg) de chaque échantillon ont été converties en ADN complémentaire grâce au kit « RT² First Strand Kit » (Qiagen-SuperArray Bioscience Corporation). L'analyse en QPCR a été réalisée en suivant le protocole du fabricant avec le kit « RT² Real-Time SYBR Green/Fluorescein qPCR Master Mix » (Qiagen-SuperArray Bioscience) sur un appareil BioRad iCycler®.

ABCF1	CCL20	CCR4	CXCL14	IL1A	IL8RA
BCL6	CCL21	CCR5	CXCL2	IL1B	IL8RB
C3	CCL23	CCR6	CXCL3	IL1F10	IL9
C4A	CCL24	CCR7	CXCL5	IL1F5	IL9R
C5	CCL25	CCR8	CXCL6	IL1F6	LTA
CCL1	CCL26	CCR9	CXCL9	IL1F7	LTB
CCL11	CCL3	CEBPB	ICEBERG	IL1F8	LTB4R
CCL13	CCL4	CRP	IFNA2	IL1F9	MIF
CCL15	CCL5	CX3CR1	IL10	IL1R1	SCYE1
CCL16	CCL7	CXCL1	IL10RA	IL1RN	SPP1
CCL17	CCL8	CXCL10	IL10RB	IL22	TNF
CCL18	CCR1	CXCL11	IL13	IL5	CD40LG
CCL19	CCR2	CXCL12	IL13RA1	IL5RA	TOLLIP
CCL2	CCR3	CXCL13	IL17C	IL8	XCR1

Tableau 3. Liste des gènes liés à l'inflammation testés par RT-QPCR sur plaque.

Le volume total de chaque PCR était de 25 μ l. Les paramètres du thermocycler étaient une première étape de 10 minutes à 95°C, suivie de 40 cycles de dénaturation de 15 secondes à 95°C et 1 minute d'hybridation-élongation à 60°C. L'expression des ARNm de chaque gène a été normalisée en utilisant l'expression de cinq gènes de ménage (β -2-microglobuline, hypoxanthine phosphoribosyltransférase 1, protéine ribosomale L13a, glyceraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase et β -actine) et comparée avec les données obtenues pour la lignée de fibroblastes contrôle en utilisant la méthode du $\Delta\Delta$ Ct (Livak et Schmittgen, 2001).

H. Cytométrie en flux

L'analyse multiplexe type Luminex est une technique qui permet la détection de plusieurs analytes dans le même échantillon par cytométrie en flux en utilisant des microbilles. Par rapport à l'ELISA, chaque microbille équivaut à un micropuits. Plusieurs populations de microbilles marquées par un premier marqueur fluorescent, que l'on peut différencier par leur intensité de fluorescence, sont mélangées. Chaque population est couplée de façon covalente à un premier anticorps spécifique dirigé contre une protéine donnée. Après incubation des billes avec l'échantillon à tester, la révélation est réalisée grâce à un second anticorps, lui aussi spécifique de la protéine d'intérêt, marqué par une seconde sonde fluorescente. La lecture de

la fluorescence de chaque bille par cytométrie aux deux longueurs d'ondes spécifiques de chaque fluorochrome permet le dosage de plusieurs protéines dans le même échantillon.

La technique Luminex utilisée se base sur l'utilisation de deux lasers : un laser rouge (633 nm) qui excite les fluorochromes incorporés aux billes et permet de distinguer chaque population de billes et un laser vert qui excite le fluorochrome qui est couplé au révélateur (anticorps). Le fluorochrome utilisé est la phycoérythrine qui, excitée à 532 nm, fluoresce à 575 nm. La fluorescence mesurée est proportionnelle à la quantité d'analyte présente dans l'échantillon. La mesure des concentrations des cytokines inflammatoires IL-8, IL-1 β , IL-6, IL-10, TNF- α et IL-12p70 a été réalisée sur des surnageants de culture cellulaire par cytométrie en flux en utilisant le kit « CBA Human inflammation kit » (BD Biosciences) en suivant le protocole du fabricant. Les mesures ont été réalisées sur un cytomètre Partec Galaxy.

Les mesures ont été réalisées à partir de 50 μ l surnageant de culture. Les cellules ont étéensemencées dans des plaques 24 puits à raison de 50000 cellules par puits, puis laissées adhérees à 37°C et du CO₂ à 5%. Après 24h d'incubation, le milieu de culture est remplacé par du nouveau milieu contenant ou non les inhibiteurs des voies de signalisation à 5 μ M ou 10 μ M, et les cellules sont incubées à 37°C et du CO₂ à 5% pendant 24h.

I. Dosage de l'ATP intracellulaire par fluorimétrie

I.1. Principe

Le dosage de l'ATP intracellulaire a été réalisé avec un kit « ATP Bioluminescence Assay Kit HS II » (Roche). Le principe de ce dosage consiste à quantifier l'ATP produit par les cellules par luminescence avec l'enzymeluciférase, provenant de l'insecte *Photinus pyralis*, qui catalyse la réaction suivante :



La lumière verte résultante de la réaction possède une émission maximale à 562 nm.

I.2. Préparation de la gamme d'ATP

La gamme d'ATP a été préparée en reconstituant un flacon d'ATP de 10,5 mg dans 1,05 ml de tampon de dilution (Roche) pour avoir une solution mère à 10 mg.ml⁻¹. Une solution à 10⁻⁴ M a été préparée en diluant 6 μ l de la solution mère dans 1 ml de tampon de dilution (dilution de 165X). A partir de cette solution une série de dilutions en cascade a été préparée

pour avoir des concentrations allant de 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} , 10^{-8} , 10^{-9} , 10^{-10} , 10^{-11} et 10^{-12} M d'ATP. A partir de chaque dilution, 25 μ l ont été prélevés et ajoutés à 25 μ l de tampon de dilution puis déposés dans un puits d'une plaque 96 puits. Ensuite, 50 μ l de luciférase ont été ajoutés et la fluorescence émise à 562 nm est mesurée.

I.3. Dosage de l'ATP

Les cellules ont étéensemencées à raison de 1×10^5 cellules/boîtes de 10 cm^2 dans du milieu DMEM SVF 10%, de pyruvate de sodium 10 mM et des antibiotiques pénicilline/Streptomycine 1% à 37°C et 5% CO_2 pendant 24 heures. Les cellules sont ensuite trypsinées et centrifugées à 200 g pendant 6 minutes. Le culot cellulaire a été ensuite repris par 100 μ l de tampon de dilution (Roche) et 100 μ l de tampon de lyse a été ajouté (Roche). Les cellules sont incubées dans ce mélange pendant 5 minutes à température ambiante puis centrifugées à 10000 g pendant 1 minute. Cinquante microlitres de la suspension cellulaire ont été alors ajoutés à 50 μ l de D-luciférine et la fluorescence émise à 562 nm a été mesurée.

Les fluorescences émises sont rapportés à la gamme d'ATP pour déterminer la concentration en ATP en mol.l^{-1} . La quantité en mol d'ATP a été ensuite calculée et rapportée au nombre de cellules utilisées pour le dosage.



Résultats

**Chapitre I : Déficience en ACOX1 et
inflammation (Article)**

Objectifs

Les cytokines proinflammatoires semblent jouer un rôle important dans les désordres neurologiques et dans les zones de démyélinisation chez les patients atteints d'X-ALD. L'étude, donc, des relations entre le déficit de la β -oxydation peroxysomale et l'apparition de phénomènes inflammatoires, dans les adrénoleucodystrophies en général et dans la P-NALD en particulier, constitue un enjeu majeur. En effet, les mécanismes qui lient les perturbations du métabolisme lipidique à l'inflammation restent à déterminer.

L'objectif du travail réalisé a porté sur l'identification d'une voie d'inflammation activée dans les lignées de fibroblastes de patients déficientes en activité ACOX1, seul modèle de cellules humaines de patients P-NALD disponible, et sur l'origine de cette activation. Dans ce sens, avant de rechercher la ou les voie(s) d'inflammation(s) impliquée(s), nous avons procédé à une caractérisation des fibroblastes P-NALD. Cette caractérisation avait pour objectif de montrer, dans ces fibroblastes, l'absence de l'activité acyl-CoA oxydase 1 sur la morphologie des peroxysomes (nombre et taille des peroxysomes).

Introduction

La P-NALD est une maladie neurodégénérative rare due à la déficience en acyl-CoA oxydase 1 (ACOX1), enzyme qui catalyse la première étape de la voie de β -oxydation peroxysomale. Cette voie permet la dégradation des acides gras à très longue chaîne (AGTLC). Les patients atteints de P-NALD présentent un retard de développement cérébral et moteur, une hépatomégalie, une démyélinisation progressive de la matière blanche cérébrale, des troubles de l'ouïe et une hypotonie. Ces patients accumulent les AGTLC, plus particulièrement l'acide cérotique (ou acide hexacosanoïque, C26:0) dans le plasma et les tissus et meurent à l'âge de 3-5 ans. Actuellement, les mécanismes de la pathogenèse des leucodystrophies peroxysomales associant une accumulation importante d'AGTLC avec un processus plus ou moins rapide de démyélinisation menant à des retards de développement sont encore peu connus.

Au niveau cérébral, la démyélinisation due à la déficience en ACOX1 avec une leucodystrophie progressive est similaire à celle décrite pour l'X-ALD. De nombreuses études ont montré l'implication de cytokines dans les désordres neurologiques (Paintlia et al., 2003), en particulier dans le cas de l'X-ALD. L'inflammation cérébrale est observée chez certains patients atteints d'X-ALD (Eichler et Van Haren, 2007) et la participation des médiateurs de l'inflammation a été évaluée. En effet, l'expression d'ARNm de cytokines, chimiokines et de

la « inducible nitric oxide synthase » (iNOS) a été montrée dans les aires inflammatoires du cerveau de patients X-ALD (Paintlia et al., 2003).

Au total, ces observations laissent à penser que des liens étroits existeraient entre la biogenèse et l'activité peroxysomale d'une part et l'inflammation d'autre part. Dans l'étude de la physiopathogenèse de la P-NALD, il est nécessaire de développer des modèles cellulaires appropriés pour comprendre les relations entre les perturbations du métabolisme lipidique et l'inflammation.

Endocrinology. First published ahead of print April 16, 2012 as doi:10.1210/en.2012-1137

B R I E F R E P O R T

The Inflammatory Response in Acyl-CoA Oxidase 1 Deficiency (Pseudoneonatal Adrenoleukodystrophy)

H. I. El Hajj, A. Vluggens, P. Andreoletti, K. Ragot, S. Mandard, S. Kersten, H. R. Waterham, G. Lizard, R. J. A. Wanders, J. K. Reddy, and Mustapha Cherkaoui-Malki

Laboratoire de Biochimie du Peroxysome, Inflammation et Métabolisme Lipidique (H.I.E.H., A.V., P.A., K.R., S.M., G.L., M.C.-M.), Université de Bourgogne, and Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (H.I.E.H., A.V., P.A., K.R., S.M., G.L., M.C.-M.), Unité Mixte de Recherche 866, Dijon F-21000, France; Nutrition, Metabolism, and Genomics Group (S.K.), Wageningen University, 6700 HB Wageningen, The Netherlands; Laboratory for Genetic Metabolic Diseases (H.R.W., R.J.A.W.), Department of Clinical Chemistry and Pediatrics, Academic Medical Center, University of Amsterdam, Emma Children's Hospital, 1105 AZ Amsterdam, The Netherlands; and The Department of Pathology (A.V., J.K.R.), Northwestern University, Feinberg School of Medicine, Chicago, Illinois 60611

Among several peroxisomal neurodegenerative disorders, the pseudoneonatal adrenoleukodystrophy (P-NALD) is characterized by the acyl-coenzyme A oxidase 1 (ACOX1) deficiency, which leads to the accumulation of very-long-chain fatty acids (VLCFA) and inflammatory demyelination. However, the components of this inflammatory process in P-NALD remain elusive. In this study, we used transcriptomic profiling and PCR array analyses to explore inflammatory gene expression in patient fibroblasts. Our results show the activation of IL-1 inflammatory pathway accompanied by the increased secretion of two IL-1 target genes, IL-6 and IL-8 cytokines. Human fibroblasts exposed to very-long-chain fatty acids exhibited increased mRNA expression of IL-1 α and IL-1 β cytokines. Furthermore, expression of IL-6 and IL-8 cytokines in patient fibroblasts was down-regulated by MAPK, p38MAPK, and Jun N-terminal kinase inhibitors. Thus, the absence of acyl-coenzyme A oxidase 1 activity in P-NALD fibroblasts triggers an inflammatory process, in which the IL-1 pathway seems to be central. The use of specific kinase inhibitors may permit the modulation of the enhanced inflammatory status. (*Endocrinology* 153: 0000–0000, 2012)

In several peroxisomal disorders, the peroxisomal fatty acid β -oxidation pathway is defective. This may be due to the specific deficiency of an enzyme or transporter involved in peroxisomal β -oxidation or the absence of the complete organelle resulting from a genetic defect in one of the many genes required for proper peroxisome biogenesis and maintenance (1, 2). Pseudoneonatal adrenoleukodystrophy (P-NALD) (OMIM 264470) is a rare, neuroinflammatory, and a neurodegenerative peroxisomal disorder characterized by craniofacial dysmorphism, generalized hypotonia, hepatomegaly, infantile seizures, loss of motor achievements, and white matter demyelination (3–6). P-NALD disease is due to acyl-coenzyme A

(CoA) oxidase 1 (ACOX1) deficiency, which leads to a selective impairment of the peroxisomal fatty acid β -oxidation pathway specifically affecting the oxidation of very-long-chain fatty acids (VLCFA). As a consequence, VLCFA accumulate in plasma and tissues (1, 7). ACOX1 catalyzes the α , β -dehydrogenation of a range of acyl-CoA esters, including the CoA-esters of dicarboxylic acids, eicosanoid derivatives, and saturated VLCFA (2, 7, 8). In human and mice, the ACOX1 enzyme is encoded by a single gene, which generates two splice variants, including exon 3a or exon 3b, respectively, leading to the synthesis of two protein isoforms ACOX1a or ACOX1b (2, 9). Although no apparent genotype-phenotype correlation has

ISSN Print 0013-7227 ISSN Online 1945-7170
Printed in U.S.A.

Copyright © 2012 by The Endocrine Society
doi: 10.1210/en.2012-1137 Received February 6, 2012. Accepted March 16, 2012.

Abbreviations: ACOX1, Acyl-CoA oxidase 1; C26:0, cerotic acid; CEBP β , CAAT/enhancer binding protein β ; CCL, chemokine (C-C motif) ligand; CCR1, chemokine (C-C motif) receptor type 1; CoA, coenzyme A; CXCL, chemokine (C-X-C motif) ligand; JNK, Jun kinase; MAPKK, MAPK kinase; P-NALD, pseudoneonatal adrenoleukodystrophy; SPP1, secreted phosphoprotein 1; TOLLIP, Toll-interacting protein; VLCFA, very-long-chain fatty acid.

Endocrinology, June 2012, 153(6):0000–0000 endo.endojournals.org 1

Copyright (C) 2012 by The Endocrine Society

been established in P-NALD (7), a patient with a single homozygous mutation on exon 3b has also the clinical signs and symptoms of P-NALD (10), thus revealing the substrate specificity of the specific ACOX1 isoforms (2, 8). Mice lacking *Acox1* manifest severe inflammatory steatohepatitis with increased intrahepatic H₂O₂ levels and hepatocellular regeneration (11, 12). Progressively, chronic endoplasmic reticulum stress contributes to hepatocarcinogenesis (13), and this steatotic ACOX1 null phenotype can be reversed by expression of the human ACOX1b isoform (8, 13). However, even if they show smaller size and growth retardation when compared with their littermates, *Acox1* null mice have no apparent neurological disorder (11, 14). In brain lesions of patients developing the demyelinating form of peroxisomal X-linked adrenoleukodystrophy, oxidative, inflammatory, and apoptotic processes have been described (15–17). In this related peroxisomal disorder, lipid derivatives with an abnormally high proportion of VLCFA residues have been proposed to trigger the initial cascade of the inflammatory demyelination (18, 19). However, the components of this inflammatory process in P-NALD have remained elusive. To explore the inflammatory response in ACOX1 deficiency, we used two patient-derived fibroblasts for transcriptomic microarray analysis associated with a PCR array screening in an attempt to identify the involved proinflammatory components.

In the present work, we report the expression profiling of inflammatory cytokines in fibroblasts from P-NALD patients. Alterations in the expression of IL-1 pathway were revealed and accompanied by increased secretions of the IL-6 and IL-8. Fibroblasts exposed to VLCFA show increased expression of cytokines mRNA. Signaling pathways involved in the induction of these cytokines were also explored.

Materials and Methods

Cell culture and VLCFA treatment

Skin fibroblasts were cultured as described (7) and handled according to national and institutional guidelines. Cerotic acid (C26:0) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) was solubilized in α -cyclodextrine (Sigma-Aldrich). Final concentration of α -cyclodextrine (vehicle) in the culture medium was 1 mg/ml. For fibroblasts treatment, the final concentration of C26:0 was 10 μ M.

Acyl-CoA oxidase activity measurement

It was performed as described by Oaxaca-Castillo *et al.* (2).

Immunostaining, fluorescence microscopy, and Nile red staining

Immunostaining, fluorescence microscopy, and Nile red staining were achieved as previously described (20).

Microarray analysis (Affymetrix, Santa Clara, CA), cytokines analysis by Cytometric Bead Array Human Inflammation kit (BD Biosciences, Courtaboeuf, France), and PCR array analysis (PAHS-011; SABiosciences-QIAGEN, Courtaboeuf, France) are described in Supplemental Materials and Methods, published on The Endocrine Society's Journals Online web site at <http://endo.endojournals.org>.

Results and Discussion

Characterization of patient-derived-deficient fibroblasts

To characterize the deficiency of ACOX1 in P-NALD fibroblasts, the activity of ACOX1 was first measured in cell extracts. As shown in Fig. 1A, weak residual palmitoyl-CoA oxidase specific activity was present in patient 1 fibroblasts, although much reduced, whereas this ACOX1 activity was undetectable in patient 2 fibroblasts. Both patients' fibroblast cells exhibited a strong reduction in the number of peroxisomes per cell, as shown by peroxisomes immunostaining with antibodies against catalase (matrix protein) and 70-kDa peroxisomal integral membrane protein (Fig. 1B). This is accompanied by the enlarged size of peroxisomes as shown by anticatalase immunofluorescence (Fig. 1C). Fibroblasts Nile red staining reveals a transition from the predominance of polar lipids in control fibroblasts (green fluorescence) (Fig. 1C) to an accumulation of neutral lipids in P-NALD fibroblasts (yellow fluorescence) (Fig. 1C). Accumulation of VLCFA in plasma has been previously shown for these patients (7).

Transcriptomic profiling of inflammatory genes in P-NALD fibroblasts

To identify proinflammatory genes that are dysregulated in P-NALD/ACOX1-deficient fibroblasts, we used Affymetrix microarray profiling. Transcriptional profiling revealed that a number of genes coding for cytokines and other proinflammatory proteins was up-regulated (≥ 1.5), including, IL-6, IL-8, and several TNF α family members (3, 8, 9, 10A, 12, and 14) as well as interferon-inducible proteins (Supplemental Table 1). Interestingly, the expression of genes coding for cytokines IL-6, IL-8, and TNF α , which are typically produced by macrophages and by CD4⁺ T cells Th1, has also been found to be increased in multiple sclerosis and cerebral forms of X-adrenoleukodystrophy lesions (15). On the other hand, several cytokines and chemokine mRNA are strongly down-regulated in P-NALD fibroblasts, including chemokine (C-X-C motif) ligand (CXCL)14 and CXCL12 genes, which have been shown to participate in the regulation of cell or tissues homeostasis (21, 22).

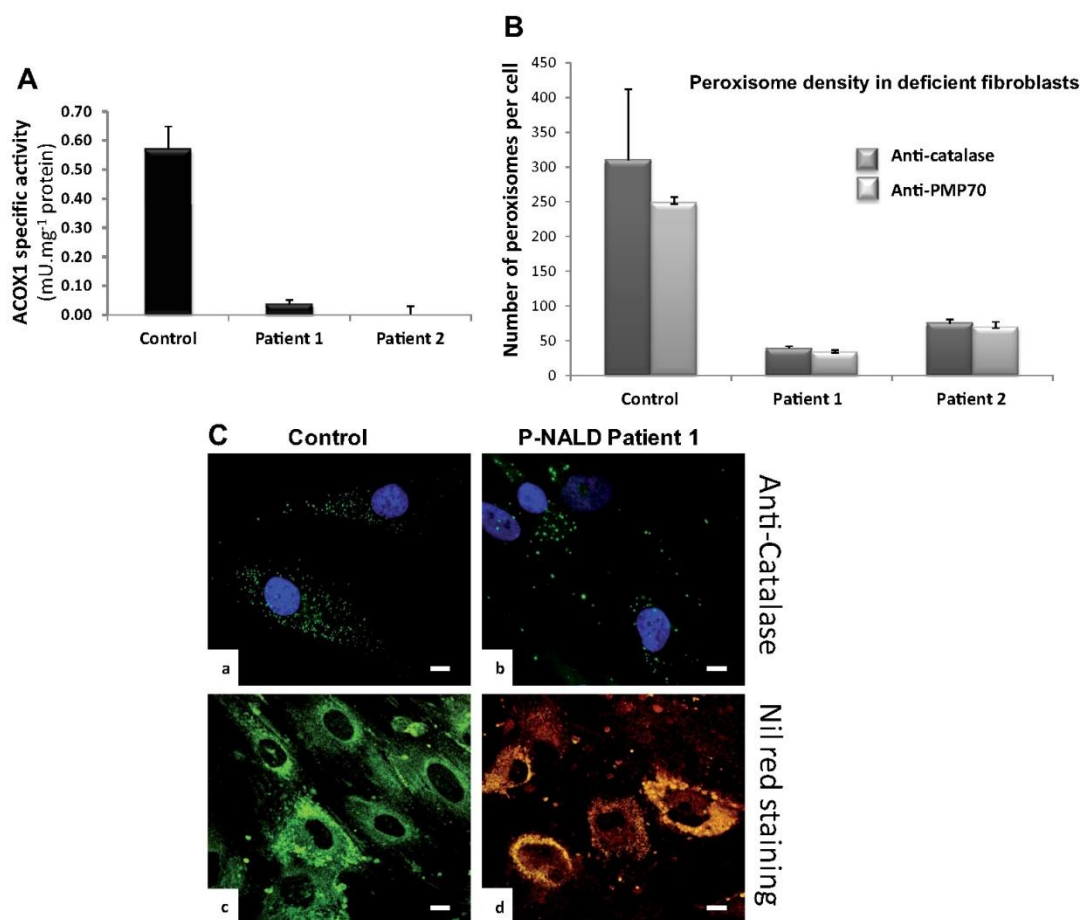


FIG. 1. Characterization of P-NALD patient's fibroblasts. A, ACOX1 activity measured in both patients' (1 and 2) fibroblasts. Enzymatic activity of ACOX1 was measured using palmitoyl-CoA as substrate (2). B, Immunostaining of fibroblasts (control, patient 1 and patient 2 fibroblasts) by catalase, a peroxisomal marker, reveals high number of peroxisomes in control cells and low number of peroxisome in P-NALD patient 1 fibroblasts. C, Immunostaining of control (a) and P-NALD (b) fibroblasts by anticatalase reveals enlarged peroxisome size in patient 1 P-NALD fibroblasts (b). Nile red staining of control (c) and P-NALD (d) fibroblasts. The green color indicates the predominance of polar lipids in control cells, whereas the yellow staining of deficient fibroblasts reveals an accumulation of neutral lipids. Microscope images magnifications, $\times 100$. Scale bar, 10 μm . PMP70, 70-kDa peroxisomal integral membrane protein.

Alterations of the IL-1 β pathway in P-NALD fibroblasts

To define a specific inflammatory pathway activated in ACOX1 deficiency, PCR array (SABiosciences), containing 84 key genes mediating the inflammatory response and which include several genes deregulated in our transcriptomic profiling, was used to determine the profile of reverse-transcribed RNA from the two patients derived fibroblasts compared with the control fibroblasts. Table 1 shows results for genes significantly regulated in both patients. Based on the $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ analyses of three PCR arrays ($n = 3$) for each fibroblasts sample, 14 genes were strikingly and similarly regulated in ACOX1-deficient fibroblasts for both patients (cut-offs, $-1.5\text{-fold} \geq \text{gene fold expression} \geq 1.5\text{-fold}$). Absence of ACOX1 activity, which leads to VLCFA accumulation, triggered mRNA

up-regulation of IL-1 α , IL-1 β , IL-1R1, IL-1RN, IL-17C, secreted phosphoprotein 1 (SPP1), chemokine (C-C motif) receptor type 1 (CCR1), chemokine (C-C motif) ligand (CCL)3, CCL7, CAAT/enhancer binding protein β (CEBP β), and Toll-interacting protein (TOLLIP) (1.65- to 15-fold) and down-regulation of CXCL14, CCL26, and CXCL5 ($-1.92\text{- to }-50\text{-fold}$). Remarkably, all these regulated genes are connected to the IL-1 pathway. Activation of this pathway is triggered by the binding of the IL-1 α /IL-1 β heterodimer to IL-1R1 (23). Correspondingly, Table 1 shows that IL-1 α , IL-1 β , and IL-1R1 mRNA are significantly induced in P-NALD fibroblasts. Thus, IL-1, which is recognized as a proinflammatory cytokine (24), is known to control the expression of other inflammatory genes, including TNF α and interferon through a well-defined transduction signaling pathway (24). In-

TABLE 1. PCR array analysis of genes encoding inflammatory cytokines in P-NALD fibroblasts as compared to the control

Gene symbol	Gene name	Fold induction	
		Patient 1	Patient 2
IL1A	IL-1 α	5.50 ^c	5.58 ^b
IL1B	IL-1 β	1.65 ^a	3.60 ^b
IL17C	IL-17C	2.39 ^a	2.54 ^a
IL1R1	IL-1 receptor type I	2.18 ^c	2.43 ^b
IL1RN	IL-1 receptor antagonist	1.54 ^a	3.02 ^b
SPP1	Secreted phosphoprotein 1 (osteopontin)	3.98 ^c	7.89 ^c
CCR1	Chemokine (C-C motif) receptor 1	6.18 ^c	2.60
CCL3	Chemokine (C-C motif) ligand 3	10.27 ^c	2.49 ^a
CCL7	Chemokine (C-C motif) ligand 7	14.19 ^b	15.24 ^b
CXCL14	Chemokine (C-X-C motif) ligand 14	-5.26 ^c	-1.92 ^b
CCL26	Chemokine (C-C motif) ligand 26	-14.28 ^c	-3.57 ^c
CXCL5	Chemokine (C-X-C motif) ligand 5	-50 ^c	-8.34 ^c
TOLLIP	Toll-interacting protein	3.31 ^c	2.32 ^b
CEBP β	CCAAT/enhancer binding protein, β	2.45 ^b	2.07 ^a

Values indicate fold change in P-NALD fibroblast obtained using the Excel analysis tool (SABiosciences), which includes descriptive statistics.

^a $P < 0.1$.

^b $P < 0.01$.

^c $P < 0.001$.

triguingly, the expression of IL-1RN, an IL-1 receptor antagonist, which modulates the inflammatory responses (23), was induced as well (Table 1). It is noteworthy that IL-1RN is also induced in patient serum developing a neurological disorder, such as schizophrenia (25). We cannot exclude that IL-1RN induction may contribute to the attenuation of the inflammatory stress during P-NALD progression by antagonizing IL-1 activity and thus preserving immune homeostasis (23). Furthermore, another cytokine transcript IL-17C was increased more than 2-fold in both patients derived fibroblasts (Table 1). It is a homologue gene of IL-17, which is increased in autoimmune diseases, such as multiple sclerosis (26). Thus, IL-17C may participate in P-NALD-fibroblasts to the release of both IL-1 β and TNF α (27).

As shown in Table 1, the SPP1 (also called osteopontin) mRNA is highly induced (at least 4-fold) in ACOX1-null fibroblasts. Reportedly, SPP1 expression is induced by IL-1 α or IL-1 β as well (28, 29). SPP1 is an extracellular glycoprotein, belonging to the integrin superfamily (30). This two-sided mediator acts in a context-dependent manner as a neuroprotectant (31) or as triggering the neuronal

toxicity (32) and has been reported in several neurodegenerative diseases, such as multiple sclerosis, Parkinson's disease, and Alzheimer's disease (32). Interestingly, in P-NALD fibroblasts beside the induction of cytokine mRNA, the expression of several chemokine transcripts (CCL3, CCL7, CCL26, CCR1, CXCL5, and CXCL14) is strongly modified as well (Table 1). Transcripts of both CCR1 and its chemokine ligands CCL3 (Rantes/macrophage inflammatory protein 1 α) and CCL7 (monocyte chemoattractant protein-3) were highly induced in P-NALD fibroblasts. CCR1 and its ligands play a critical role in the recruitment of inflammatory cells to neurological lesions (33, 34). Hence, infusions of several cell lines with IL-1 α or IL-1 β , including Caco-2, hepatoma, smooth muscle, or astrocytes cell lines (35–38), display enhanced synthesis of CCL3 and/or CCL7, which may interact with its CCR1 receptor. Thus, induction of CCR1 and its ligands in P-NALD-fibroblasts may reflect a common inflammatory response as reported in many neurodegenerative diseases (34, 39).

Interestingly, the increased expression of CEBP β (2.25-fold) and TOLLIP (mean 2.8-fold) constitutes an additional argument of the activation of the IL-1 inflammatory pathway in P-NALD-fibroblasts (Table 1 and Supplemental Table 1). Hence, enhanced synthesis of CCL3 ligand (Table 1) through the activation IL-1 pathway (as cited above) is dependent on the transcriptional activation of CCL3 gene promoter by CEBP β (40). Furthermore, TOLLIP, which constitutes an important component of IL-1R signaling pathway (41), can limit the production of pro-inflammatory cytokines (42) by controlling the magnitude of IL-6 and TNF α in response to IL-1 β (43).

According to our transcriptomic profiling results (Supplemental Table 1) and using cytometric bead array analysis, we show in Fig. 2 that the secretions of IL-6 and IL-8 cytokines were strongly induced in P-NALD fibroblasts, whereas secretion of TNF α was not significantly changed (data not shown). Thus, ACOX1 deficiency in P-NALD fibroblasts leads to the activation of IL-1 inflammatory pathway and enhanced synthesis of its target genes, IL-6 and IL-8 (Fig. 2).

From the 84 genes present in PCR array, only three chemokine genes (*i.e.* CCL26, CXCL5, and CXCL14) exhibited a similar down-regulation in the two patients derived fibroblasts (Table 1). The CCL26 (or Eotaxin-3) is a strikingly decreased chemokine gene in P-NALD-fibroblasts (-3.5- to -14-fold) (Table 1). This may be correlated to the induction of CCL3, revealing an autocrine mechanism involving CCL3, which selectively down-regulates CCL26 (44). Two other transcripts encoding chemokine ligands were highly decreased in P-NALD fibroblasts, and both belong to the CXCL family. CXCL5

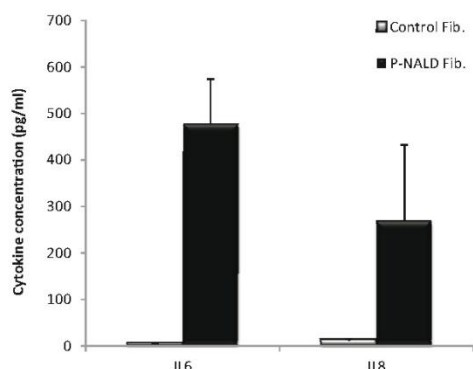


FIG. 2. IL-6 and IL-8 cytokine secretion in the culture medium obtained from the control and P-NALD fibroblasts. 1.2×10^6 cells were seeded in 10-cm Petri dishes and cultured in DMEM supplemented with 10% fetal calf serum at 37 C with 5% CO₂; 24 h after seeding, fibroblasts were rinsed three times with PBS and incubated in DMEM without serum for 18 h. Culture media were collected and analyzed by cytometric bead array as described in *Materials and Methods*. Values are mean \pm SD. Fib, Fibroblasts.

(also called epithelial-derived neutrophil-activating peptide 78) is down-regulated in P-NALD fibroblasts (Table 1) and also in plasma of patients with chronic liver disease and serves as biomarker of necroinflammation and liver fibrosis (45). Hence, P-NALD patients are known to develop hepatomegaly and liver fibrosis (7). Although CXCL14 deficiency has been linked to the attenuation of obesity and brain control of behavior feeding (46). Decreased expression of both CXCL5 and CXCL14 (Table 1) may reflect the dysregulation of lipid metabolism, thus impacting the inflammatory process during P-NALD disease progression.

Inflammatory response of fibroblasts to increased VLCFA-cerotic acid concentration

The increase in the VLCFA levels precede largely the white matter demyelination in P-NALD and the neuroinflammatory response in childhood X-linked adrenoleukodystrophy as well (15, 18, 19). Although it is well known that both P-NALD and X-linked adrenoleukodystrophy are associated with the accumulation of VLCFA (1, 8), the direct role of VLCFA in the induction of inflammatory process still is, however, merely speculative (18). To try and understand this possible relationship, we treated control fibroblasts with the cerotic C26:0 fatty acid. Figure 3 shows the time-course expression of cytokines (IL-1 α , IL-1 β , and IL-6) and ACOX1b, the ACOX1 isoform involved in C26:0- β -oxidation (2, 8), transcripts in fibroblasts exposed to 10 μ M C26:0 during 48 h. As shown in Fig. 3, enhanced cytokines mRNA expression, particularly IL-1 α and IL-1 β , was evident already between 6 and 12 h, showing a sequential and similar induction with a maximum at 12 h. A return to the control level of

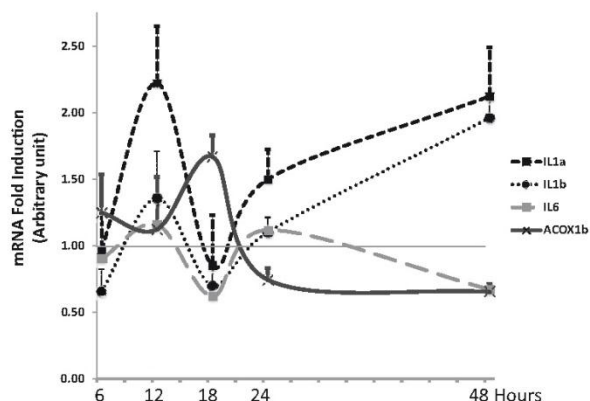


FIG. 3. Time-course fold inductions of cytokines and ACOX1b mRNA in human control fibroblasts treated with C26:0 at 10 μ M in α -cyclodextrin at final concentration of 1 mg/ml. 1.2×10^6 cells were seeded in 10-cm Petri dishes and cultured in DMEM complemented with 10% fetal calf serum at 37 C with 5% CO₂; 24 h after seeding, fibroblasts were rinsed three times with PBS solution and incubated in DMEM with α -cyclodextrin (1 mg/ml) as control or with α -cyclodextrin (1 mg/ml) supplemented with C26:0 at 10 μ M. Cells were collected at the indicated time point by trypsination. Values are mean \pm SD. Total RNA isolated from treated fibroblasts were analyzed by RT-quantitative PCR using gene-specific primers as described in *Materials and Methods*.

both cytokine mRNA at 18 h is concomitant to a delayed ACOX1b mRNA expression hit (Fig. 3). By contrast, 6 h later (a 24-h time course), the expression levels of IL-1 α and IL-1 β mRNA increased at 24 and 48 h, whereas at the opposite, ACOX1 transcripts were reduced again and stay under the control threshold at 48 h of VLCFA treatment. Thus, C26:0-VLCFA seems to regulate concomitantly and sequentially, in a divergent manner, both cytokines and ACOX1 mRNA levels. This sequential regulation in fibroblasts is probably linked to the fact that cytokines, such as IL-1 β , are able to increase accumulation of VLCFA through inhibition of the peroxisomal β -oxidation of C26:0-cerotic acid by an unknown mechanism (19). This may install a vicious circle, in which C26:0 fatty acid triggers earlier increase of mRNA cytokines, which down-regulate peroxisomal β -oxidation leading to the accumulation of VLCFA. The latter in turn promotes the reinduction of cytokine transcripts during a second late phase.

Signaling pathway involved in cytokines expression

To explore the transduced signaling associated with IL-1 pathway activation in P-NALD fibroblasts, we used several known kinase inhibitors and evaluate by cytometry the level of both IL-6 and IL-8 cytokines. In the light of the activation of IL-1 pathway in P-NALD/ACOX1-deficient fibroblasts, induced IL-6 is mostly addressed to the medium (Fig. 4A). By using PD 98059, a selective noncompetitive inhibitor of the MAPK kinase (MAPKK), we have shown the inhibition of secreted IL-6. This result was confirmed by P-NALD fibro-

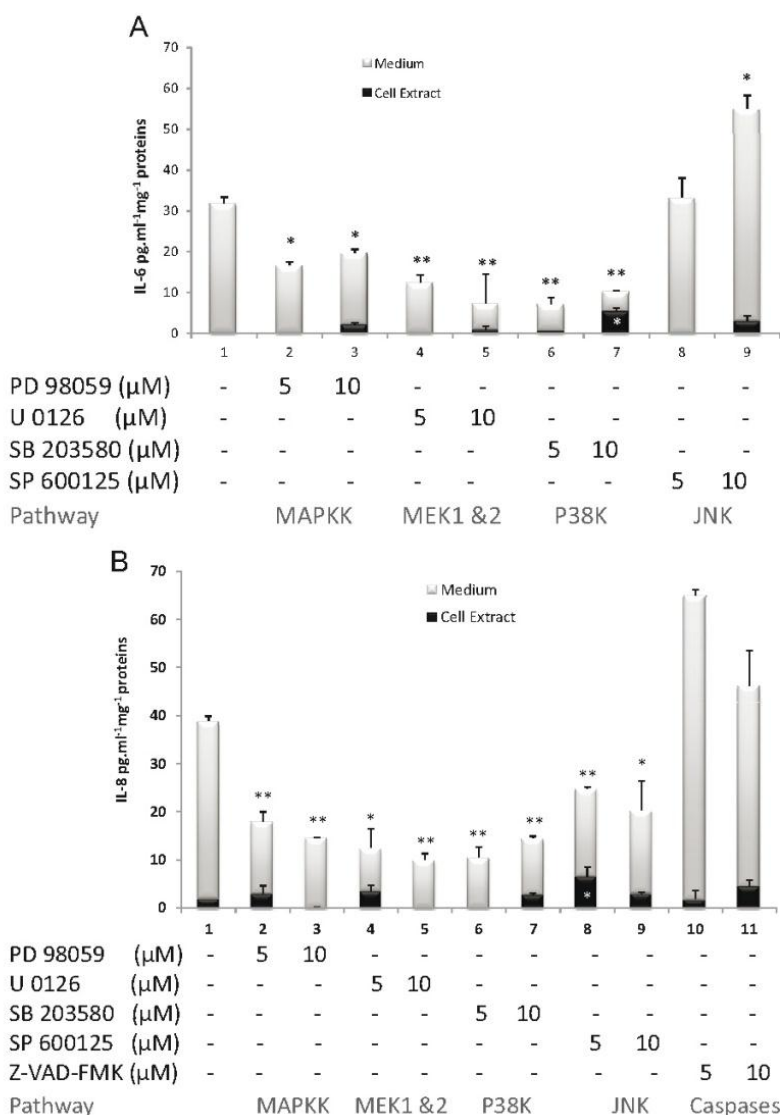


FIG. 4. Regulation of IL-6 (A) and IL-8 (B) cytokines in P-NALD fibroblasts by kinases inhibitors. P-NALD fibroblasts were treated with the indicated concentration of kinase inhibitors for 24 h. Culture media and fibroblasts were collected separately. Cells were washed in PBS solution. The media and the cell pellet were deep frozen at -80 C until analysis. Values are mean ± sd. Statistical significance of higher mean signal intensity (**, $P < 0.01$; *, $P < 0.05$) compared with the control. MEK, MAP kinase or extracellular signal-regulated kinase.

blasts exposure to another MAPKK inhibitor, U0126 (Fig. 4A). Likewise, SB 203580, a highly specific inhibitor of p38 MAPKK, decreased IL-6 secretion as well. Similarly, PD 98059, U0126, and SB 203580 molecules inhibited IL-8 expression in P-NALD fibroblasts (Fig. 4). On the other hand, treatment with SP600125 compound, a selective Jun kinases (JNK) inhibitor, exhibited differential effects on IL-6 and IL-8 secretions by decreasing only IL-8 secretion (Fig. 4, A and B). Regarding the activation of IL-1 pathway in P-NALD fibroblasts, the induction of IL-8 seems to be dependent on

the activation of p38MAPK and JNK kinase. Hence, IL-1 transduction cascade through these kinases has been shown for both IL-8 and CCL3 (47). In addition, the implication of nuclear factor κ B signaling pathway is not excluded, because C/EBP β -dependent transcriptional induction of chemokines by IL-1 is triggered through the activation of p38 MAPK and inhibitor of κ B kinase (40). Accordingly, we also reported (Supplemental Table 1) that the mRNA increase of TNF receptor-associated factor 6, which is known as an IL-1 control relay, functions as signal transducer of inhibitor of κ B kinase (48).

Conclusions

Although precise role of VLCFA accumulation in P-NALD demyelination remains to be determined, their ability to induce an inflammatory response adds further evidence to the role of peroxisomal β -oxidation in the maintenance of cellular homeostasis. Therefore, the reported results in the present report highlight that in P-NALD, ACOX1 deficiency is associated with significant alterations in the inflammatory response leading to the activation of IL-1 pathway. Such activation is triggering the induction of both IL-6 and IL-8 cytokines mostly through MAPK and p38 MAPKK, in addition to the possible role of JNK kinase in IL-8 induction. Our results also suggested a feed-forward mechanism leading to an additional down-regulation of peroxisomal VLCFA β -oxidation by the produced cytokines, which may aggravates the inflammatory picture in P-NALD.

These results open a way to explore the modulation of kinase pathway in an attempt to reduce the inflammatory process in this orphan disease.

Acknowledgments

We thank Dr. Joseph Vamecq (Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, University of Lille 2, Lille, France) for valuable discussions.

Address all correspondence and requests for reprints to: Mustapha Cherkaoui-Malki, Laboratoire de Biochimie du Peroxysome, Inflammation et Métabolisme Lipidique, Université de Bourgogne, 6 Boulevard Gabriel, Dijon F-21000, France. E-mail: malki@u-bourgogne.fr.

This work was supported by grants from the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, the Conseil Régional de Bourgogne, the Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche, and the Centre National de la Recherche Scientifique.

Disclosure Summary: The authors have nothing to disclose.

References

- Wanders RJ, Waterham HR 2006 Peroxisomal disorders: the single peroxisomal enzyme deficiencies. *Biochim Biophys Acta* 1763:1707–1720
- Oaxaca-Castillo D, Androletti P, Vluuggens 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* 360:314–319
- Poll-The BT, Roels F, Ogier H, Scotto J, Vamecq J, Schutgens RB, Wanders RJ, van Roermund CW, van Wijland MJ, Schram AW, Tager JM, Saudubrayet J-M 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
- 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* 94:526–531
- Suzuki Y, Shimozawa N, Yajima S, Tomatsu S, Kondo N, Nakada Y, Akaboshi S, Lai M, Tanabe Y, Hashimoto T, Wanders RJA, Schutgens RBH, Moser HW, Orii T 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
- Guerroui S, Aubourg P, Chen WW, Hashimoto T, Scotto J 1989 Molecular analysis of peroxisomal β -oxidation enzymes in infants with peroxisomal disorders indicates heterogeneity of the primary defect. *Biochem Biophys Res Commun* 161:242–251
- Ferdinandusse S, Denis S, Hogenhout EM, Koster J, van Roermund CW, IJlst L, Moser AB, Wanders RJ, Waterham HR 2007 Clinical, biochemical, and mutational spectrum of peroxisomal acyl-coenzyme A oxidase deficiency. *Hum Mutat* 28:904–912
- Vluuggens A, Androletti 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 2010 Reversal of mouse Acyl-CoA oxidase 1 (ACOX1) null phenotype by human ACOX1b isoform [corrected]. *Lab Invest* 90:696–708
- Varanasi U, Chu R, Chu S, Espinosa R, LeBeau MM, Reddy JK 1994 Isolation of the human peroxisomal acyl-CoA oxidase gene: organization, promoter analysis, and chromosomal localization. *Proc Natl Acad Sci USA* 91:3107–3111
- Rosewich H, Waterham HR, Wanders RJ, Ferdinandusse S, Henneke M, Hunneman D, Gärtner J 2006 Pitfall in metabolic screening in a patient with fatal peroxisomal β -oxidation defect. *Neuropediatrics* 37:95–98
- Fan CY, Pan J, Chu R, Lee D, Kluckman KD, Usuda N, Singh I, Yeldandi AV, Rao MS, Maeda N, Reddy JK 1996 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, Usuda N, Yeldandi AV, Rao MS, Reddy JK 1998 Steatohepatitis, spontaneous peroxisome proliferation and liver tumors in mice lacking peroxisomal fatty acyl-CoA oxidase. Implications for peroxisome proliferator-activated receptor α natural ligand metabolism. *J Biol Chem* 273:15639–15645
- Huang J, Viswakarma N, Yu S, Jia Y, Bai L, Vluuggens A, Cherkaoui-Malki M, Khan M, Singh I, Yang G, Rao MS, Borensztajn J, Reddy JK 2011 Progressive endoplasmic reticulum stress contributes to hepatocarcinogenesis in fatty acyl-CoA oxidase 1-deficient mice. *Am J Pathol* 179:703–713
- Cherkaoui-Malki M, Meyer K, Cao WQ, Latruffe N, Yeldandi AV, Rao MS, Bradfield CA, Reddy JK 2001 Identification of novel peroxisome proliferator-activated receptor α (PPAR α) target genes in mouse liver using cDNA microarray analysis. *Gene Expr* 9:291–304
- McGuinness MC, Griffin DE, Raymond GV, Washington CA, Moser HW, Smith KD 1995 Tumor necrosis factor- α and X-linked adrenoleukodystrophy. *J Neuroimmunol* 61:161–169
- 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
- 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
- Powers JM, Liu Y, Moser AB, Moser HW 1992 The inflammatory myelinopathy of adrenoleukodystrophy: cells, effector molecules, and pathogenetic implications. *J Neuropathol Exp Neurol* 51:630–643
- 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* 71:78–87
- Baarine M, Ragot K, Genin EC, El Hajj H, Tromprier D, Androletti 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
- Meuter S, Schærli P, Roos RS, Brandau O, Bösl MR, von Andrian UH, Moser B 2007 Murine CXCL14 is dispensable for dendritic cell function and localization within peripheral tissues. *Mol Cell Biol* 27:983–992
- Karin N 2010 The multiple faces of CXCL12 (SDF-1 α) in the regulation of immunity during health and disease. *J Leukoc Biol* 88:463–473
- Allan SM, Rothwell NJ 2001 Cytokines and acute neurodegeneration. *Nat Rev Neurosci* 2:734–744
- Dinarello CA 1994 The interleukin-1 family: 10 years of discovery. *FASEB J* 8:1314–1325
- Hope S, Melle I, Aukrust P, Steen NE, Birkenaes AB, Lorentzen S, Agartz I, Ueland T, Andreassen OA 2009 Similar immune profile in bipolar disorder and schizophrenia: selective increase in soluble tumor necrosis factor receptor I and von Willebrand factor. *Bipolar Disord* 11:726–734
- Lock C, Hermans G, Pedotti R, Brendolan A, Schadt E, Garren H, Langer-Gould A, Strober S, Cannella B, Allard J, Klonowski P, Austin A, Lad N, Kaminski N, Galli SJ, Oksenberg JR, Raine CS, Heller R, Steinman L 2002 Gene-microarray analysis of multiple sclerosis lesions yields new targets validated in autoimmune encephalomyelitis. *Nat Med* 8:500–508
- Li H, Chen J, Huang A, Stinson J, Heldens S, Foster J, Dowd P, Gurney AL, Wood WI 2000 Cloning and characterization of IL-17B and IL-17C, two new members of the IL-17 cytokine family. *Proc Natl Acad Sci USA* 97:773–778
- Jin CH, Miyaura C, Ishimi Y, Hong MH, Sato T, Abe E, Suda T 1990 Interleukin 1 regulates the expression of osteopontin mRNA by osteoblasts. *Mol Cell Endocrinol* 74:221–228

29. Lee SK, Park JY, Chung SJ, Yang WS, Kim SB, Park SK, Park JS 1998 Chemokines, osteopontin, ICAM-1 gene expression in cultured rat mesangial cells. *J Korean Med Sci* 13:165–170
30. Wang KX, Denhardt DT 2008 Osteopontin: role in immune regulation and stress responses. *Cytokine Growth Factor Rev* 19:333–345
31. Meller R, Stevens SL, Minami M, Cameron JA, King S, Rosenzweig H, Doyle K, Lessov NS, Simon RP, Stenzel-Poore MP 2005 Neuroprotection by osteopontin in stroke. *J Cereb Blood Flow Metab* 25:217–225
32. Carecchio M, Comi C 2011 The role of osteopontin in neurodegenerative diseases. *J Alzheimers Dis* 25:179–185
33. Skuljec J, Sun H, Pul R, Bénardais K, Ragancokova D, Moharreghe-Khiabani D, Kotsiari A, Trebst C, Stangel M 2011 CCL5 induces a pro-inflammatory profile in microglia in vitro. *Cell Immunol* 270:164–171
34. Szczuciski A, Losy J 2007 Chemokines and chemokine receptors in multiple sclerosis. Potential targets for new therapies. *Acta Neurol Scand* 115:137–146
35. Rodriguez-Juan C, Pérez-Blas M, Valeri AP, Aguilera N, Arnaiz-Villena A, Pacheco-Castro A, Martin-Villa JM 2001 Cell surface phenotype and cytokine secretion in Caco-2 cell cultures: increased RANTES production and IL-2 transcription upon stimulation with IL-1 β . *Tissue Cell* 33:570–579
36. Lu P, Nakamoto Y, Nemoto-Sasaki Y, Fujii C, Wang H, Hashii M, Ohmoto Y, Kaneko S, Kobayashi K, Mukaida N 2003 Potential interaction between CCR1 and its ligand, CCL3, induced by endogenously produced interleukin-1 in human hepatomas. *Am J Pathol* 162:1249–1258
37. Ambrosini E, Remoli ME, Giacomini E, Rosicarelli B, Serafini B, Lande R, Aloisi F, Coccia EM 2005 Astrocytes produce dendritic cell-attracting chemokines in vitro and in multiple sclerosis lesions. *J Neuropathol Exp Neurol* 64:706–715
38. Wuyts WA, Vanaudenaerde BM, Dupont LJ, Demedts MG, Verleden GM 2003 Involvement of p38 MAPK, JNK, p42/p44 ERK and NF- κ B in IL-1 β -induced chemokine release in human airway smooth muscle cells. *Respir Med* 97:811–817
39. Xia MQ, Qin SX, Wu LJ, Mackay CR, Hyman BT 1998 Immunohistochemical study of the β -chemokine receptors CCR3 and CCR5 and their ligands in normal and Alzheimer's disease brains. *Am J Pathol* 153:31–37
40. Zhang Z, Bryan JL, DeLassus E, Chang LW, Liao W, Sandell LJ 2010 CCAAT/Enhancer-binding protein β and NF- κ B mediate high level expression of chemokine genes CCL3 and CCL4 by human chondrocytes in response to IL-1 β . *J Biol Chem* 285:33092–33103
41. Burns K, Clatworthy J, Martin L, Martinon F, Plumpton C, Maschera B, Lewis A, Ray K, Tschopp J, Volpe F 2000 Tollip, a new component of the IL-1RI pathway, links IRAK to the IL-1 receptor. *Nat Cell Biol* 2:346–351
42. Zhang G, Ghosh S 2002 Negative regulation of toll-like receptor-mediated signaling by Tollip. *J Biol Chem* 277:7059–7065
43. Didierlaurent A, Brissoni B, Velin D, Aebi N, Tardivel A, Käslin E, Sirard JC, Angelov G, Tschopp J, Burns K 2006 Tollip regulates proinflammatory responses to interleukin-1 and lipopolysaccharide. *Mol Cell Biol* 26:735–742
44. Abonyo BO, Lebby KD, Tonry JH, Ahmad M, Heiman AS 2006 Modulation of eotaxin-3 (CCL26) in alveolar type II epithelial cells. *Cytokine* 36:237–244
45. Tacke F, Zimmermann HW, Trautwein C, Schnabl B 2011 CXCL5 plasma levels decrease in patients with chronic liver disease. *J Gastroenterol Hepatol* 26:523–529
46. Tanegashima K, Okamoto S, Nakayama Y, Taya C, Shitara H, Ishii R, Yonekawa H, Minokoshi Y, Hara T 2010 CXCL14 deficiency in mice attenuates obesity and inhibits feeding behavior in a novel environment. *PLoS One* 5:e10321
47. Takemura M, Itoh H, Sagawa N, Yura S, Korita D, Kakui K, Hirota N, Fujii S 2004 Cyclic mechanical stretch augments both interleukin-8 and monocyte chemoattractant protein-1 production in the cultured human uterine cervical fibroblast cells. *Mol Hum Reprod* 10:573–580
48. Huang Q, Yang J, Lin Y, Walker C, Cheng J, Liu ZG, Su B 2004 Differential regulation of interleukin 1 receptor and Toll-like receptor signaling by MEK3. *Nat Immunol* 5:98–103

Chapitre II : Métabolisme du cholestérol dans le cadre de la déficience en ACOX1

A. Introduction du chapitre

Une des caractéristiques biochimiques chez les patients atteints de P-NALD est l'accumulation des AGTLC dans le plasma et les tissus. Cette accumulation est liée à la déficience de l'activité ACOX1, enzyme de la β -oxydation peroxysomale. A cause de la déficience en ACOX1, le système de β -oxydation ne peut pas prendre ces acides gras en charge. Les AGTLC, tels que l'acide hexacosanoïque (C26:0), sont toxiques pour la cellule qui mobilise son système d'estérification pour neutraliser leur nocivité. Une des voies d'estérification cellulaire est la formation des acyl-esters de cholestérol. Le lien entre la formation d'esters de cholestérol et l'accumulation des AGTLC n'est pas élucidé, mais l'augmentation de la synthèse du cholestérol pourrait participer à la diminution de la charge cellulaire en AGTLC toxiques pour la cellule. Il a été montré une augmentation des esters de cholestérol (EC) chez les patients X-ALD au niveau plasmatique et au niveau des lésions cérébrales (Paintlia et al., 2003). L'augmentation d'EC se traduit par une diminution du cholestérol libre et nécessiterait une augmentation de la synthèse du cholestérol pour palier au besoin cellulaire. Dans ce sens, nous avons exploré dans ce chapitre au niveau génique l'expression d'un certain nombre de gènes impliqués dans le métabolisme de cholestérol.

Le cholestérol est un composant majeur des membranes cellulaires contribuant à leur stabilité et au maintien de leur structure et est critique pour la viabilité et le développement des cellules. Le cholestérol est aussi le précurseur à partir duquel les stéroïdes, les acides biliaires, l'hème A, l'ubiquinone et les oxystérols sont synthétisés.

A.1. Voie de la biosynthèse du cholestérol

La synthèse du cholestérol est un processus long nécessitant plus de 30 réactions chimiques différentes (Figure 20, **p142**). Au cours de la première étape de la synthèse, deux molécules d'acétyl-CoA sont condensées par l'acétoacétyl-CoA thiolase (ACAT) pour former l'acétoacétyl-CoA. Une autre molécule d'acétyl-CoA est ajoutée à l'acétoacétyl-CoA par la HMG-CoA synthase pour former le 3-hydroxy-3-méthylglutaryl-Coenzyme A (HMG-CoA). La réaction qui suit est catalysée par la HMG-CoA réductase, l'enzyme limitante de la voie de biosynthèse du cholestérol. Au cours de cette réaction à deux étapes, le HMG-CoA est converti en mévalonate. Le mévalonate est ensuite phosphorylé par la mévalonate kinase (MVK) en mévalonate-5-phosphate qui sera phosphorylé de nouveau par la phosphomévalonate kinase (PMVK) en mévalonate-5-diphosphate. Ce produit est par la suite déshydraté puis décarboxylé par la mévalonate pyrophosphate décarboxylase (MPPD) pour former l'isopentényl diphosphate. La double liaison de l'isopentényl diphosphate est

isomérisée de manière réversible par l'isopentényl diphosphate isomérase (IPP ou IDI1) et sert pour la réaction de condensation catalysée par la farnésyl diphosphate (FPPS ou FDPS) synthase pour former le farnésyl diphosphate. Deux molécules de FPP sont condensées et réduites par la squalène synthase (FDFT1) en squalène. Le squalène est ensuite converti en lanostérol par les activités squalène époxydase (SQLE) et l'oxydosqualène cyclase. Finalement, le lanostérol va servir pour la synthèse du cholestérol à travers au moins 19 réactions au cours desquelles les 3 groupes méthyl du lanostérol seront éliminés et les doubles liaisons seront réduites.

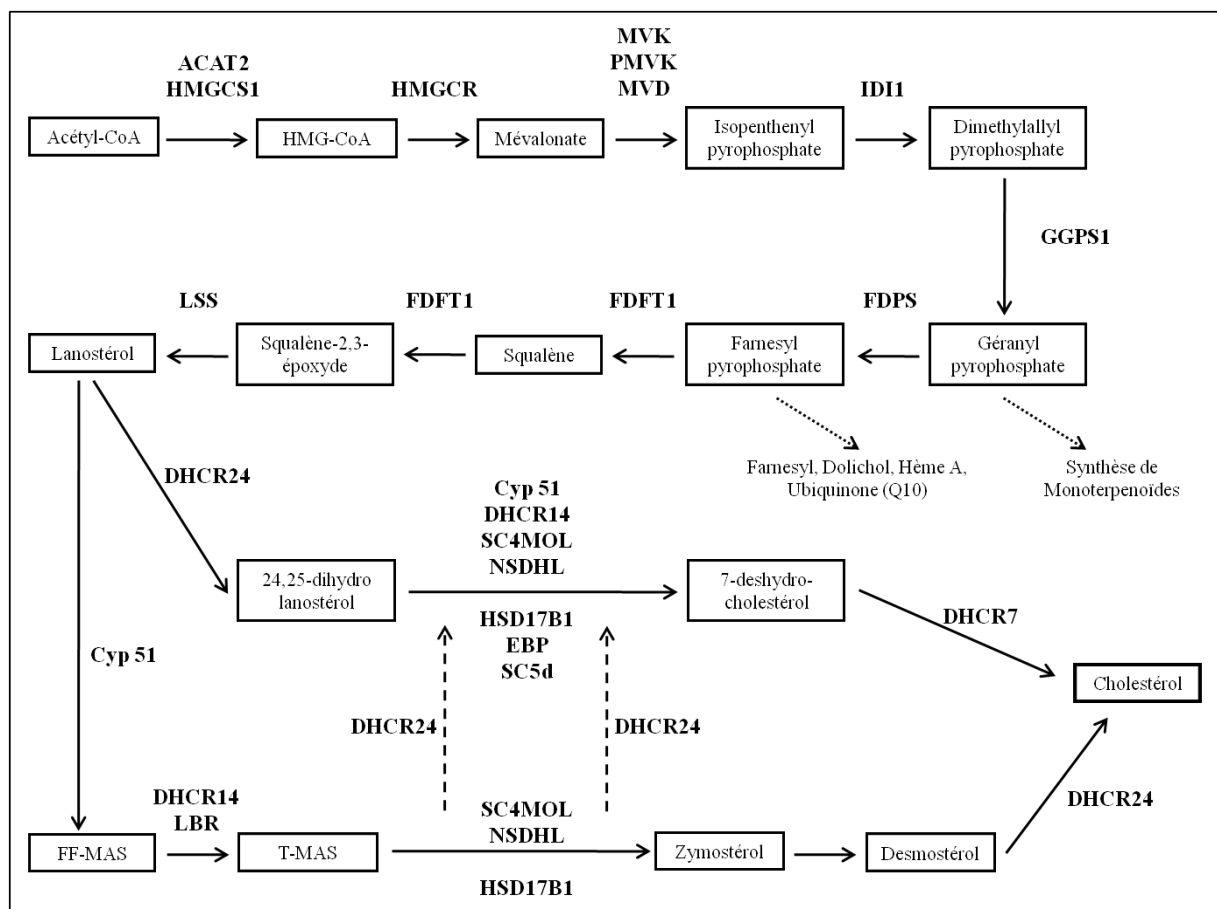


Figure 20. Représentation schématique de la voie de synthèse du cholestérol.

Les enzymes participant à la synthèse du cholestérol sont mentionnées en gras. ACAT 2, Acétyl-Coenzyme A Acetyltransférase 2; HMGCS1, 3 β -hydroxy-3-méthylglutaryl-Coenzyme A synthase 1; PMVK, Phosphomevalonate kinase; MVD, Mevalonate (diphospho) decarboxylase; IDI1, Isopentenyl-diphosphate delta isomérase 1; GGPS1, Géranyl-géranyl pyrophosphate synthase 1; FDPS, Farnésyl diphosphate synthase; SQLE, Squalène époxydase; LSS, Lanostérol synthase (2,3-oxidosqualene-lanostérol cyclase); DHCR14, 14-déhydrocholestérol réductase; LBR, Lamine B Receptor; 14-déhydrocholestérol réductase; SC4MOL, Sterol-C4-méthyl oxidase-like; FF-MAS, Follicular Fluid-Meosis Activating Sterols; T-MAS, Testes-Meosis Activating Sterols; Cyp51, cytochrome P450 Sterol 14- α déméthylase; EBP, Emopamil binding protein; HSD17B1, Human estrogenic 17- β -hydroxystéroïd déhydrogénase; NSDH 1, NAD(P)-dépendant stéroïd déhydrogénase-like. Adaptée de (Horvat et al., 2011).

A.2. Régulation de la Voie de biosynthèse du cholestérol

La famille des facteurs de transcription SREBPs (ou Sterol Regulatory Element Binding Proteins) joue un rôle central dans la régulation de la synthèse du cholestérol (Figure 21). Chez l'homme, SREBP-1a et SREBP-1c sont produits par l'épissage alternatif du même gène (Goldstein et al., 2006). SREBP-1c active préférentiellement les gènes impliqués dans la synthèse des acides gras et des triglycérides alors que SREBP-2 active les gènes nécessaires pour la synthèse du cholestérol tels que la HMG-CoA réductase, l'IPP isomérase, la FPP synthase et la lanostérol synthase. Les SREBPs sont présents sous forme inactive dans la membrane du réticulum endoplasmique grâce à leur interaction avec le senseur de stérols SCAP (ou Sterol Cleavage-Activating Protein). En présence d'un taux élevé de cholestérol, SCAP reste ancré dans la membrane du RE grâce à son interaction avec la protéine INSIG (Insulin Induced Gene). Un faible taux de cholestérol dans la membrane provoque le transport

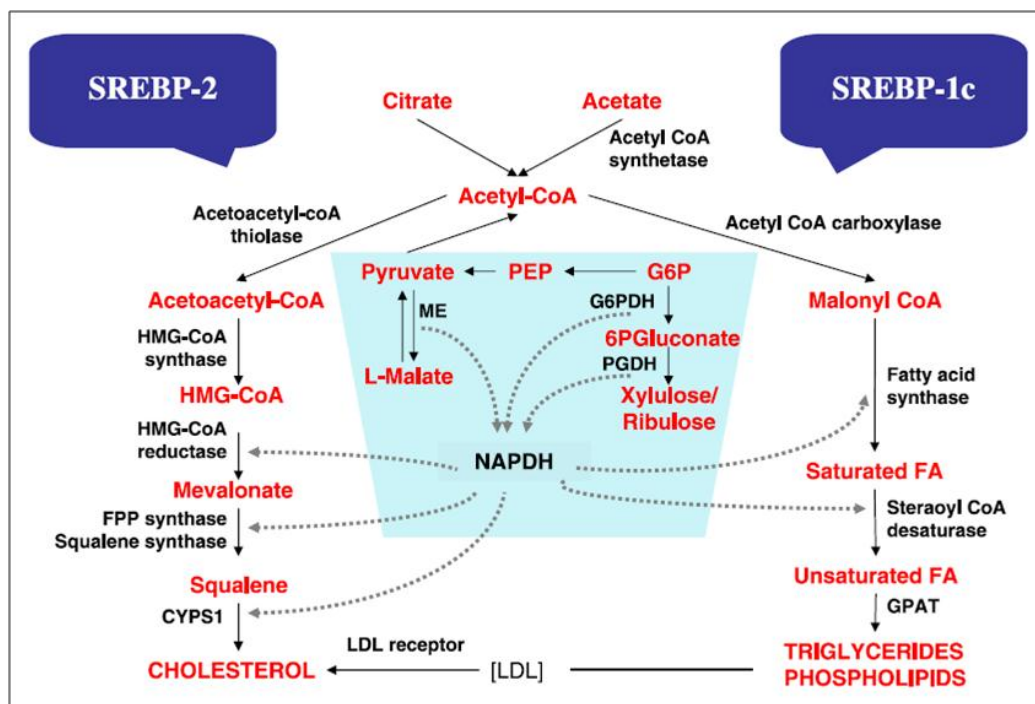


Figure 21. Implication des Sterol response element binding protein SREBP-2 and SREBP-1c respectivement dans la voie de synthèse du cholestérol et des acides gras.

SREBP-1c active les gènes codant les enzymes impliquées dans la synthèse des acides gras et la formation des triglycérides et des phospholipides (droite). SREBP-2 stimule la transcription des gènes codant les enzymes impliquées dans la synthèse de cholestérol (gauche). La NADPH est indispensable pour ces 2 voies (milieu). SREBP-1c et SREBP-2 régulent les 3 enzymes qui participent à ces réactions, i.e., enzyme malique (ME), glucose-6-phospho-déshydrogénase (G6PDH), et 6-phosphogluconate déshydrogénase (PGDH). D'après (Desvergne et al., 2006).

de SCAP/SREBP vers la membrane de l'appareil de Golgi où les SREBPs acquièrent leurs maturations et deviennent actifs (Horton et al., 2003). Les INSIGs (INSIG1 et INSIG2) sont des protéines de la membrane du RE qui réduisent la synthèse du cholestérol en bloquant le complexe SCAP-SREBP et en induisant la dégradation de la HMG-CoA réductase (Goldstein et al., 2006). Le gène codant l'INSIG1 est une cible de SREBP alors qu'INSIG2 est exprimé de manière constitutive (Yabe et al., 2002).

A.2. Peroxysome et voie de synthèse du cholestérol

Le rôle du peroxysome dans la voie de synthèse du cholestérol reste jusqu'à présent un sujet controversé chez l'homme. Étant donné le rôle important du peroxysome pour la santé, plusieurs voies métaboliques importantes ont été attribuées aux peroxysomes. Parmi ces voies, la voie de la biosynthèse du cholestérol a été revendiquée pour être peroxysomale alors que la localisation des composants de cette voie est reconnue depuis plusieurs décennies à être partagée entre le cytosol et le RE.

Chez le rat, au niveau du foie, plusieurs études avaient montré une localisation peroxysomale de plusieurs enzymes participant à la voie de synthèse du cholestérol telles que l'ACAT (Hovik et al., 1991; Thompson et Krisans, 1990), l'HMG-CoA réductase (Keller et al., 1985; Keller et al., 1986), la MVK (Biardi et al., 1994; Stamellos et al., 1992) et la FDPS (Krisans et al., 1994). En plus, l'analyse des séquences protéiques a montré la présence d'un signal d'adressage PTS1 en C-terminale pour IDI1 chez le rat et le hamster (Paton et al., 1997) et pour la PMVK chez l'homme et la souris (Olivier et al., 1999). Cette même analyse a été effectuée pour 4 autres enzymes impliquées dans la synthèse du cholestérol et a montré pour ACAT des signaux d'adressages, mitochondrial et peroxysomal (PTS1), pour la HMG-CoA synthase, la MPPD et la MVK l'existence des signaux PTS2 inhabituels (Olivier et al., 2000). Seule la séquence protéique de la FPP ne présente pas un signal d'adressage au peroxysome suggérant que cette protéine se polymérise avec des protéines possédant des signaux d'adressage pour se localiser au niveau du peroxysome (Olivier et al., 2000). Ces résultats suggéraient que la conversion du mévalonate en FPP a lieu dans le peroxysome (Krisans et al., 1994).

Bien plus que les études menées sur ces enzymes pour leurs localisations subcellulaires, les activités enzymatiques de la MVK, la PMVK, la MPD, l'IDI1 et la FPP ont été mesurées dans les foies de patients atteints de syndrome de Zellweger (ZS) et d'adrénoleucodystrophie néonatale (NALD). Ces activités ont été trouvées diminuées chez ces patients (Krisans et al.,

1994). D'autres études ont souligné le rôle important du peroxyosome dans la synthèse du cholestérol en montrant la diminution de la synthèse dans des fibroblastes déficients en peroxyosomes (Hodge et al., 1991). Dans les plasmas de patients présentant des désordres peroxyosomaux, la concentration de cholestérol a été trouvée diminuée (Poulos et Sharp, 1984). Cependant, des conclusions contradictoires ont été tirées d'études menées sur des fibroblastes de trois types différents de déficiences peroxyosomales (type I: ZS et NALD ; type II: X-ALD et adrénomyélongueuropathie ; type II: RCDP). En effet, ces fibroblastes sont capables de synthétiser le cholestérol à des niveaux comparables aux contrôles suggérant que le peroxyosome ne joue pas ou peu un rôle dans la voie de synthèse (Malle et al., 1995). Les cellules CHO mutées pour Pex2, ont montré une réduction de l'activité totale HMGCR et un taux diminué de la biosynthèse de cholestérol et de dolichol (Aboushadi et Krisans, 1998).

Chez les souris déficientes en peroxine 2 (*Pex2*^{-/-}), la concentration en cholestérol total dans le plasma et dans le foie est trouvée diminuée. Cette diminution n'est pas le résultat du catabolisme du cholestérol en acides biliaires. La déficience en peroxyosome (Kovacs et al., 2004) chez ces souris, aboutirait à une incapacité à maintenir un taux normal du cholestérol dans le plasma et dans le foie accompagnée d'une perturbation du mécanisme de régulation de l'homéostasie du cholestérol (Kovacs et al., 2004) par induction de SREBP-2 et de ces gènes cibles et de la biosynthèse du cholestérol dans la plupart des tissus (Figure 22, **p146**). Cette perturbation pourrait être liée au stress du RE. En effet, la déficience en peroxyosome induirait un stress du RE (médiée par PERK et ATF4) ce qui dérégulerait les expressions de SREBP-2, SREBP-1c et INSIG-1c et aboutirait à la dérégulation et à l'activation de la voie endogène de la régulation des stérols (Kovacs et al., 2009). La ré-investigation de la localisation des enzymes de la biosynthèse du cholestérol a montré une localisation peroxyosomale de l'acétoacétyl-CoA jusqu'au FPP (Kovacs et al., 2007) selon le schéma décrit par la Figure 22. La réponse à la question quant à la localisation des enzymes de la voie de synthèse du cholestérol a été aussi étudiée dans les travaux de Hogenboom *et coll.*, en 2004 (Hogenboom et al., 2004) grâce aux différentes approches biochimiques et microscopiques. Ces travaux ont montré que la MVK endogène ou surexprimée dans les cellules humaines, était localisée dans le cytosol. De plus, l'analyse de la structure cristalline de la MVK chez le rat a montré qu'une molécule d'ATP se liait à cette enzyme et que le motif du signal PTS2 putatif en N-ter de la MVK n'était qu'une partie du site de liaison à l'ATP (Fu et al 2002, Potter et al, 1997). Ajouté à cela, ce motif est conservé dans la MVK chez les archéobactéries et les eubactéries qui sont dépourvus de peroxyosomes (Houten et al, 2000). Chez l'homme, la PMVK a été

trouvée dans le cytosol et non pas dans le peroxyosome (Hogenboom et al., 2004). Ces résultats, en contradiction avec les résultats des études précédentes dans le foie du rat suggèrent que le peroxyosome ne joue pas un rôle central dans la biosynthèse des isoprénoïdes/cholestérol et que cette voie ne requiert pas de peroxyosomes fonctionnels.

En effet, cette analyse a été effectuée sur les fibroblastes de patient (P2) et les deux fibroblastes contrôles (C et C1). L'étude des expressions des différents gènes appartenant à la voie de synthèse, de dégradation et de régulation de la synthèse du cholestérol a été réalisée dans un premier temps avec des puces à ADN (collaboration avec Pr. Kersten Sander, Université de Wageningen, Pays-Bas). Dans un deuxième temps, les expressions des gènes clés de cette voie ont été confirmées par PCR quantitative.

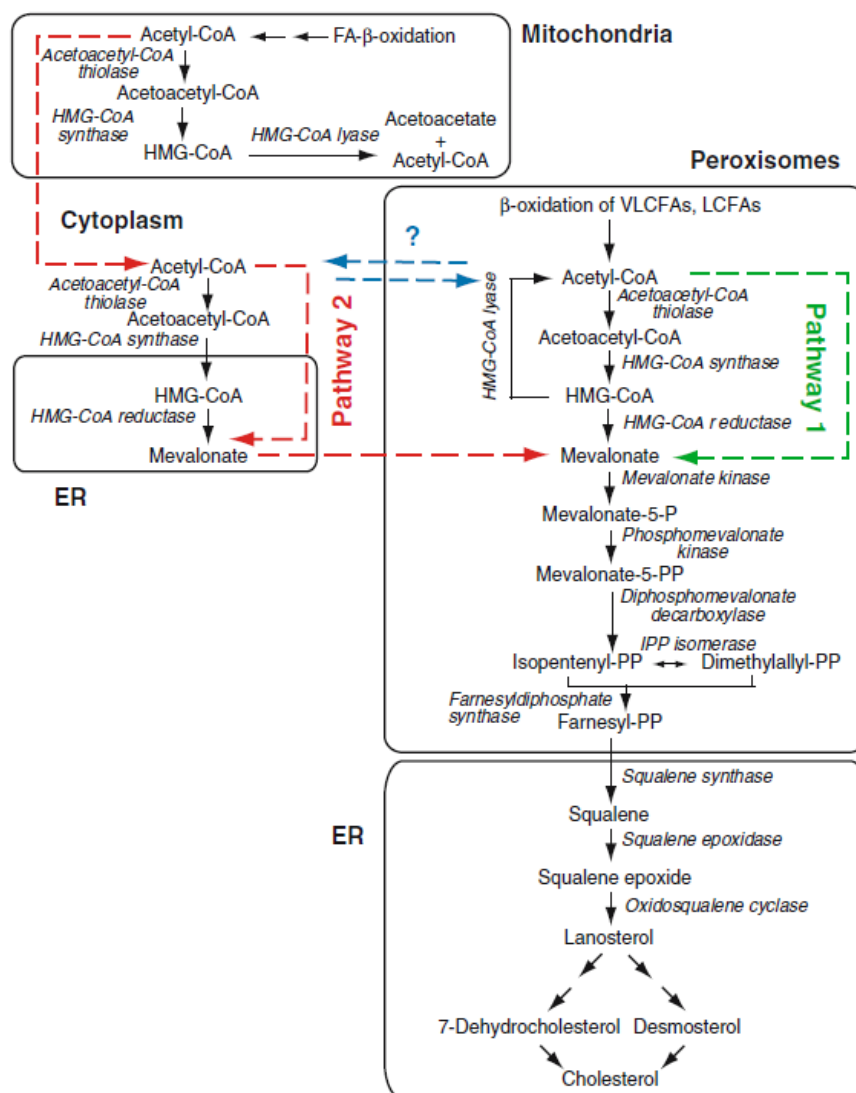


Figure 22. Représentation schématique de la voie de synthèse du cholestérol avec la répartition subcellulaire des enzymes de la voie. (ER=réticulum endoplasmique). D'après (Kovacs et al., 2007)

B. Analyse d'expression de gènes du métabolisme du cholestérol dans les lignées de fibroblastes

B.1. Voie de synthèse du cholestérol

L'analyse transcriptomique par puce à ADN réalisée sur les ARNm extraits de fibroblastes de patient P-NALD et comparés aux fibroblastes contrôles montre une induction d'un ensemble de gènes de la voie de synthèse du cholestérol (Tableau 4). Dans les fibroblastes de patient, la plupart des gènes sont induits de l'ordre de 2 à 4 fois tels que les gènes de l'ACAT2, l'HMGCS1, l'HMGCR, la MVD, l'IDI1, la FDPS, la FDFT1, la SQLE, la LSS, la CYP51A1, la SCAMOL et la HSD17B7. D'autres gènes sont fortement induits de l'ordre de 5 à 9 fois, comme les gènes de la DHCR7, l'EBP et l'autre variante de la LSS. Parmi les gènes de la voie de synthèse du cholestérol, certains sont faiblement induits comme l'HMGCL et la MVK. Cependant, la deuxième variante du gène de l'ACAT2 et celle de la PMVK ne sont pas induites et montrent une expression comparable aux contrôles. Ces résultats indiquent l'induction, au moins par étude transcriptomique, de la voie de biosynthèse du cholestérol dans les fibroblastes de patient P-NALD.

Tableau 4. Niveaux d'expressions des gènes de la voie de synthèse du cholestérol dans les fibroblastes de patient P2 (n=1) normalisés par rapport à la lignée contrôle (n=1) par analyse transcriptomique par puces à ADN.

Gène	Numéro d'accion	Description	Facteur d'induction
ACAT2	BC000408	acetyl-Coenzyme A acetyltransferase 2 (acetoacetyl Coenzyme A thiolase)	2,59
ACAT2	BF224073	acetyl-Coenzyme A acetyltransferase 2 (acetoacetyl Coenzyme A thiolase)	0,97
HMGCS1	BG035985	3-hydroxy-3-methylglutaryl-Coenzyme A synthase 1	3,82
HMGCR	NM_000859	3-hydroxy-3-methylglutaryl-Coenzyme A reductase	3,31
HMGCL	NM_000191	3-hydroxymethyl-3-methylglutaryl-Coenzyme A lyase	1,58
MVK	M88468	mevalonate kinase	1,13
PMVK	NM_006556	phosphomevalonate kinase	0,96
MVD	AI189359	mevalonate (diphospho) decarboxylase	2,76
IDI1	BC005247	isopentenyl-diphosphate delta isomerase 1	3,79
FDPS	NM_002004	farnesyl diphosphate synthase (farnesyl pyrophosphate synthetase)	3,98
FDFT1	AA872727	farnesyl-diphosphate farnesyltransferase 1	2,38
SQLE	AF098865	squalene epoxidase	3,37
LSS	AW084510	lanosterol synthase	2,57
LSS	D63807	lanosterol synthase	9,77
CYP51A1	NM_000786	cytochrome P450, family 51, subfamily A, polypeptide 1	2,01
SC4MOL	AV704962	sterol-C4-methyl oxidase-like	3,33
DHCR7	NM_001360	7-dehydrocholesterol reductase	5,16
EBP	NM_006579	emopamil binding protein (sterol isomerase)	5,30
HSD17B7	NM_016371	hydroxysteroid (17-beta) dehydrogenase 7	3,22

Les expressions des principaux gènes de la voie de synthèse du cholestérol ont été testées en PCR quantitative dans les fibroblastes du patient P-NALD et comparées aux deux lignées de fibroblastes contrôles C et C1 (*Figure 23*). Ces résultats montrent pour le gène codant la 3-hydroxy-3-méthylglutaryl-Coenzyme A réductase (HMGCR) qui catalyse l'étape clé de la synthèse le cholestérol, une forte expression d'environ 12 fois chez le patient comparée au contrôle. De plus, les expressions des gènes de l'isopentényl-diphosphate delta isomérase 1 (IDI1), de la farnésyl-diphosphate farnésyl-transférase 1 (FDFT1) et de la squalène époxydase (SQLE) sont augmentées de manière respective de 3, 7 et 3 fois chez le patient par rapport au contrôle. Cependant, le gène de la farnésyl diphosphate synthase (FDPS) ne montre pas de variation d'expression chez le patient.

Au total, les résultats des puces à ADN et de la PCR quantitative confirment l'induction de l'expression des gènes codant des enzymes de la voie de synthèse du cholestérol en absence d'activité ACOX1 dans les fibroblastes de patient P-NALD.

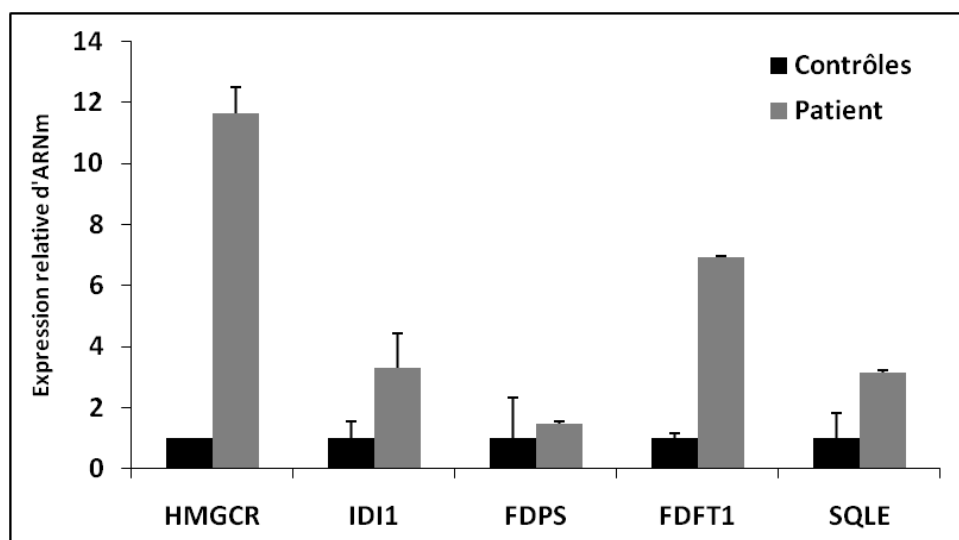


Figure 23. Expression relative des principaux gènes de la voie de synthèse du cholestérol en PCR quantitative. L'expression des gènes dans les fibroblastes P-NALD P2 (n=1) ont été rapportés à la moyenne dans les fibroblastes contrôles (n=2) (deux expériences indépendantes). Les barres d'erreur sur les histogrammes représentent les écarts types.

B.2. Voie de dégradation du cholestérol

Le gène CYP7B1 code le cytochrome P450 de la famille 7 et de la sous-famille B. Cette enzyme de la famille des monooxygénases, catalyse la première réaction de dégradation du cholestérol dans les tissus extrahépatiques qui convertit le cholestérol en acides biliaires. Les résultats de l'analyse transcriptomique (Tableau 5) et de la PCR quantitative (Figure 24) montrent une forte induction des ARNm codant la CYP7B1 dans les fibroblastes P-NALD de l'ordre de 14 fois dans les puces et de 2,5 fois par PCR quantitative.

Tableau 5. Niveau d'expression du gène de la CYP7B1 en puce à ADN dans la lignée de fibroblaste P2 (n=1) normalisé par rapport à la lignée contrôle C (n=1).

Gène	Numéro d'accension	Description	Facteur d'induction
CYP7B1	NM_004820	cytochrome P450, family 7, subfamily B, polypeptide 1	13,92

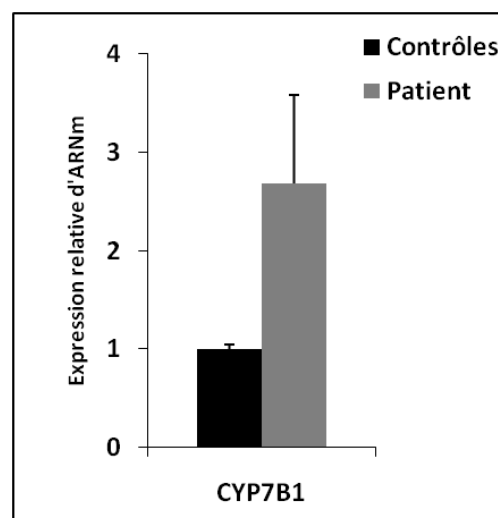


Figure 24. Expression relative du gène de la Cytochrome P450 (CYP7B1) en PCR quantitative.

L'expression des gènes dans les fibroblastes de patient (P2) (n=1) a été rapportée à la moyenne des deux lignées contrôles (n=2) (deux expériences indépendantes). Les barres d'erreur sur les histogrammes représentent les écarts types.

B.3. Régulation du métabolisme du cholestérol

Les gènes codant les facteurs de transcriptions régulant la voie de synthèse du cholestérol ont été analysés dans les fibroblastes P-NALD (P2) et comparés à la lignée contrôle C (puces à ADN) ou aux deux lignées contrôles C et C1 (PCR quantitative).

Tableau 6. Expression des gènes de régulation de la voie de synthèse du cholestérol dans la lignée de patient P2 (n=1) normalisée par rapport à la lignée contrôle C (n=1).

Gène	Numéro d'accension	Description	Facteur d'induction
SOAT1	L21934	sterol O-acyltransferase (acyl-Coenzyme A: cholesterol acyltransferase) 1	2,68
STARD4	AA628398	START domain containing 4, sterol regulated	2,65
SREBF2	BE513151	sterol regulatory element binding transcription factor 2	1,59
SREBF2	AA112403	sterol regulatory element binding transcription factor 2	1,00
SREBF1	NM_004176	sterol regulatory element binding transcription factor 1	0,67
LCAT	AK126271	lecithin-cholesterol acyltransferase	0,56

Les résultats des puces (Tableau 6) montrent chez P2 une induction de deux fois pour les deux gènes SOAT1 et STARD4. En effet, ces deux gènes sont impliqués dans la régulation des taux de cholestérol esters dans la cellule. SREBF2, qui régule positivement STARD4, est également induit de 1,6 fois pour le premier variant (BE513151) mais ne varie pas pour le deuxième variant (AA112403). Cependant, l'expression du gène SREBF1 dans les fibroblastes de patient P-NALD (P2) est réprimée. Chez le patient, les résultats indiquent l'activation du facteur de transcription induisant la synthèse de cholestérol (SREBF2) et sa conversion en ester de cholestérol (SOAT1 et STARD4) et l'inhibition de la synthèse d'acides gras *via* l'inhibition de SREBF1.

Les résultats en qPCR (Figure 25) montrent dans les fibroblastes de patient P-NALD (P2), respectivement, une induction d'environ 8 et 2,5 fois des gènes d'INSIG1 et d'INSIG2. Cette induction paraît contradictoire avec les résultats précédents de l'induction de la synthèse du cholestérol (paragraphe A.1), puisque cette protéine retient la protéine SCAP au niveau de RE empêchant ainsi l'activation de SREBF2 et, par la suite, l'induction des gènes de la voie de synthèse du cholestérol. SREBF1 ainsi que SREPB1c ne montrent pas de variation d'expression de leurs gènes. Cependant, le gène de SREBF2 est induit 4 fois dans les fibroblastes de patient P-NALD (P2).

Ces résultats montrent une forte régulation de la voie de synthèse du cholestérol en absence de l'ACOX1 et l'induction des gènes codant INSIG1 et INSIG2 pourraient être un phénomène de rétrocontrôle afin de diminuer l'activité du facteur de transcription SREBF2 et

par la suite limiter la synthèse du cholestérol et maintenir son homéostasie au sein de la cellule.

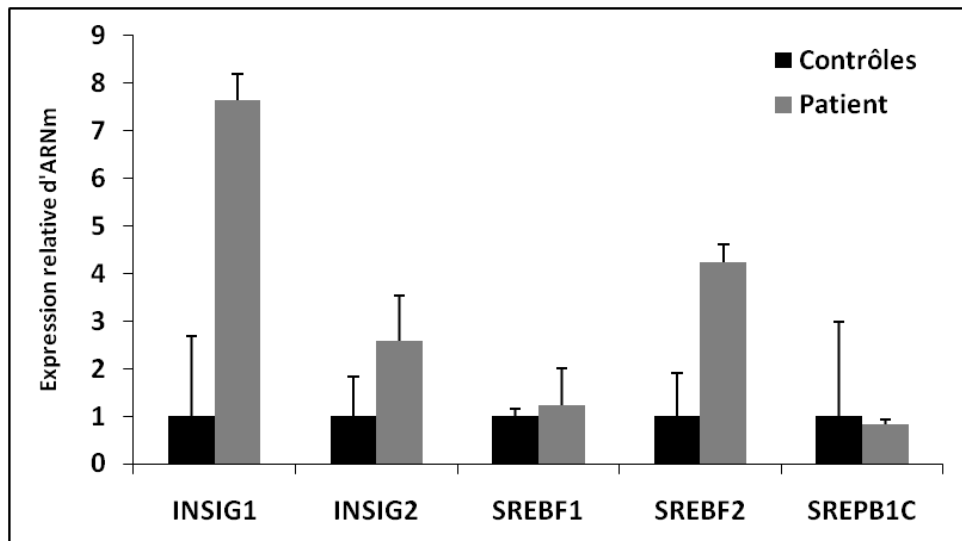


Figure 25. Expression relative des gènes de régulation de la voie de synthèse du cholestérol en PCR quantitative.

L'expression des gènes dans la lignée P2 (n=1) a été rapportée à la moyenne des deux lignées contrôles C et C1 (n=2) (deux expériences indépendantes). Les barres d'erreur sur les histogrammes représentent les écarts types.

C. Conclusions

L'absence d'activité ACOX1 chez les patients P-NALD provoque l'interruption de la β -oxydation peroxysomale et par la suite l'accumulation des AGTLC dans la cellule. Dans les fibroblastes de patient P-NALD, les analyses transcriptomiques par puces à ADN et par PCR quantitative montrent une induction de la voie de synthèse du cholestérol. Bien que cette étude se limite au niveau transcriptionnel, elle pourrait présenter un indice pour une augmentation de la synthèse du cholestérol. La question qui se pose, d'après ces résultats, est celle concernant de l'induction de la voie de synthèse du cholestérol dans les fibroblastes P-NALD avec un taux élevé des AGTLC ? Ceci pourrait être un moyen pour séquestrer les AGTLC sous forme d'esters de cholestérol et empêcher ou réduire leur toxicité. Cependant, on remarque que certains gènes qui régulent négativement la voie de synthèse du cholestérol sont également induits. Il est possible que la cellule essaie de garder le contrôle de cette voie dans le contexte où la cellule n'a pas besoin de synthétiser excessivement du cholestérol pour palier à une déficience en cholestérol mais uniquement pour séquestrer les AGTLC. Cela est explicité par une expression en ARNm similaire entre les fibroblastes de patient et du contrôle pour les facteurs activant les voies de synthèse des acides gras, triglycérides et phospholipides.

Chapitre III : Effets de la déficience en ACOX1 sur les fonctions peroxysomales

A. Introduction

La déficience de l'ACOX1 est associée à la P-NALD. Depuis de nombreuses années, les études menées sur un certain nombre de maladies peroxysomales s'appuient sur l'utilisation de fibroblastes obtenus à partir de patients atteints par cette maladie. L'accès à ces fibroblastes non transformés qu'on appelle parfois lignée par habitude, s'avère capital dans la compréhension des mécanismes moléculaires liés à la déficience de l'ACOX1. Cependant, l'utilisation de ces fibroblastes peut présenter des limitations liées au fonctionnement de ces cellules dont certains aspects métaboliques sont limités. Néanmoins, ces fibroblastes restent le seul matériel vivant issu des patients P-NALD.

Trois lignées de fibroblastes provenant de patients atteints de pseudo-adrénoleucodystrophie néonatale (P-NALD), appelées P3, P4 et P5 (P pour patient), ainsi qu'une lignée fibroblastique provenant d'un sujet sain appelée C1 (C pour contrôle), ont été obtenues auprès de l'institut Coriell pour les recherches médicales (New Jersey, Etats Unis):

- La lignée C1 (référence Coriell: GM3348) provient d'un sujet sain de sexe masculin âgé de 10 ans. Cette lignée non transformée provient d'une biopsie de la peau au niveau de la région inguinale (entre le bas de l'abdomen et la cuisse).
- La lignée de fibroblastes P3 (référence Coriell : GM18346) provient d'un patient âgé d'un an, de sexe féminin, née de parents arrière-cousins. Cette patiente a été diagnostiquée atteinte de pseudo-adrénoleucodystrophie néonatale avec des signes cliniques tels qu'un retard de développement, une perte de l'ouïe après la naissance, un retard staturo-pondéral et une hépatomégalie.
- La lignée de fibroblastes P4 (référence Coriell : GM18364) provient d'un patient de sexe masculin âgé de 2 ans diagnostiqué atteint de pseudo-adrénoleucodystrophie néonatale. Les signes cliniques décrits pour le patient P4 sont plus détaillés que ceux du patient P3. Il présente une dysmorphie modérée, une hypotonie, une posture anormale, un développement lent et une perte des compétences. Les données biochimiques pour ce patient sont assez restreintes indiquant uniquement des taux anormaux d'acide phytanique et d'acides gras à très longue chaîne.
- La lignée de fibroblastes P5 (référence Coriell : GM18365) provient d'un patient atteint de pseudo-adrénoleucodystrophie néonatale de sexe masculin et âgé de 3 ans. Les données cliniques disponibles indiquent un retard moteur, une perte de la vision et de l'ouïe, un

vocabulaire ne dépassant pas les 50 mots, une perte de connaissance et un développement régressif. Les paramètres biochimiques disponibles correspondent à un taux élevé d'acide cérotique (C26:0 ou acide hexacosanoïque) et un rapport de C26:0/C22:0 supérieur à la normale. Ce patient a été décrit par l'institut Coriell pour avoir une micro-délétion de 1 Kb au niveau de l'exon 7 du gène de l'ACOX1 créant un codon stop au niveau de l'exon 8 et aboutissant à la production d'une protéine tronquée. Cependant, nos résultats ne sont pas en accord avec cette affirmation (Figure 27, p156).

Le diagnostic clinique effectué et les paramètres biochimiques analysés sur les différentes lignées de fibroblastes obtenues auprès de Coriell restent restreints. Le but de ce chapitre, est de valider la déficience en ACOX1 dans les fibroblastes de patients. Pour cela, nous avons évalué les caractéristiques et les indicateurs biochimiques tels que l'activité enzymatique acyl-CoA oxydase 1, l'activité de la β -oxydation peroxysomale des AGTLC ainsi que l'étude de la morphologie des peroxysomes. Cela nous a permis par la suite d'élargir le travail vers d'autres aspects de cette déficience notamment les conséquences de l'absence de l'enzyme et/ou de son activité sur le fonctionnement d'autres organites participant au métabolisme des acides gras.

B. Evaluation du niveau d'expression des ARNm codant l'ACOX1

L'évaluation du taux d'ARNm des différentes isoformes de l'ACOX1 (ACOX1 totale, ACOX1a et ACOX1b) a été réalisée par PCR quantitative pour les fibroblastes de patients P3, P4 et P5 et comparée à celui des fibroblastes contrôles C1. Les résultats présentés dans la Figure 26(A, B et C) montrent une répression de l'expression du gène de l'ACOX1 (ACOX1 totale, ACOX1a et ACOX1b) chez P3 et P4 par rapport à C1 alors que P5 montre une expression du gène de l'ACOX1 similaire à celui de C1.

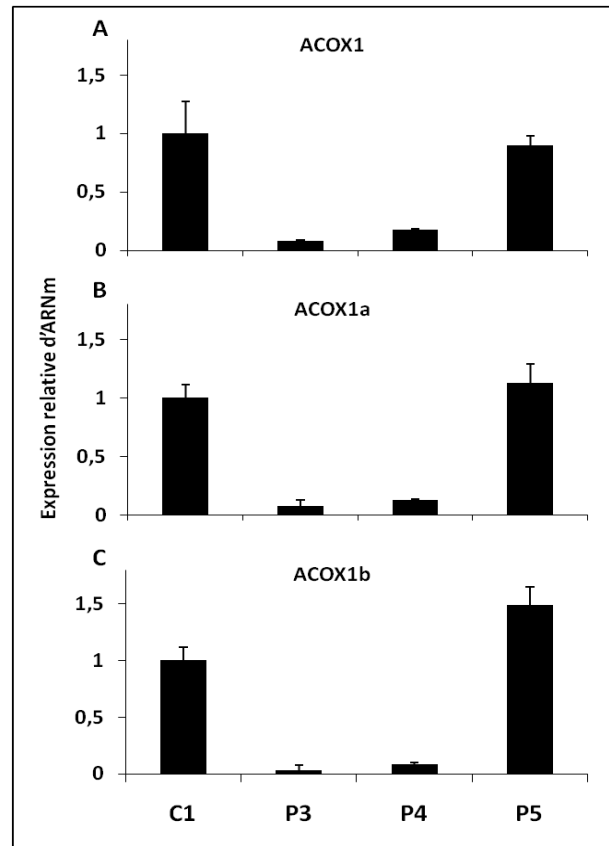


Figure 26. Représentation des niveaux relatifs d'expression des ARNm de l'ACOX1 (A), l'ACOX1a (B) et de l'ACOX1b (C) dans les fibroblastes de patients P3, P4 et P5 comparés à celui des contrôles C1.

Les ARN ont été extraits des cellules, dosés et les ADNc sont obtenus par transcription inverse. Le niveau de l'expression des ARNm a été déterminé par q-PCR pour les gènes de l'ACOX1, l'ACOX1a et de l'ACOX1b et normalisé par rapport au gène de la 36B4 (trois expériences indépendantes). Le niveau d'expression normalisé de chaque gène est ramené à 1 pour les contrôles (n=1) et les expressions de chaque gène dans les fibroblastes de patients (n=3) sont comparées par rapport aux contrôles. Les barres d'erreur sur les histogrammes représentent les écarts types.

C. Evaluation de l'expression de la protéine ACOX1

Pour confirmer les résultats de la PCR quantitative, la présence de la protéine ACOX1 a été testée par western blot (Figure 27). Les fibroblastes contrôles C1 montrent 3 bandes (72, 51 et 21 kDa) caractéristiques de l'ACOX1. Ces bandes correspondent au clivage de l'ACOX1 (polypeptide A de 72 kDa) dans le peroxysome après sa synthèse en polypeptide B (51 kDa) et en polypeptide C (21 kDa). Les fibroblastes des patients P3 et P4 montrent des intensités faibles pour les 3 bandes de 72, 51 et 21 kDa. Les fibroblastes P5 présentent, contrairement aux fibroblastes de P3 et P4, les 3 bandes de 72, 51 et 21 kDa de l'ACOX1 avec un signal comparable à celui des fibroblastes contrôles C1.

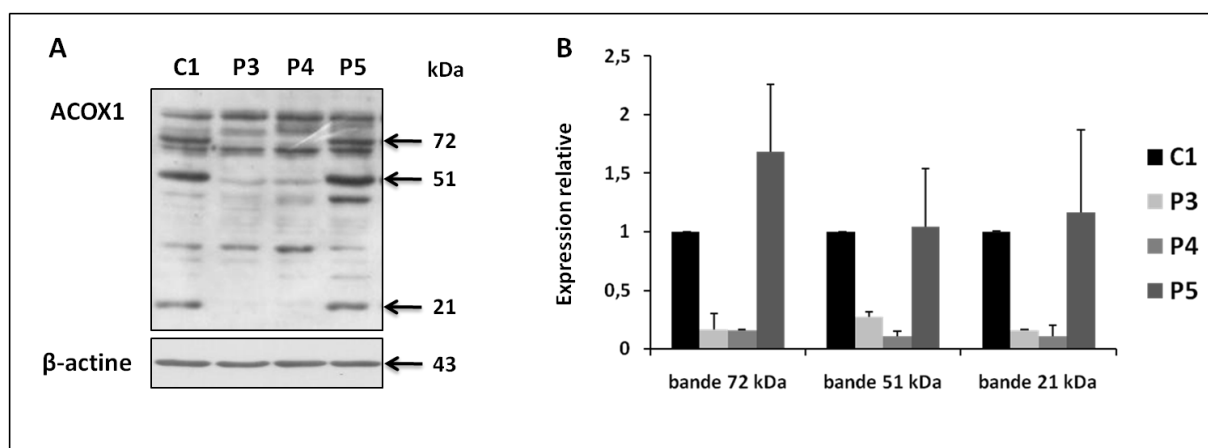


Figure 27. Expression protéique de l'ACOX1 par Western blot dans les fibroblastes contrôles C1 et dans les 3 lignées de patients P-NALD P3, P4 et P5.

(A) La protéine ACOX1 est caractérisée par 3 bandes à 72, 51 et 21 kDa. Les extraits cellulaires obtenus dans les 4 lignées ont été séparés par électrophorèse en gel de polyacrylamide en présence de SDS puis transférés sur une membrane de PVDF et immunodétectés avec l'anticorps anti-ACOX1. La membrane a été ensuite dépouillée et exposée à l'anticorps anti-β-actine. Image représentative de deux expériences indépendantes (fibroblastes contrôles n=1, fibroblastes P-NALD n=3). (B) Analyse de la densité relative des bandes par rapport à celle de la β-actine avec le logiciel ImageJ. Les barres d'erreurs sur les histogrammes représentent les écarts types.

Au total, les résultats de qPCR (paragraphe B) et du western blot montrent pour les patients P3 et P4 une faible expression de l'ACOX1 au niveau de l'ARNm ainsi que des faibles signaux pour les 3 bandes à 72, 51 et 21 kDa, contrairement au patient P5 qui montre un taux d'ARNm similaire à celui des fibroblastes contrôle C1 avec une expression même plus importante pour les 3 bandes de la protéine. Ces différences observées au niveau de l'expression de l'ACOX1 dans les fibroblastes P-NALD peuvent être expliquées par les différentes mutations déjà décrites au niveau du gène de l'ACOX1. Ces mutations peuvent être soit ponctuelles soit sous forme de délétions au niveau du gène ce qui pourrait expliquer les faibles intensités de bandes de 72, 51 et 21 kDa chez P3 et P4. Par contre, le profil d'expression des 3 bandes (72, 51 et 21 kDa) chez P5 est similaire à celui du C1 et diffère de

celui attendu pour ce patient. En effet, ce patient a été décrit par l'institut Coriell pour avoir une micro-délétion de 1 Kb au niveau de l'exon 7 du gène de l'ACOX1 créant un codon stop au niveau de l'exon 8 et aboutissant à la production d'une protéine tronquée de taille très inférieure avec absence des bandes à 51 kDa et 21k Da. Il apparaît donc nécessaire de vérifier le type de mutation présente dans cette lignée cellulaire, qui aboutie à la production d'une protéine de taille apparente normale mais inactive.

D. Activité acyl-CoA oxydase 1 dans les lignées de fibroblastes de patients P-NALD

L'étape la plus importante de la caractérisation des trois lignées de fibroblastes P3, P4 et P5 consiste à vérifier l'absence de l'activité acyl-CoA oxydase 1. La mesure de l'activité enzymatique pour le palmitoyl-CoA (C16:0) a été réalisée par méthode fluorimétrique en suivant la fluorescence de l'acide homovanillique sur des extraits cellulaires de chacune des lignées (Brocard et al 1993). Les activités acyl-CoA oxydase 1 obtenues en $\text{mU}\cdot\text{mg}^{-1}$ de protéines pour les lignées P3, P4 et P5 sont représentées dans la Figure 28. Ce dosage a révélé une activité résiduelle pour P3 de $0,00227 \text{ mU}\cdot\text{mg}^{-1}$ contre $0,0092 \text{ mU}\cdot\text{mg}^{-1}$ pour C1.

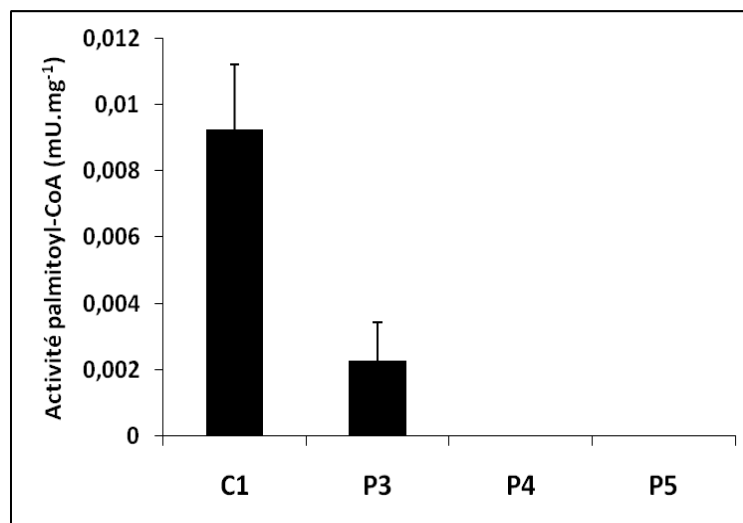


Figure 28. Activités spécifiques acyl-CoA oxydase 1 exprimées en $\text{mU}\cdot\text{mg}^{-1}$ pour le substrat palmitoyl-CoA.

La mesure a été effectuée sur les extraits totaux de fibroblastes contrôles C1 (n=1) et de fibroblastes de patients P-NALD (n=3) P3, P4 et P5 par la mesure de la fluorescence émise à 420 nm. Le mélange réactionnel a été tout d'abord préparé incubés avec l'acide homovanillique et la peroxydase. La mesure de l'activité de l'ACOX1 a été réalisée en présence du palmitoyl-CoA dans le mélange réactionnel et la réaction a été déclenchée par l'ajout de l'extrait cellulaire de chaque lignée. La lignée P3 montre une activité résiduelle par rapport à la lignée contrôle (C1) contrairement aux lignées P4 et P5 où l'activité est absente. Trois mesures différentes ont été réalisées pour ce test. Les barres d'erreur sur les histogrammes représentent les écarts types.

Une absence de détection de l'activité acyl-CoA oxydase 1 est mise en évidence chez P4 et P5 contrairement à P3. L'activité résiduelle acyl-CoA oxydase 1 dans les fibroblastes P3 peut être expliquée par la présence d'une ACOX1 mutée. Cependant, l'absence d'activité chez P4 et P5 indiquerait l'absence d'une protéine fonctionnelle, résultat d'une mutation avec un décalage de la phase de lecture (frame-shift). Cette délétion aboutissant à une protéine tronquée, peut expliquer l'absence d'une activité acyl-CoA oxydase 1 détectable dans les fibroblastes P4 et P5.

E. Mesure de la β -oxydation peroxysomale des acides gras à très longue chaîne (AGTLC)

Les résultats précédents de l'activité enzymatique acyl-CoA oxydase 1 (cf. paragraphe D, p157) ont montré deux types de déficiences en ACOX1 dans les fibroblastes de patients P-NALD : (i) la présence, chez le patient P3, de l'enzyme acyl-CoA oxydase 1 avec une activité résiduelle qui correspond à environ 24% de l'activité présente dans les fibroblastes contrôles et (ii) l'absence d'une activité acyl-CoA oxydase 1 dans les fibroblastes de patients P4 et P5 probablement due à une ou plusieurs mutations affectant le site actif de l'enzyme. L'étape suivante de la caractérisation des lignées a consisté en une mesure de la β -oxydation peroxysomale dans le but d'évaluer, dans le cadre des résultats obtenus en activités acyl-CoA oxydase 1, la contribution de l'activité enzymatique résiduelle à la dégradation des AGTLC, notamment, l'acide cérotique (C26:0).

La mesure de la β -oxydation consiste en une incubation des cellules avec du C26:0 radiomarké au ^{14}C sur le carbone 1 de la fonction carboxyle pour évaluer les capacités des cellules à dégrader ce type d'acides gras via la β -oxydation peroxysomale qui dépend de l'activité ACOX1. Les résultats de la mesure de la β -oxydation dans la lignée C1 et les deux lignées de patients P3 et P5 sont représentés dans la Figure 29. Dans les fibroblastes P3, une diminution de 70% du taux de la β -oxydation est observée par rapport aux contrôles C1. L'activité résiduelle de la β -oxydation de 30% semble logique puisque la lignée P3 est la seule parmi les 3 lignées de patients qui montre environ 24 % d'activité résiduelle acyl-CoA oxydase 1 par rapport à la lignée C1 ce qui peut expliquer de manière similaire un taux résiduel de β -oxydation du C26:0. Cependant, la détection chez P5 d'un niveau de β -oxydation de 30% par rapport à C1 et comparable à celui de P3 reste étonnante. Dans les fibroblastes P5, aucune activité acyl-CoA oxydase 1 n'a été détectée. Ceci pourrait être le résultat de différence d'affinité vis-à-vis des substrats utilisés, le palmitoyl-CoA (C16:0) pour l'activité ACOX1 et l'acide hexacosanoïque (C26:0) pour l'activité de β -oxydation sachant

que dans le premier cas on mesure l'activité de l'enzyme et dans le deuxième cas l'activité de β -oxydation du système peroxysomal.

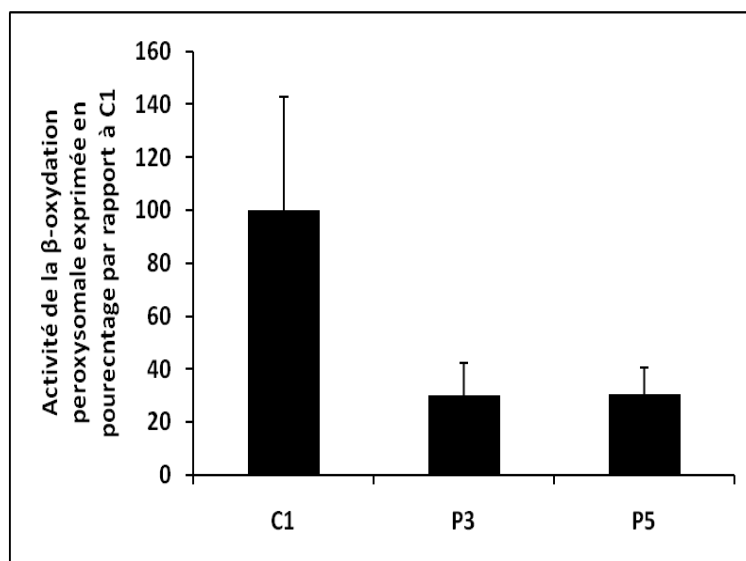


Figure 29. Niveau de β -oxydation du ^{14}C -C26:0 exprimé en pourcentage d'activité spécifique globale en pmol/h/mg de protéines dans les fibroblastes de patients P3 et P5 par rapport aux contrôles C1. Les fibroblastes ont été cultivées dans des fioles en verre puis incubées 24h après avec $4\ \mu\text{M}$ de C^{14} -C26:0 pour 2 h. Après l'arrêt de la β -oxydation, les cellules sont laissées pour la nuit à 4°C puis lavées et lysées avec du Triton X-100. Les valeurs obtenues regroupent la radioactivité comptée au niveau gazeux et la radioactivité comptée au niveau des acido-solubles. Une seule expérience a été réalisée pour déterminer le niveau de β -oxydation du C26:0 avec 4 mesures pour chacune des lignées contrôles ($n=1$) et de patients P-NALD ($n=3$). Les barres d'erreur sur les histogrammes représentent les écarts types.

F. Morphologie et nombre des peroxysomes dans les lignées de fibroblastes P-NALD

F.1. Evaluation du nombre des peroxysomes

Dans un premier temps, l'immunomarquage des peroxysomes dans les quatre « lignées » de fibroblastes par microscopie à fluorescence a permis d'évaluer le nombre de peroxysomes et ainsi, d'évaluer l'effet de la déficience en ACOX1 sur le nombre de peroxysomes. En effet, l'immunomarquage de trois protéines peroxysomales a été réalisé grâce à trois anticorps différents. Le premier est dirigé contre l'ACOX1, le second contre la catalase et le troisième contre l'enzyme bifonctionnelle (L-PBE) (Figure 30, **p161**). Le résultat de la quantification du nombre de peroxysome par cellules grâce au marquage de la catalase dans chacune des lignées de fibroblastes est présenté dans la Figure 31 (**p162**).

La Figure 30 montre les images des fibroblastes obtenues en microscopie à fluorescence après marquage avec les anticorps dirigés séparément contre l'ACOX1 et contre la catalase et la L-PBE. Le marquage de l'ACOX1 montre les peroxysomes sous forme de points rouges fluorescents : dans les fibroblastes contrôles C1, les peroxysomes sont de petite taille, présents de manière homogène et en grand nombre dans le cytoplasme. Les fibroblastes de patients P3 et P4, contrairement à la lignée C1, montrent un nombre de peroxysome plus faible avec une taille beaucoup plus importante. La lignée P5 montre une taille de peroxysome identique à ceux observés chez P3 et P4. Cependant, le nombre de peroxysome est environ deux fois plus faible que chez P3 et P4. Un résultat identique pour la taille et le nombre de peroxysome dans les différentes lignées est observé avec le marquage de la catalase et de la L-PBE sur les mêmes coupes montrant les peroxysomes sous forme de points verts et rouges fluorescents. De plus le marquage de la catalase en vert et de la L-PBE en rouge se superposent parfaitement puisque ces deux enzymes sont peroxysomales montrant ainsi les peroxysomes sous formes de points jaunes. L'ensemble de ces immunomarquages, indiquent ainsi une augmentation de la taille et une réduction du nombre des peroxysomes dans les fibroblastes de patients (P3, P4 et P5) par rapport aux fibroblastes contrôles (C1).

La Figure 31 (p162) représente le nombre de peroxysome dans chaque lignée. Ce résultat a été obtenu par la moyenne des comptages des points fluorescents résultant de l'immunomarquage de la catalase sur au moins 3 images par lignée en utilisant le logiciel Image J, en considérant que chaque point fluorescent correspond à un peroxysome. L'analyse des images montre une diminution du nombre de peroxysome avec en moyenne respective de 86, 83 et 45 peroxysomes par cellule dans les lignées P3, P4 et P5 contre 300 pour la lignée contrôle.

F.2. Etude morphologique des peroxysomes

Dans un second temps, l'étude de la morphologie des peroxysomes a été réalisée en microscopie électronique avec les fibroblastes C1, P3 et P5. Le marquage de la catalase, enzyme de la matrice peroxysomale, a été réalisé grâce à la réaction du 3, 3'-diaminobenzidine (DAB) permettant ainsi la visualisation des peroxysomes.

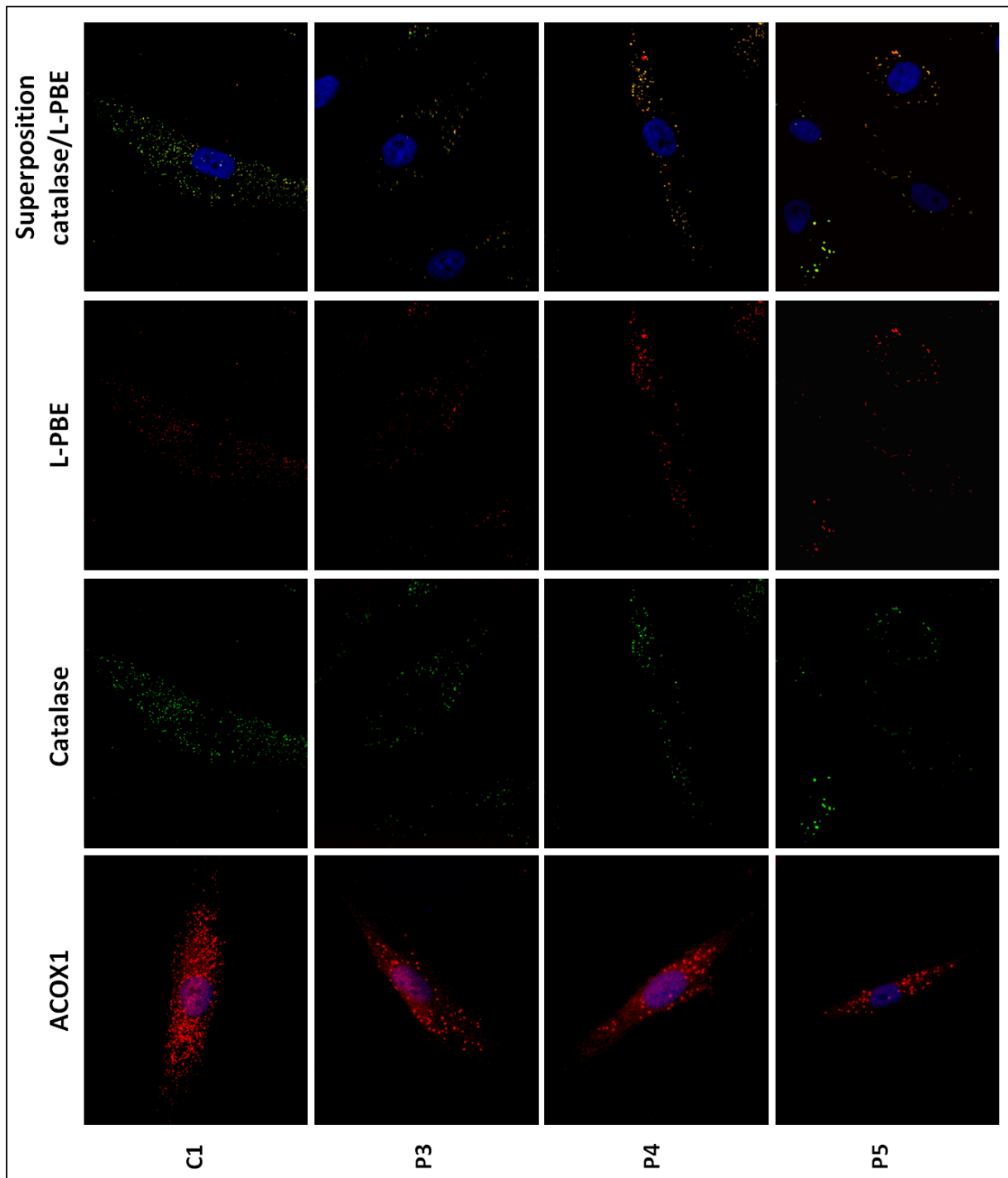


Figure 30. Images d'immunofluorescences en microscopie à fluorescence des fibroblastes contrôle (C1) et des fibroblastes de patients atteints de P-NALD (P3, P4 et P5). Les cellules ont été cultivées sur des lamelles pour 24h puis fixées au paraformaldéhyde. Le marquage a été réalisé avec l'anticorps anti-ACOX1 et le mélange d'anticorps anti-catalase et anti-L-PBE. Les cellules ont été ensuite contremarquées avec un anticorps couplé à l'Alexa-Fluor 594 pour l'ACOX1 (marquage en rouge), et avec le mélange d'anticorps couplé à l'Alexa-Fluor 488 pour la catalase (marquage en vert) et à l'Alexa-Fluor 594 pour la L-PBE (marquage en rouge). Les images représentent le résultat de deux expériences indépendantes. Le noyau a été coloré avec du Hoechst. Les images de superpositions ACOX1/Hoechst et catalase/L-PBE/Hoechst ont été réalisées avec le logiciel image J. (Grossissement 100x)

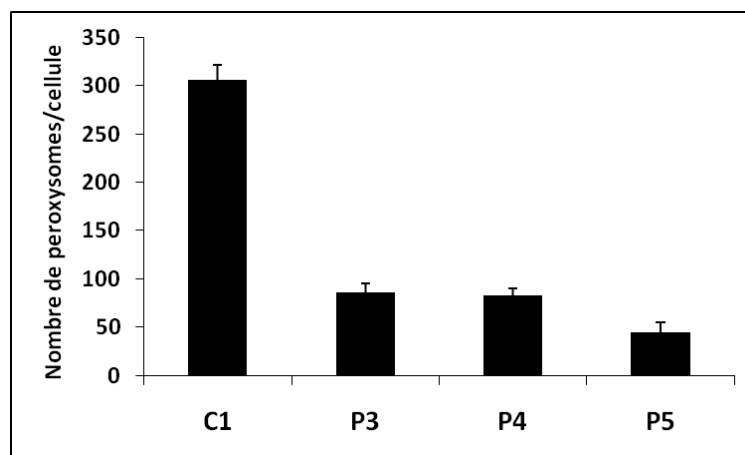


Figure 31. Evaluation du nombre de peroxysomes par cellules dans les lignée de fibroblastes contrôles et déficientes en ACOX1.

Le comptage a été réalisé à partir des images obtenues par microscopie à fluorescence après immunomarquage avec l'anticorps anti-catalase. Les barres d'erreur sur les histogrammes représentent les écarts types.

La Figure 32 (A, B, C et D) présente, dans la lignée C1, le marquage des peroxysomes à la catalase. Ces peroxysomes souvent présents autour du noyau et juxtaposés aux gouttelettes lipidiques, apparaissent sous forme de ronds sphériques denses aux électrons. Cependant, certains peroxysomes présentent des formes semblables à des fer-à-cheval (Figure 32, **D**). Dans les fibroblastes contrôles, le diamètre des peroxysomes varie entre 233 et 311 nm. Dans les fibroblastes de patients P-NALD (P3 et P5), les peroxysomes sont de taille beaucoup plus grande par rapport à ceux des fibroblastes contrôles (Figure 32, **C** et **D**). Les fibroblastes de patient P3 montrent des peroxysomes de diamètre variant entre 350 et 850 nm aussi bien que la lignée P5 dont le diamètre des peroxysomes varie entre 490 et 650 nm. Dans ces cellules, les peroxysomes sont également présents près du noyau et présentent des formes hétérogènes (Figure 33, **A**, **B**, **C** et **D**, p164). Leurs morphologies varient entre formes sphériques, oblongues, tubulaires, annelées ou en fer-à-cheval. Dans les fibroblastes de patients, certains peroxysomes sont étroitement juxtaposés à des dépôts phospholipidiques du type « myelin-like » (Figure 33, **A**). Ces structures lipidiques ressemblent à ceux issues d'accumulation des AGTLC, une caractéristique des patients atteints de P-NALD. Ces résultats, en accord avec les marquages de protéines peroxysomales en microscopie à fluorescence, montrent une augmentation importante de la taille des peroxysomes dans les fibroblastes de patients par rapport aux contrôles.

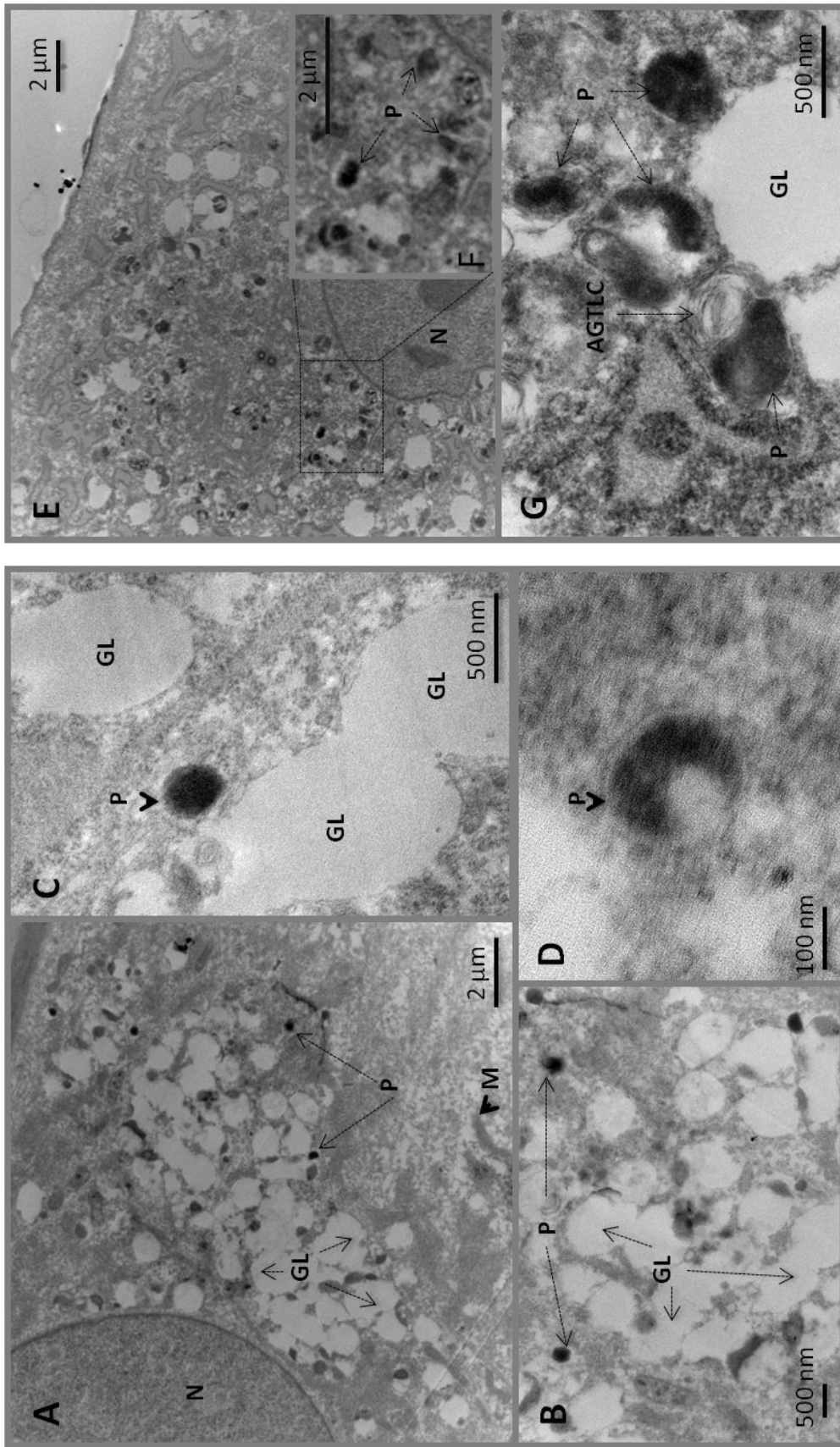


Figure 32. Micrographies électroniques de fibroblastes contrôlés (A, B, C et D) et P-NALD (E, F et G). Les peroxysomes ont été marqués par la DAB grâce à l'activité catalase.

A: faible agrandissement d'un fibroblaste contrôle (n=1) montrant des peroxysomes (P) juxtaposés parfois aux gouttelettes lipidiques (GL) près du noyau (N). B et C : les peroxysomes marqués à la DAB paraissent comme des ronds sphériques parfois aux électrons. D: à plus fort grossissement certains peroxysomes se présentent sous la forme d'un fer-à-cheval. E: faible agrandissement d'un fibroblaste P-NALD montrant des peroxysomes de plus grande taille (P) près du noyau (N). G: des peroxysomes (P) de forme sphérique, oblongue ou allongée. On observe également l'accumulation d'AGTLC. Les images sont représentatives d'une seule expérience de marquage par la DAB.

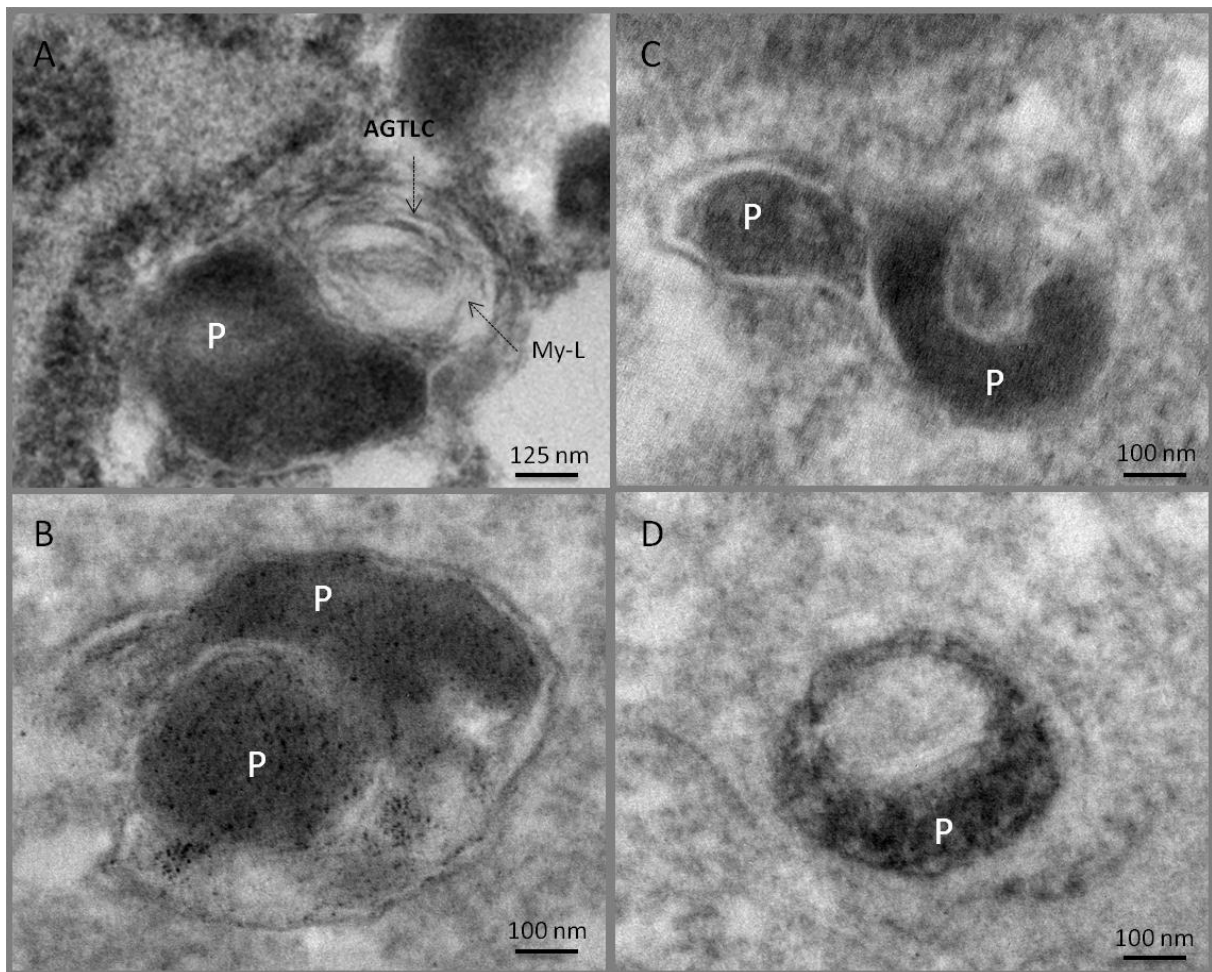


Figure 33. Micrographies électroniques de peroxysomes de fibroblastes P-NALD.

Les peroxysomes (P) des fibroblastes P-NALD (n=2) ont été marqués par la DAB grâce à l'activité catalase. Les peroxysomes prennent des formes différentes: sphérique, oblongue, tubulaire, en fer à cheval ou encore en anneau (A, B, C et D). Certains peroxysomes sont étroitement juxtaposés à des dépôts phospholipidiques du type « myelin-like » (My-L) rappelant des structures issues de l'accumulation des AGTLC. On distingue dans les peroxysomes des dépôts du produit de la peroxydation de la DAB par la catalase. Les images sont représentatives d'une seule expérience de marquage par la DAB.

G. Conclusions

Les résultats de caractérisation de trois lignées de fibroblastes humains issues de patients atteints de P-NALD montrent que dans ces lignées, les peroxysomes augmentent en taille et diminuent en nombre. Certaines lignées fibroblastiques (P3 et P4) de patients P-NALD montrent une diminution du niveau d'expression en ARNm de l'ACOX1 et de ses deux isoformes ACOX1a et ACOX1b ainsi qu'une diminution du niveau d'expression protéique de l'ACOX1. Une autre lignée (P5) montre un niveau comparable aux fibroblastes contrôles de

l'expression en ARNm et en protéines de l'ACOX1. Cependant, l'activité acyl-CoA oxydase 1 pour le palmitoyl-CoA dans ces lignées est soit indétectable soit résiduelle aboutissant à une forte diminution de l'activité de β -oxydation peroxysomale du C26:0. En conclusion, la déficience en activité acyl-CoA oxydase 1 chez les patients P-NALD, affecte la morphologie et le nombre de peroxysome et provoque l'inhibition de la β -oxydation peroxysomale.

Chapitre IV : Effets de la déficience en ACOX1 sur les fonctions mitochondriales

A. Introduction

Les mitochondries, grâce à leur système de β -oxydation, catalysent la dégradation de la majorité des AG provenant de l'alimentation (palmitate, oléate, linoléate...) fournissant de l'acétyl-CoA pour la production d'énergie sous forme d'ATP *via* les activités des complexes de la chaîne respiratoire couplée à la phosphorylation oxydative. Certaines données, structurales et morphologiques, indiquent des relations étroites entre la mitochondrie et le peroxysome. Dans le syndrome de Zellweger la mutation d'une des protéines peroxysomales appelés peroxines affecte la biogenèse du peroxysome et l'import des protéines peroxysomales (cf. Rappels bibliographiques, E.1 les maladies peroxysomales, p73).

Chez les patients atteints de cette maladie, des changements morphologiques de la mitochondrie ont été observés au niveau hépatique (Steinberg et al., 2006). Parallèlement, chez les souris *Pex5^{-/-}*, un modèle murin du syndrome de Zellweger, des altérations fonctionnelles et structurales des mitochondries ont été aussi observées au niveau hépatique (Baumgart et al., 2001; Dirx et al., 2005). Chez ces souris *Pex5^{-/-}*, les membranes externes des mitochondries apparaissent verticillées avec des bulles et des saillies. Ces mitochondries montrent de rares crêtes, condensées et de formes curvilignes et circulaires. Ces modifications structurales s'accompagnent de perturbations des activités des enzymes de la chaîne respiratoire (Baumgart et al., 2001; Dirx et al., 2005). D'autres études ont également soulignées les effets de la déficience en transporteurs ABC impliqués dans le transport des AG (Ferrer et al., 2005; McGuinness et al., 2003) sur le fonctionnement et la morphologie de la mitochondrie chez la souris. Cela indique l'existence d'une complémentarité des fonctions métaboliques du peroxysome et de la mitochondrie. Cependant, dans le syndrome de Zellweger comme dans le modèle de souris *Pex5^{-/-}*, l'absence de nombreuses fonctions métaboliques peroxysomales est liée à une absence d'importation de protéines peroxysomales. Ajouté à cela, l'analyse par microscopie électronique montre, dans les cellules, uniquement des peroxysomes fantômes. Dans ce cas, les perturbations mitochondriales observées ne peuvent donc être liées qu'au déficit généralisé de la biogenèse du peroxysome. Alors que le cas de la déficience en ACOX1 permettrait d'établir un lien possible entre la β -oxydation peroxysomale et les perturbations des fonctions mitochondriales.

Nous avons voulu savoir si la déficience en activité ACOX1 affecterait aussi bien la morphologie des mitochondries que le métabolisme énergétique mitochondrial puisque la morphologie et le métabolisme de la mitochondrie sont deux phénomènes étroitement liés. Dans ce sens, la caractérisation biochimique des quatre lignées de fibroblastes dérivant de

patients atteints de P-NALD (P3, P4 et P5) et de contrôle (C1) obtenus de l'institut Coriell (Institut pour la recherche médicale, New Jersey, Etats unis) en février 2010, nous a permis de déterminer les différents caractéristiques de chaque lignée.

La plupart des expériences présentées dans ce chapitre ont été réalisées sur les 4 lignées de fibroblastes obtenues de l'institut Coriell. Cependant, grâce à la collaboration avec Pr. Ronald Wanders (Université d'Amsterdam, Pays-Bas) nous avons eu à notre disposition, à partir du mois de janvier 2011, plusieurs lignées de fibroblastes de patients P-NALD (P6 à P11) et de fibroblastes contrôles (C2, C3 et C4) (Ferdinandusse et al., 2006). Bien que les travaux concernant la mitochondrie aient été bien avancés sur les lignées achetées à l'institut Coriell, nous avons répété certaines expériences de ces travaux, dans la mesure du possible, pour inclure les lignées provenant du laboratoire du Pr. Wanders. Cela nous a permis de consolider nos résultats en incluant 11 lignées de patients P-NALD et de cellules contrôles.

Parallèlement à l'utilisation des fibroblastes déficientes en ACOX1, en collaboration avec l'équipe du Pr. Reddy (Feinberg Medical School, Northwestern University, Chicago, Etats-Unis), nous avons pu étendre nos investigations au modèle de souris KO *Acox1* ainsi que les souris *Acox1*^{-/-} transgéniques humanisées exprimant le gène ACOX1 humain. Les souris *Acox1*^{-/-} montrent également une accumulation des AGTLC et développent une stéatose hépatique (Fan et al., 1996a; Fan et al., 1996b) indiquant des perturbations du métabolisme lipidique et rappelant le développement d'hépatomégalie chez les patients P-NALD (Ferdinandusse et al., 2007). Nous avons donc utilisé le tissu hépatique pour élucider *in vivo* les effets de la déficience en ACOX1 sur le métabolisme énergétique mitochondrial.

B. Effets de la déficience en ACOX1 humaine sur la morphologie de la mitochondrie

B.1. Observations en microscopie à fluorescence

L'évaluation de la morphologie de la mitochondrie dans les fibroblastes de patients P-NALD a été réalisée dans un premier temps par marquage des mitochondries et par observation en microscopie à fluorescence. Le premier marquage a consisté en l'utilisation d'une sonde fluorescente appelée MitoTracker Red CMXRos (Invitrogen) qui colore les mitochondries dans les cellules vivantes et dont l'accumulation est dépendante du potentiel membranaire. Le second marquage était basé sur l'utilisation d'un anticorps dirigé contre le cytochrome c, une hémoprotéine de la membrane interne mitochondriale. Les résultats des marquages sont présentés dans la *Figure 34* (**p171**). Les deux marquages avec la sonde MitoTracker Red CMXRos et l'anticorps dirigé contre le cytochrome c montrent dans la lignée contrôle C1, les mitochondries sous forme de filaments rouges fluorescents. Nous observons des formes tubulaires allongées et homogènes. Dans les fibroblastes de patient (P3), les mitochondries apparaissent avec un marquage hétérogène indiquant la présence de mitochondries de tailles différentes allant de petits points rouges indiquant une forme globulaires, jusqu'à des filaments plus ou moins longs. Cependant, les photos de marquage pour la lignée P4 montrent un réseau dense de mitochondries de formes tubulaires allongées plus longues que celles observées dans les fibroblastes contrôle (C1). La troisième lignée de patient P5 se révèle la lignée présentant le plus d'hétérogénéité de formes de mitochondries. En effet cette lignée représente des mitochondries globulaires sous formes de points denses, et des mitochondries tubulaires sous forme de filaments de tailles courte et moyenne ainsi que des mitochondries en formes de U.

B.2. Observations en microscopie électronique

Les observations réalisées en microscopie électronique (ME) (cf. Résultats chapitre II, B.2. Etude morphologique des peroxysomes, p160) sur les lignées de fibroblastes P-NALD ainsi que sur la lignée contrôle ont permis de visualiser les peroxysomes grâce au marquage de la catalase par la DAB. Ces observations ont permis également la visualisation des mitochondries dans les fibroblastes de patients dont la morphologie était différente de celle des fibroblastes contrôles. Le résultat est présenté dans les *Figure 35* et *Figure 36*.

Dans les fibroblastes contrôles (C1), les mitochondries apparaissent filiformes, allongées et parfois proches du noyau (*Figure 35, A, p172*). Certaines mitochondries apparaissent de tailles variables (*Figure 35, B*) et se situent à proximité des peroxysomes (*Figure 35, C*).

Cependant, ces différences de tailles peuvent être dues à la coupe des cellules et certaines mitochondries pourraient être vues transversalement. Les crêtes mitochondriales chez le sujet contrôle peuvent être distinguées (*Figure 34, D et E*). Des mitochondries en cours de division sont également observées (*Figure 34, E et F*).

Cependant, dans les fibroblastes de patients P3 et P4 (*Figure 36, p173*), les mitochondries sont de petite taille présentant des formes et de tailles hétérogènes au sein de la même lignée. Chez ces patients, des mitochondries de morphologie normale (*Figure 36, A, « M »*) sont observées à proximité de mitochondries gonflées (*Figure 36, A, « Mg »*). Au niveau des mitochondries gonflées, les crêtes sont parfois rares (*Figure 36, D et E*), remplacées par des empilements parallèles (*Figure 36, B*) ou présentant des altérations curvilignes avec un aspect vésiculaire (*Figure 36, C*) et parfois ces crêtes disparaissent (*Figure 36, A*). La perturbation de la morphologie de la mitochondrie se traduit également par des altérations de la structure de la membrane externe. En effet, ces membranes présentent des désorganisations caractérisées par des évaginations et des invaginations se traduisant par un aspect gonflé de la mitochondrie et une raréfaction des crêtes (*Figure 36, D et E*). De plus, dans les fibroblastes P-NALD, des inclusions lipidiques de type « myelin-like » sont observées à proximité des mitochondries anormales (*Figure 36, C*). Ces aspects différents de la morphologie mitochondriale entre cellules de sujets sains et de sujets malades laissent à penser que l'absence de la protéine ACOX1 ou bien de son activité enzymatique affecte la biogenèse de la mitochondrie. En effet, il a été décrit des altérations structurales de la mitochondrie chez les patients atteints du syndrome de Zellweger, maladie caractérisée par un défaut de la biogenèse des peroxysomes suite à des mutations au niveau de plusieurs gènes codant des peroxines (Gould et Valle, 2000). De plus, ce type de modification a été également observé dans les foies des souris *Pex5^{-/-}*, un modèle murin du syndrome de Zellweger où le gène de la peroxine 5 a été délété (Baumgart et al., 2001; Dirkx et al., 2005).

La combinaison des différentes observations des mitochondries en microscopie à fluorescence et en microscopie électronique montre des altérations morphologiques des mitochondries dans les fibroblastes de patients P-NALD. Ces altérations peuvent être le résultat d'une dérégulation de la biogenèse mitochondriale.

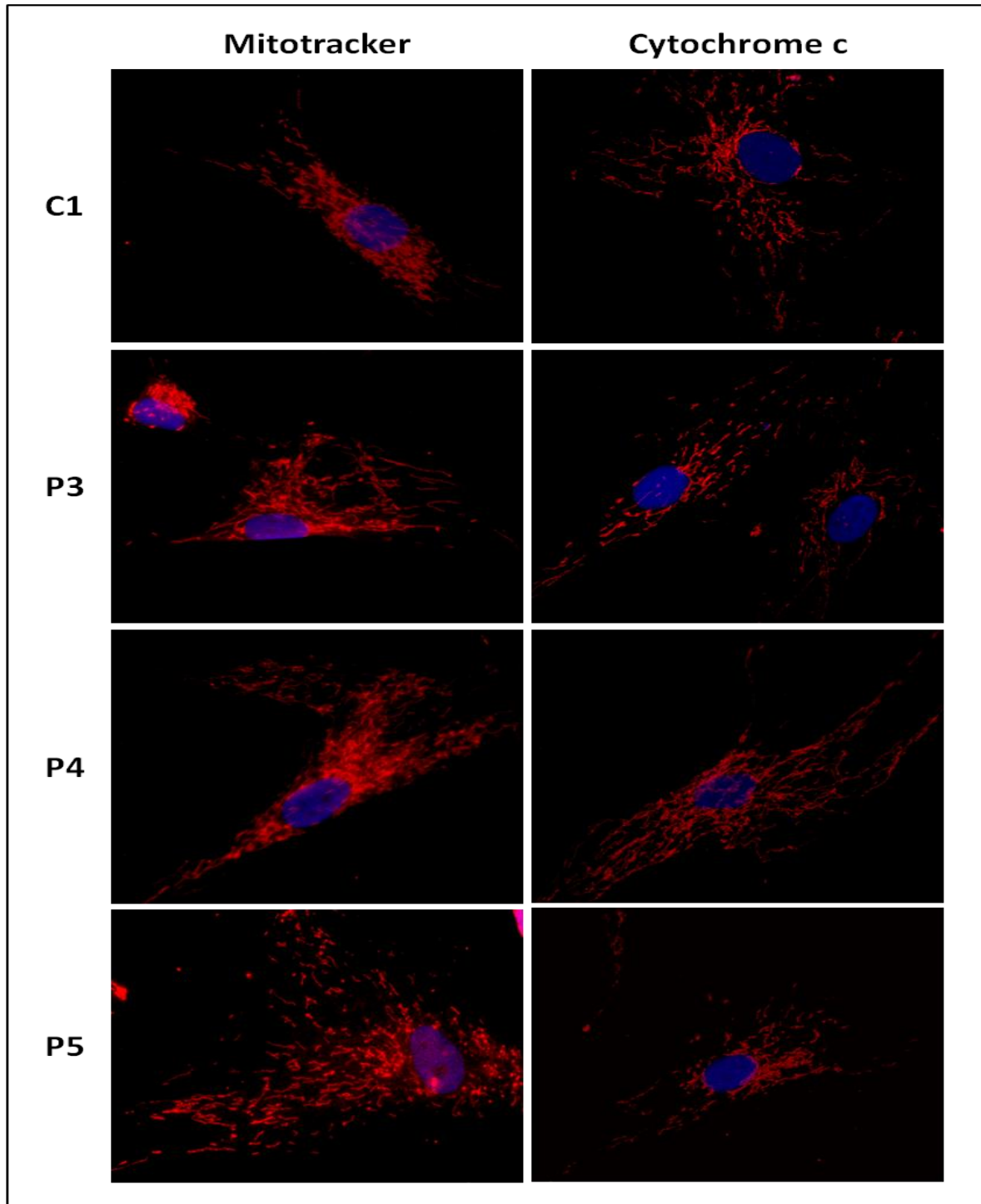


Figure 34. Images des marquages au MitoTracker Red CMXRos et au cytochrome c de la lignée de fibroblastes contrôle C1 et des lignées de fibroblastes de patients P3, P4 et P5. Pour les deux marquages, les cellules ont été cultivées sur des lamelles pendant 24h. Après lavage, les cellules ont été soit incubées 15 minutes avec la solution de MitoTracker Red CMXRos à 37°C soit marquées avec l'anticorps anti-cytochrome c et contremarquées avec un anticorps couple à l'Alexa-Fluor 594. Le noyau a été finalement coloré au Hoechst et les images de superpositions MitoTracker/Hoechst et cytochrome c/Hoechst ont été réalisées avec le logiciel imageJ (Grossissement 100x). Les images du marquage au MitoTracker et au cytochrome c sont représentatives de deux expériences indépendantes.

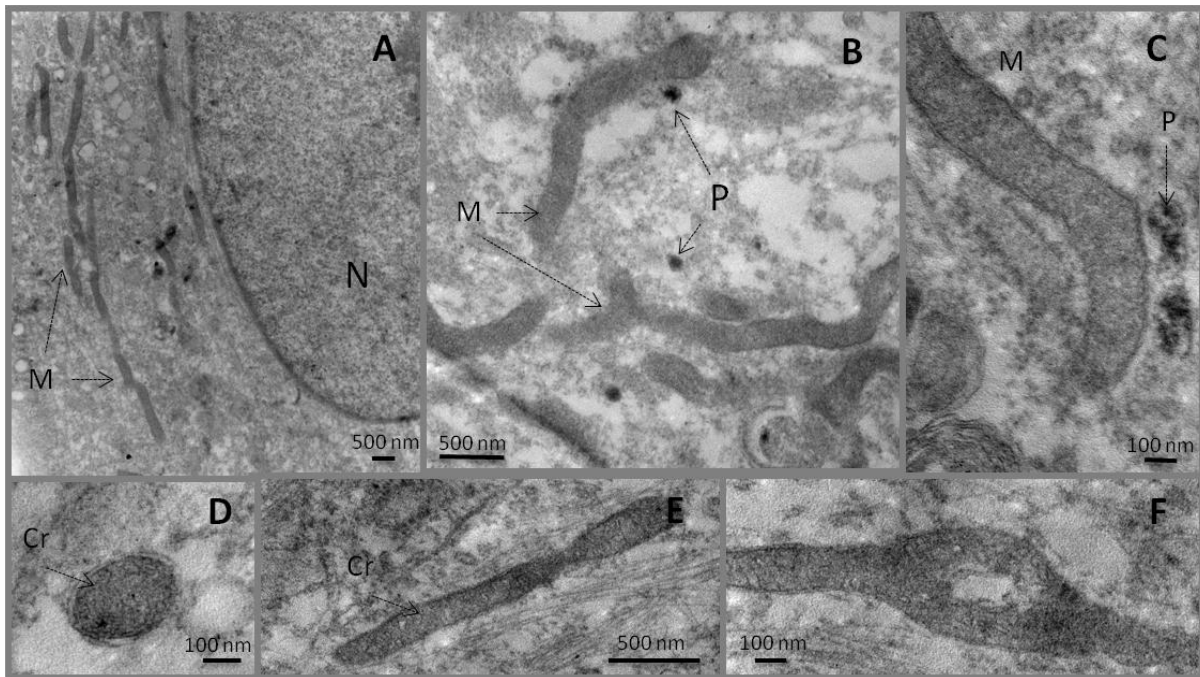


Figure 35. Micrographies électroniques de fibroblastes d'un sujet contrôle.

A : à faible grossissement, un fibroblaste contrôle montre des mitochondries (M) périnucléaires (N) allongées et filiformes orientées suivant le grand axe de la cellule. **B :** à plus fort grossissement on détecte de rares peroxysomes (P) de forme sphérique marqués en noir par la DAB grâce à l'activité peroxydasique de la catalase. On observe que les mitochondries sont de tailles variables. **C :** les peroxysomes sont parfois juxtaposés aux mitochondries. Le marquage par la DAB des peroxysomes paraît plus hétérogène. On peut distinguer les crêtes (Cr) mitochondriales en coupe transversale (D) et en coupe longitudinale (C, E et F). Parfois, on peut également observer deux mitochondries en cours de fission (E) ou en position entrelacée (F). Les images sont représentatives d'une seule expérience.

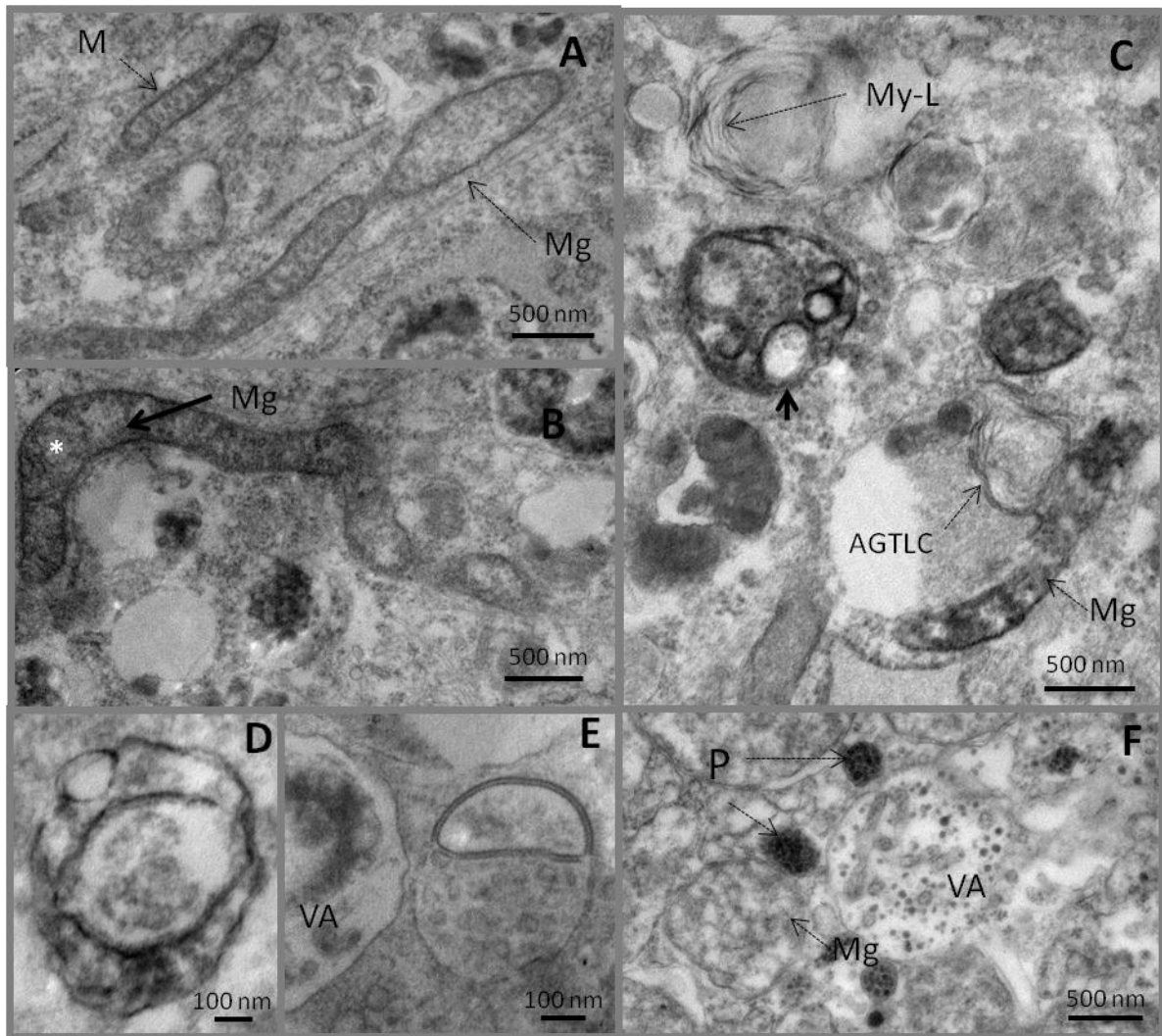


Figure 36. Micrographies électroniques de fibroblastes issus de patients P-NALD (P3 et P5).
A : un faible grossissement montre une mitochondrie de morphologie normale (M) et une mitochondrie gonflée (Mg) avec un changement de la structure des crêtes et leur disparition dans les zones gonflées de la mitochondrie (B et C) et dans d'autres zones on observe le remplacement des crêtes par des empilements parallèles (* en B). **C :** on remarque dans les mitochondries gonflées des altérations curvilignes des crêtes mitochondriales avec un aspect vésiculaire (flèche courte). Cette désorganisation se traduit par des évaginations et des invaginations de la membrane externe et une raréfaction des crêtes (D et E). Des dépôts phospholipidiques du type « myelin-like » apparaissent dans le cytoplasme (My-L) et une accumulation des AGTLC dans les gouttelettes lipidiques sous forme de cristaux (C). **F :** On observe deux peroxysomes marqués à la DAB près d'une vacuole autophagique contenant des débris cellulaires. Les images sont représentatives d'une seule expérience.

C. Biogenèse mitochondriale et déficience en ACOX1 chez les patients P-NALD et chez les souris *Acox1*^{-/-}

Les mitochondries sont des organites dynamiques au sein de la cellule. Elles sont mobiles et se déplacent le long du cytosquelette. La dynamique mitochondriale est conditionnée par un équilibre constant entre la fusion et la fission des membranes mitochondriales ce qui permet à la mitochondrie d'entretenir sa morphologie et l'homéostasie de son métabolisme énergétique.

Deux familles de protéines sont responsables de la fusion et de la fission des mitochondries, à savoir les mitofusines et les dynamines. Les mitofusines (MFNs) sont des protéines de la membrane externe mitochondriale qui contrôlent la fusion des membranes externes. En leurs absences, les mitochondries perdent leurs capacités de fusion et par la suite la perte de leurs formes tubulaires (Chan, 2006b). De plus, la dynamine mitochondriale OPA1 (ou Optic atrophy 1) est une GTPase appartenant à la famille des dynamines impliquée aussi dans le phénomène de fusion. Cette protéine est adressée à la mitochondrie et est présente dans l'espace intermembranaire ancrée à la membrane interne mitochondriale et plus particulièrement au niveau des crêtes (Griparic et al., 2004; Olichon et al., 2002). La perte de cette protéine aboutit à une fragmentation du réseau mitochondrial et à une incapacité des mitochondries à fusionner (Lee et al., 2004).

La dynamine 1 (DNML1), appartenant à la famille des dynamines, est une GTPase localisée au niveau de la membrane externe mitochondriale et impliquée dans la fission des mitochondries. L'absence de cette protéine perturbe la morphologie mitochondriale et fait apparaître des mitochondries de formes filamenteuses (Frank et al., 2001).

A cause des liens qui existent entre le niveau d'expression des mitofusines et de la dynamine 1 et, les perturbations de la biogenèse des mitochondries dans les fibroblastes de patients P-NALD, nous avons mesuré les niveaux d'expression des gènes codant ces protéines. Pour vérifier les différences observées au niveau de la morphologie des mitochondries entre les fibroblastes contrôles et ceux des patients, nous avons également évalué des changements d'expressions potentiels chez les souris *Acox1*^{-/-}. Les analyses ont été réalisées par PCR quantitative. Les expressions des gènes des mitofusines MFN1 et MFN2, OPA1 et DNML1 ont été étudiées.

C.1. Fibroblastes de patients P-NALD

La Figure 37 (A) correspond aux résultats obtenus de l'expression des gènes de mitofusines (MFN1 et MFN2) dans les fibroblastes de patients contrôles C1, C2, C3 et C4 et

les patients atteints de P-NALD (P3, P4, P5, P6, P7, P8, P9, P10 et P11). Cette figure montre une induction non significative des gènes impliqués dans la fusion des mitochondries MFN1, MFN2 et OPA1 de manière respective d'environ 1,9 ; 2,2 et 2,25 fois chez les patients par rapport aux contrôles. Le gène de la dynamine DNML1 est lui aussi induit dans les lignées de patients d'environ 1,8 fois. Cependant l'induction de ces gènes n'est pas significative par rapport aux lignées de fibroblastes contrôles.

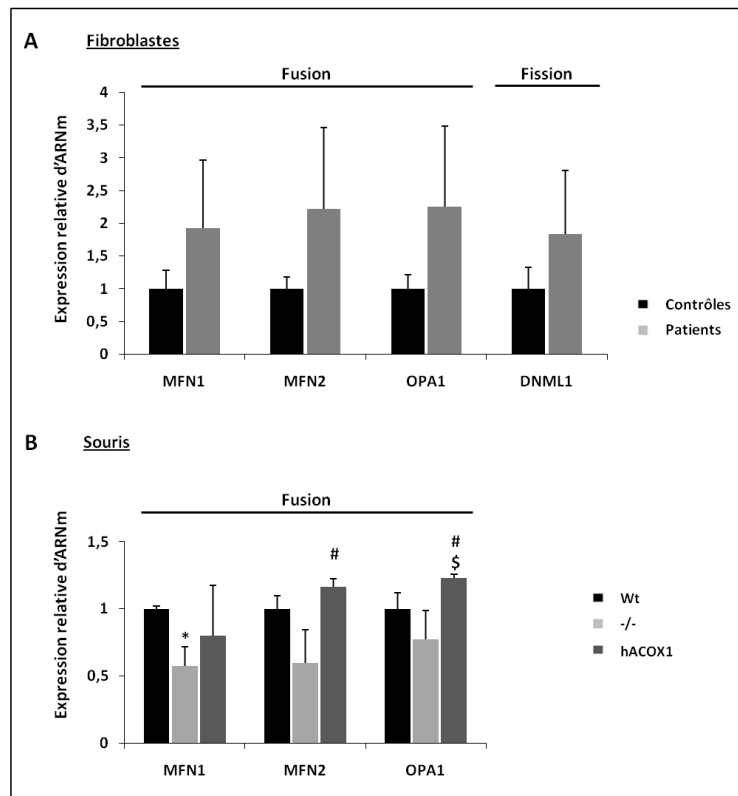


Figure 37. Niveaux d'expression des gènes de fusion et de fission de la mitochondrie analysés par qPCR.

(A) Expression relative en ARNm des gènes de fusion de la mitochondrie mitofuscines MFN1 et MFN2 et OPA1 (Optic Atrophy 1) et de fission DNML1 (Dynamin-1 like protein) dans les lignées de fibroblastes contrôles C1, C2, C3 et C4 (n=4) et de patients P3, P4, P5, P6, P7, P8, P9, P10 et P11 (n=9). (B) Expression relative en ARNm des gènes de fusion de la mitochondrie mitofuscines MFN1 et MFN2 et OPA1 (Optic Atrophy 1) et de fission DNML1 (Dynamin-1 like protein) dans les foies des souris Wild type (Wt), *Acox1*^{-/-} (-/-) et hACOX1. Toutes les réactions de qPCR ont été réalisées en doublets. Les expressions des gènes sont normalisées par rapport à celles des lignées contrôles C1, C2, C3 et C4 pour les fibroblastes et par rapport aux souris Wt pour les souris (trois expériences indépendantes). La significativité est vérifiée par un Random Statistical test avec *** pour $p < 0.001$; ** pour $p < 0.01$ et * pour $p < 0.05$ pour les lignées de fibroblastes. Pour les souris, la significativité est vérifiée par un Random Statistical test (*** et ### pour $p < 0.001$; ** et ## pour $p < 0.01$; * et # pour $p < 0.05$). Les Wt sont comparés aux -/- (*) et aux hACOX1 (\$) et les -/- sont comparés aux hACOX1 (#). Les barres d'erreur sur les histogrammes représentent les écarts types (n=3 souris par lot).

C.2. Souris *Acox1*^{-/-} et hACOX1

La Figure 37 (**B**, p175) représente les expressions des gènes des mitofusines (MFN1 et MFN2), de l'OPA1 et de la DNML1 dans les tissus hépatiques chez les trois groupes de souris sauvages (Wild-Type ou WT), déficientes en *Acox1* (-/-) et les souris déficientes en *Acox1* et transgéniques pour l'ACOX1 humaine (hACOX1).

Chez les souris déficientes en *Acox1* (-/-) l'expression du gène MFN1 est abaissée significativement d'environ 0,7 fois par rapport aux WT alors que les souris hACOX1 ne montrent pas de variations significatives de l'expression du gène par rapport aux souris WT et aux souris *Acox1*^{-/-}. De la même manière, l'expression du gène MFN2 apparaît également abaissée (0,68) chez les *Acox1*^{-/-} par rapport aux WT, mais cette répression n'est statistiquement pas significative. Cependant, l'expression de ce gène est faiblement augmentée dans les souris hACOX1 (1,2 fois) par rapport aux WT.

L'expression du gène OPA1 est diminuée de manière non significative dans les souris *Acox1*^{-/-} par rapport aux Wt alors qu'il est surexprimé dans les souris hACOX1 d'environ 1,2 fois par rapport aux souris WT et *Acox1*^{-/-}.

L'évaluation de l'expression de différents gènes impliqués dans le phénomène de fusion/fission de la mitochondrie dans les fibroblastes montre une tendance à une surexpression de ces gènes. Bien que ces inductions ne soient pas statistiquement significatives, celles-ci montrent une perturbation et un déséquilibre du phénomène fusion/fission dans les fibroblastes. Ces perturbations sont plus évidentes chez les souris *Acox1*^{-/-} avec une diminution de l'expression des gènes impliqués dans la fusion mitochondriale. Ces modifications sont corrigées par l'ACOX1 humaine montrant ainsi le lien entre l'expression de cette enzyme et les changements morphologiques (fusion/fission) au cours de la biogenèse mitochondriale.

C.3. Evaluation du nombre des mitochondries dans les lignées de fibroblastes

Pour évaluer le nombre de mitochondries présentes dans chaque lignée de fibroblastes, le rapport du nombre de copies de l'ADN mitochondrial (ADNmt) au nombre de copies de l'ADN génomique a été déterminé. Cela consistait en l'étude en qPCR des expressions des gènes H2BM, codant pour la sous-unité B de l'histone 1 au niveau de l'ADN génomique, et mtND6 codant la NADH déshydrogénase 6 au niveau de l'ADNmt. La quantité relative de l'ADNmt dans chaque lignée de patients P-NALD par rapport à la moyenne des fibroblastes contrôle C1, C2, C3 et C4, est présentée dans la Figure 38 (**A**). La plupart des lignées de patients, comme P3, P4, P5, P7, P8 et P11 montrent une diminution significative du rapport

ADNmt/ADNg alors que chez deux patients (P9 et P10), ce rapport augmente de 3 fois mais de manière non significative (Figure 38, B). Ces résultats montrent une diminution du nombre de copies de l'ADNmt qui indique une réduction du nombre de mitochondries dans les fibroblastes de patients P-NALD.

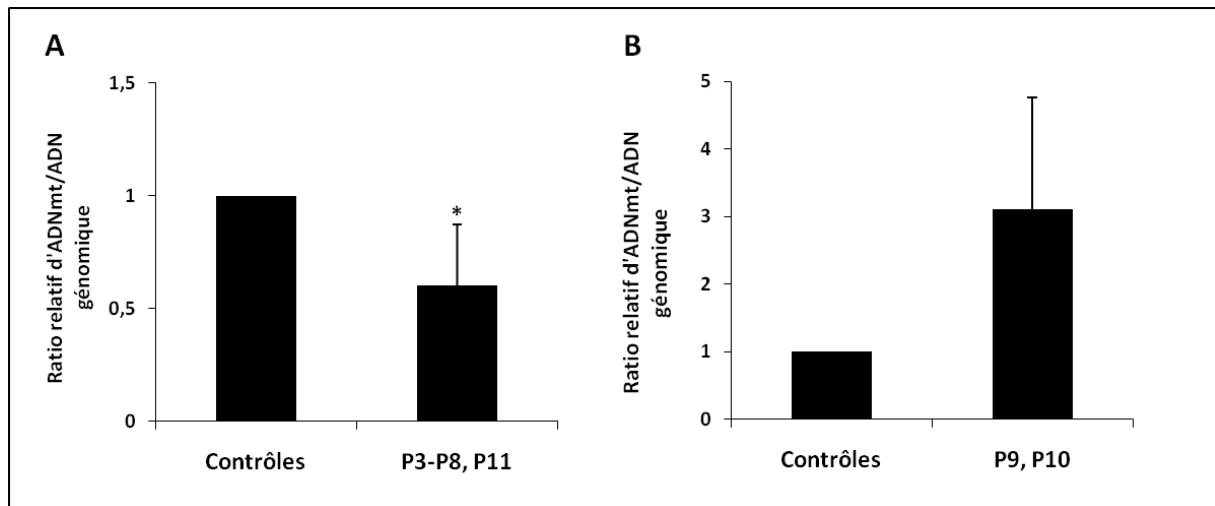


Figure 38. Rapports d'ADN mitochondrial/ADN génomique (ADNmt) dans les fibroblastes. La quantité d'ADNmt est déterminée par l'expression du gène mitochondrial codant la sous-unité 6 de la NADH déshydrogénase (*mtND6*) rapportée à l'expression du gène nucléaire codant la sous-unité B de l'histone 1 (*H2BM*) en qPCR, (A) dans les fibroblastes de patients P3 à P8 et P11 (n=6) et (B) dans les fibroblastes P9 et P10 (n=2). Les valeurs de chaque lignée de patient sont comparées à la moyenne des valeurs des fibroblastes contrôles C1, C2, C3 et C4 (n=4) (deux expériences indépendantes). La significativité est vérifiée par le test Wilcoxon avec *** pour $p < 0.001$; ** pour $p < 0.01$ et * pour $p < 0.05$. Les barres d'erreur sur les histogrammes représentent les écarts types.

D. Etude du métabolisme énergétique de la mitochondrie

La morphologie de la mitochondrie est fortement associée à son métabolisme énergétique. Les modifications de la morphologie des mitochondries dans le cadre de la déficience en ACOX1 humaine ou murine laisse supposer des perturbations potentielles de leur métabolisme. Afin d'évaluer cette hypothèse, de nombreuses expériences ont été réalisées pour évaluer l'expression en ARNm et en protéines des complexes respiratoires. Ceci a été aussi approfondi par la mesure des activités des complexes de la chaîne respiratoire ainsi que la mesure de la respiration cellulaire et le dosage de l'ATP intracellulaire. Cette étude a été menée sur les lignées de fibroblastes de patients P-NALD ainsi que sur les foies de souris déficientes en ACOX1 et transgéniques pour l'ACOX1 humaine.

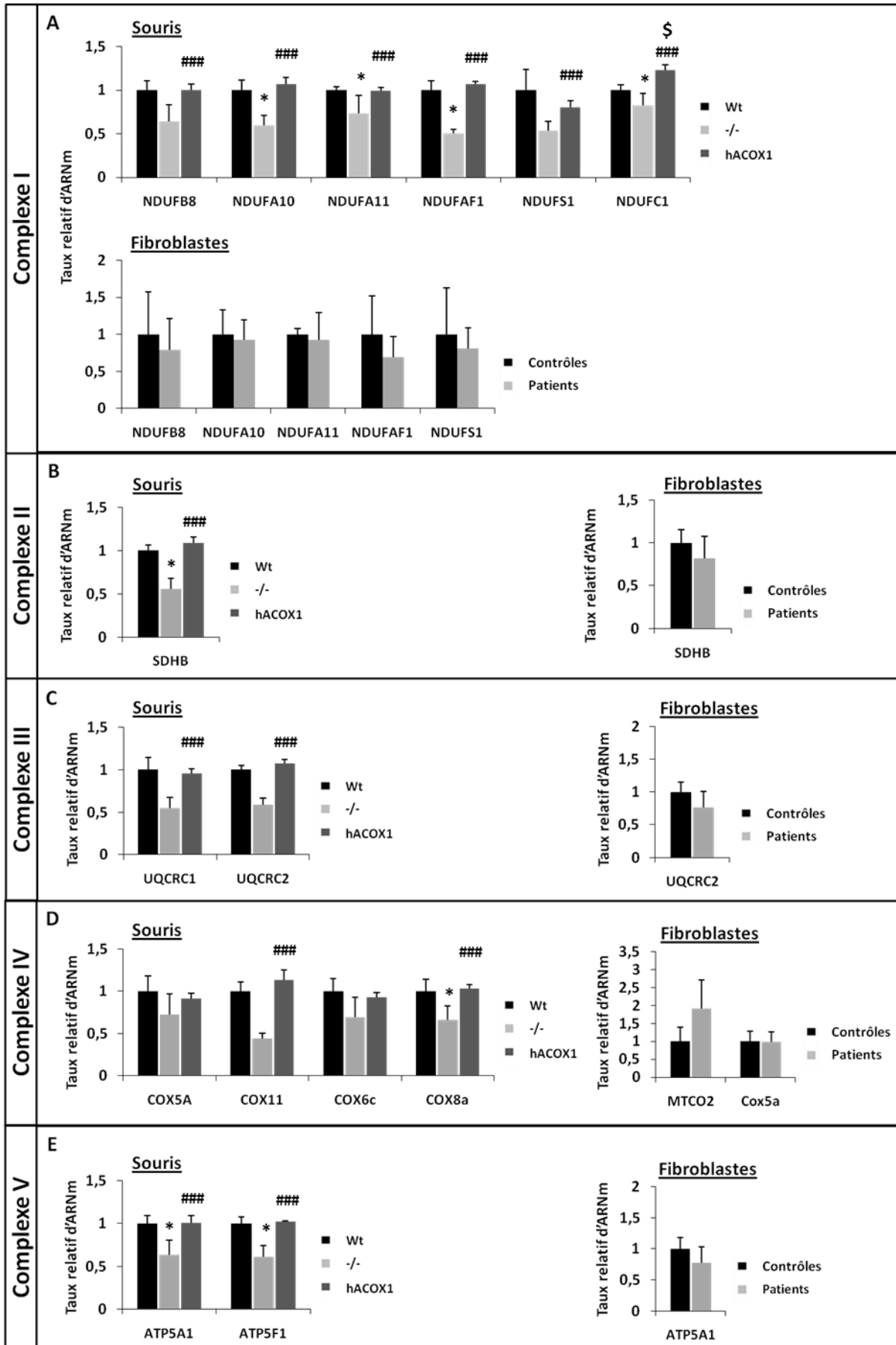
D.1. Evaluation du taux d'expression des ARNm codant les complexes de la chaîne respiratoire dans les lignées de fibroblastes et de souris

Dans un premier temps, des analyses en PCR quantitative ont été réalisées sur les lignées de fibroblastes afin d'évaluer les effets de la déficience en ACOX1 sur l'expression des gènes codant les sous-unités des complexes de la chaîne respiratoire. La Figure 39 représente les résultats obtenus dans les lignées de fibroblastes humains et dans les foies de souris.

Dans les lignées de fibroblastes, les différentes sous-unités des complexes de chaîne respiratoire montrent des expressions comparables chez les patients (P3 à P11) et les lignées de contrôles. Seule la sous-unité COX2 (cytochrome c oxydase sous-unité 2 ou MTCO2) montre une induction de 2 fois dans les fibroblastes P-NALD. Ces résultats indiquent que l'absence de l'activité acyl-CoA oxydase 1 n'influence pas l'expression des gènes codant les différentes composantes de chacun des cinq complexes de la chaîne respiratoire.

Figure 39. Effets de la déficience en ACOX1 sur l'expression de gènes codant les protéines de la chaîne respiratoire.

*L'expression relative des ARNm correspond aux différentes sous-unités de chaque complexe de la chaîne respiratoire dans les fibroblastes contrôles (n=4, histogrammes noirs) et les fibroblastes de patients (n=9, histogrammes gris clairs) ainsi que dans les foies des souris WT (n=3, histogrammes noirs), Acox1^{-/-} (-/-) (n=3, histogrammes gris clairs) et hACOX1 (n=3, histogrammes gris foncés). Les gènes des sous-unités du complexe I (NDUFB8, NDUF A10, NDUF A11, NDUF A1, NDUF S1 et NDUF C1), du complexe II (SDHB), du complexe III (UQCRC1 et UQCRC2), du complexe IV (COX5A, COX11, COX6c et COX8a) et du complexe V (ATP5A1 et ATP5F1) chez l'homme et la souris sont codés par l'ADN génomique. Le gène de la sous-unité COX2 ou MTCO2 est codé par l'ADN mitochondrial. Toutes les réactions de qPCR ont été réalisées en doublets. Les expressions des gènes sont normalisées par rapport aux souris WT. La significativité est vérifiée par un Random Statistical test (***) et ### pour p<0.001 ; ** et ## pour p<0.01 ; * et # pour p<0.05). Les WT sont comparés aux -/- (*) et aux hACOX1 (\$) et les -/- sont comparés aux hACOX1 (#). Les barres d'erreur sur les histogrammes représentent les écarts types. (n=3 souris par lot).*



Parallèlement, nous avons réalisé la même analyse d'expression de gènes par qPCR en utilisant les foies de deux modèles de souris : le modèle déficient en *Acox1* (*Acox1*^{-/-}) et le modèle *Acox1*^{-/-} transgéniques pour l'ACOX1 humaine. La Figure 39 montre les résultats d'expression relative d'ARNm des complexes de la chaîne respiratoire. Il apparaît donc que le niveau d'expression des ARNm correspondant aux sous-unités des complexes (I, II, III, IV et V), diminue chez les souris déficientes en *Acox1* (-/-) par rapport aux souris sauvages (WT). Cette diminution chez les souris déficientes est, d'après ces résultats, corrigée par l'expression de l'ACOX1 humaine au niveau de celui des souris WT. Cela indique un lien entre le niveau d'expression de l'ACOX1, en l'occurrence humaine, et le niveau d'expression des sous-unités des complexes respiratoires.

D.2. Expression des protéines des complexes respiratoires

L'évaluation des expressions protéiques des complexes de la chaîne respiratoire a été réalisée par Western blot en utilisant un cocktail d'anticorps comprenant cinq anticorps dirigés chacun spécifiquement contre une sous-unité de chaque complexe. Cette évaluation a été réalisée sur des extraits de fibroblastes contrôles (C1, C2, C3 et C4) ou de fibroblastes de patients (P3 à P8, P10 et P11) ainsi que sur des homogénats de foies de souris sauvages (WT), *Acox1*^{-/-} (-/-) et les souris humanisées avec l'ACOX1 (hACOX1). La Figure 40 (A) représente les résultats obtenus par Western blot sur les lignées de fibroblastes. Ceux-ci montrent une expression variable entre les contrôles et les patients pour les protéines du complexes I, II, IV et V avec une réactivité faible contre la sous-unité core II du complexe III. L'analyse densitométrique révèle une diminution significative de l'expression moyennée de ces protéines des complexes dans les lignées de patients (P3 à P8, P10 et P11) comparée à la moyenne des 4 lignées contrôles (C1 à C4) (Figure 40, B). Cette diminution est de l'ordre de 50% pour la sous-unité NDUFB8 du complexe I, de 30% pour la sous-unité de 30 kDa du complexe II, de 60% pour la sous-unité II du complexe IV et d'environ 50% pour la sous-unité α du complexe V.

L'analyse des résultats obtenus avec les homogénats de foies de souris montre, contrairement aux fibroblastes, une expression des protéines de complexes I, II, II et V chez les souris *Acox1*^{-/-} et les hACOX1 comparable à celle des WT. Cela indique que l'absence de l'*Acox1* murine ou l'expression de l'ACOX1 humaine n'affectent pas l'expression de ces protéines de complexes (Figure 40, C). Cependant, les souris *Acox1*^{-/-} montrent de faibles intensités de la bande qui correspond au complexe IV. L'analyse de la densité de bandes dans différents échantillons montre clairement une diminution de l'expression protéique de ce

complexe chez les souris *Acox1*^{-/-} par rapport aux WT d'environ 50% comme le montre la figure D. Cette diminution est bien corrigée chez les souris KO exprimant l'ACOX1 humaine (Figure 40, D).

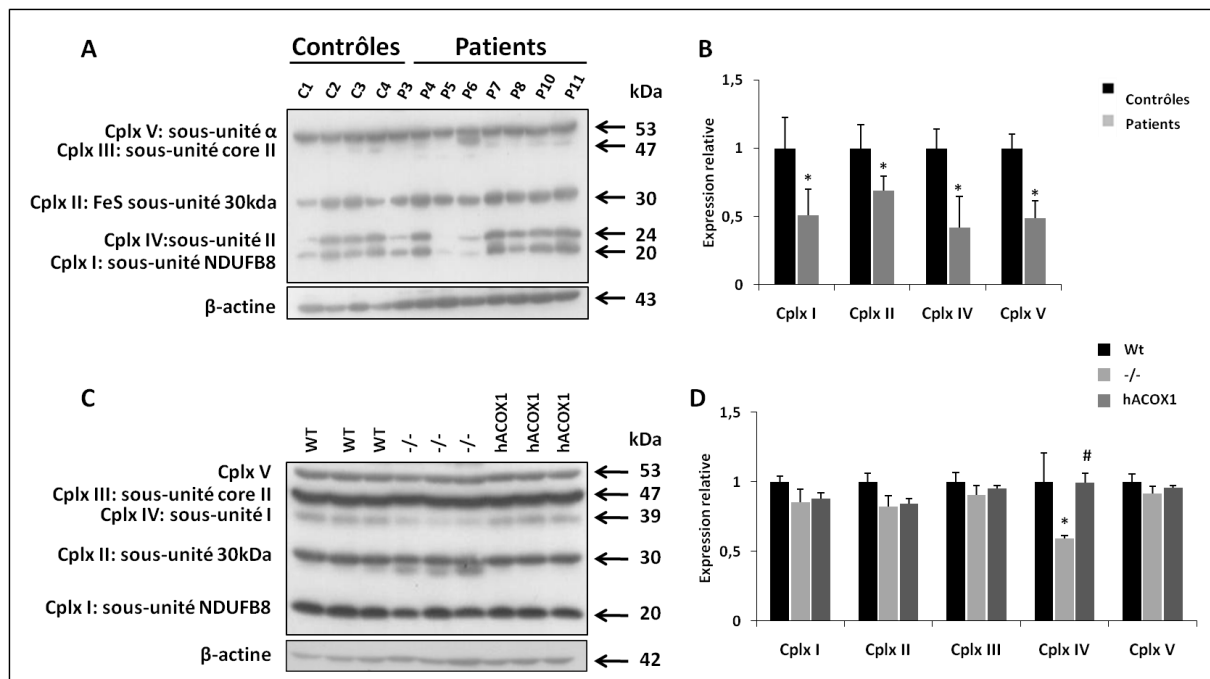


Figure 40. Analyse de l'expression des complexes de la chaîne respiratoire par Western blot. (A) Expression des complexes dans les fibroblastes. (B) Expression relative des rapports de densités des complexes et de la β -actine correspondante dans les fibroblastes réalisée avec le logiciel image J. (C) expression des complexes dans les homogénats de foies de souris Wild-type (Wt), *Acox1*^{-/-} (-/-) et hACOX1. Les statistiques sur les expressions relatives des complexes en (A) sont faites avec le test Wilcoxon (*, $p < 0,05$; **, $p < 0,001$; ***, $p < 0,0001$). Les images sont représentatives de trois expériences indépendantes. Les barres d'erreur sur les histogrammes représentent les écarts types.

D.3. Mesure des activités des complexes de la chaîne respiratoire

L'effet de la déficience en ACOX 1 sur le métabolisme énergétique de la mitochondrie, a été évalué par dosage spectrophotométrique des activités enzymatiques des complexes de la chaîne respiratoire. Les activités obtenues, exprimées en milliUnités enzymatiques, ont été rapportées aux activités en unité enzymatique des complexes II et du complexe IV. Ces activités ont été également rapportées à l'activité de la citrate synthase (enzyme du cycle de Krebs) et aux milligrammes de protéines totales (activités spécifiques). Les résultats obtenus sont représentés dans la Figure 41 (les valeurs des contrôles correspondent à la valeur 1 sur les histogrammes).

Les activités enzymatiques des cinq complexes rapportées individuellement aux complexes II et IV montrent des rapports d'environ 1 pour les complexes I et II dans les fibroblastes de patients, comparables aux niveaux des lignées contrôles. Alors que le

complexe III montre une faible augmentation des rapports d'environ 20%, les rapports d'activités pour le complexe V augmentent d'environ 40% (Figure 41, **A** et **B**). Quand les activités des complexes sont rapportées à l'activité de la citrate synthase, on obtient un résultat similaire à celui obtenu en rapportant aux activités des complexes II et IV, indiquant ainsi une augmentation faible pour le complexe IV, et d'environ 1,4 fois pour le complexe V (Figure 41, **C**). Cependant, les activités spécifiques des complexes (en mU.mg⁻¹ de protéines) ne montrent pas de variations importantes dans les lignées de fibroblastes de patients P-NALD par rapport aux contrôles (Figure 41, **D**). Nous pouvons souligner que cette analyse ne permet d'apprécier que l'activité individuelle de chaque complexe et ne tient pas compte de l'influence de l'activité d'un complexe sur celle d'un autre complexe au sein de la chaîne respiratoire.

Les activités enzymatiques des complexes respiratoires ont été également mesurées dans les foies de souris WT, *Acox1*^{-/-} et les souris hACOX1. Les résultats obtenus sont présentés et calculés de la même façon que pour les fibroblastes. Seul le complexe V n'a pu être mesuré (Figure 42, **p184**). L'activité du complexe I en milliUnités (mU) rapportée à l'activité du complexe IV montrent une activité comparable du complexe I dans les foies de souris WT, *Acox1*^{-/-} et hACOX1 indiquant aucune variation (Figure 42, **A**). Le rapport de l'activité de ce complexe sur l'activité du complexe II montre une diminution non significative entre les souris sauvages et les souris *Acox1*^{-/-}. Alors que, lorsque cette activité est rapportée à l'activité citrate synthase, on observe une diminution significative (Figure 42, **C**). Cette diminution est retrouvée au niveau de l'activité spécifique du complexe I. Les souris hACOX1 ne montrent aucune variation significative des activités du complexe I rapportées à l'activité du complexe IV, à l'activité du complexe II, à l'activité citrate synthase ou aux mg de protéines (activités spécifiques) par rapport aux WT ou aux *Acox1*^{-/-} (Figure 42, **A**, **B**, **C**, et **D**).

De même, l'activité du complexe II ne montre pas de variation significative chez les souris *Acox1*^{-/-} ou hACOX1 par rapport aux WT quand l'activité est rapportée soit à l'activité du complexe IV (Figure 42, **A**) soit à l'activité citrate synthase (Figure 42, **C**) ou aux mg de protéines (Figure 42, **D**). Cependant, ce complexe montre une augmentation d'activité d'environ 1,5 fois par rapport à celle du complexe IV (Figure 42, **A**) chez les *Acox1*^{-/-} comparé aux WT. Cependant, cette augmentation chez les souris hACOX1 n'est pas significative.

L'activité du complexe III rapportée soit à l'activité du complexe II (Figure 42, **B**) soit à l'activité citrate synthase (Figure 42, **C**) soit aux mg de protéines (Figure 42, **D**), montre respectivement une diminution significative d'environ 1,5, 2, et 2 fois dans les souris *Acox1*^{-/-} et les souris hACOX1. Cependant, l'activité de ce complexe chez les souris *Acox1*^{-/-} (Figure

42, **A**) ne varie pas quand elle est rapportée à l'activité du complexe IV et comparée aux WT, alors que chez les souris hACOX1 cette activité diminue de 50% par rapport aux WT et aux *Acox1*^{-/-} (Figure 42, **A**).

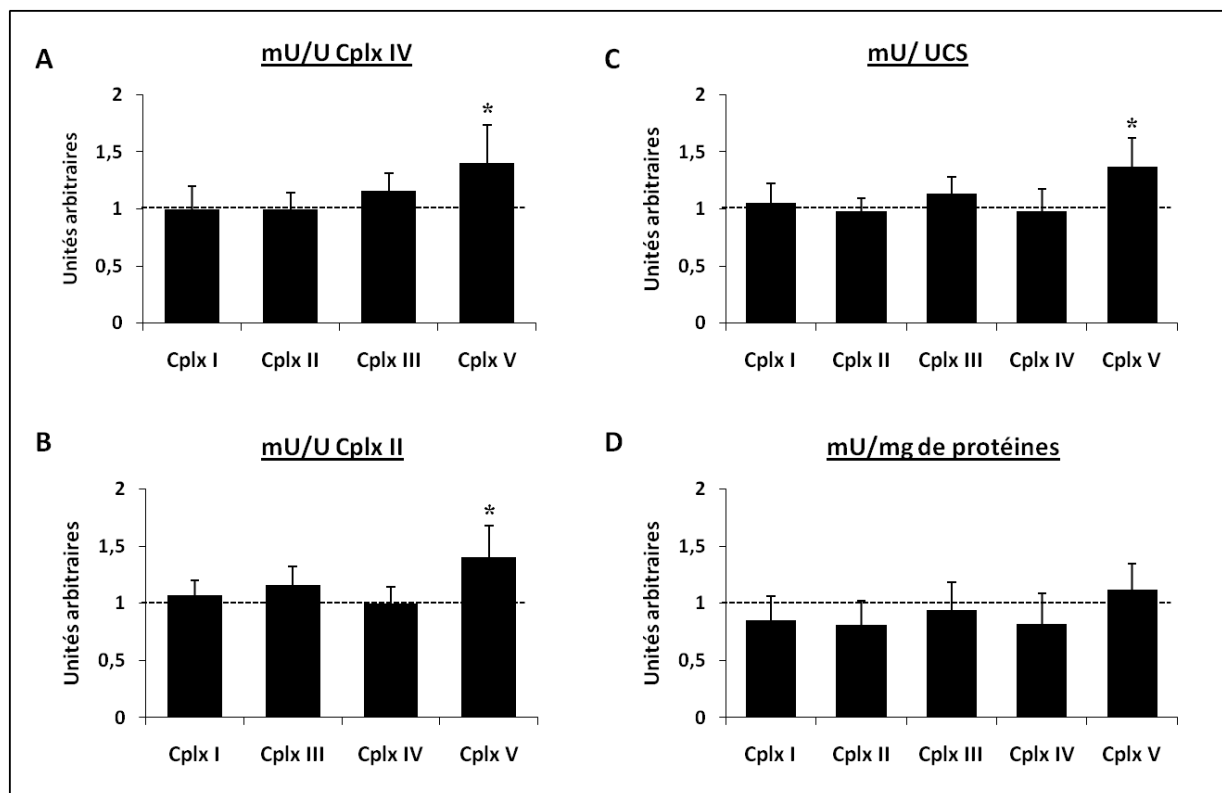


Figure 41. Activités des complexes de la chaîne respiratoire dans les lignées de fibroblastes de patients (P6, P7, P8, P9, P10 et P11).

Les activités enzymatiques dans les lignées de patients (P5 à P11, n=6) ont été mesurées sur des extraits de cellules et sont exprimées en milliUnités enzymatiques (mU) rapportées aux activités des complexes IV (A), II (B), citrate synthase (C) en unité enzymatique et aux mg de protéines (activités spécifiques) (D). (Collaboration avec Rodenburg R.J, Nijmegen, Pays-Bas). Les rapports d'activités sont normalisés par rapport aux lignées de contrôles (la ligne pointillée marque la valeur 1, n=2). Les résultats sont représentatifs de quatre mesures différentes. La significativité est vérifiée par un test Wilcoxon (***) pour $p < 0.001$; ** pour $p < 0.01$; * pour $p < 0.05$). Les barres d'erreur sur les histogrammes représentent les écarts types.

Parmi tous les complexes testés, seule l'activité du complexe IV diminue, qu'elle soit rapportée à l'activité du complexe II (Figure 42, **B**), à celle de la citrate synthase (Figure 42, **C**) ou encore aux mg de protéines (Figure 42, **D**). Cette diminution est clairement abolie chez les souris hACOX1.

Il semblerait donc que certains complexes (I, II et III) montrent des altérations de leurs activités. Cependant, il semble clair que l'activité du complexe IV est perturbée en l'absence de l'Acox1 dans les foies des souris. De plus cette activité est restaurée dans les souris hACOX1 humaine rétablissant ainsi le niveau d'activité de complexe au même niveau que celui des souris sauvages.

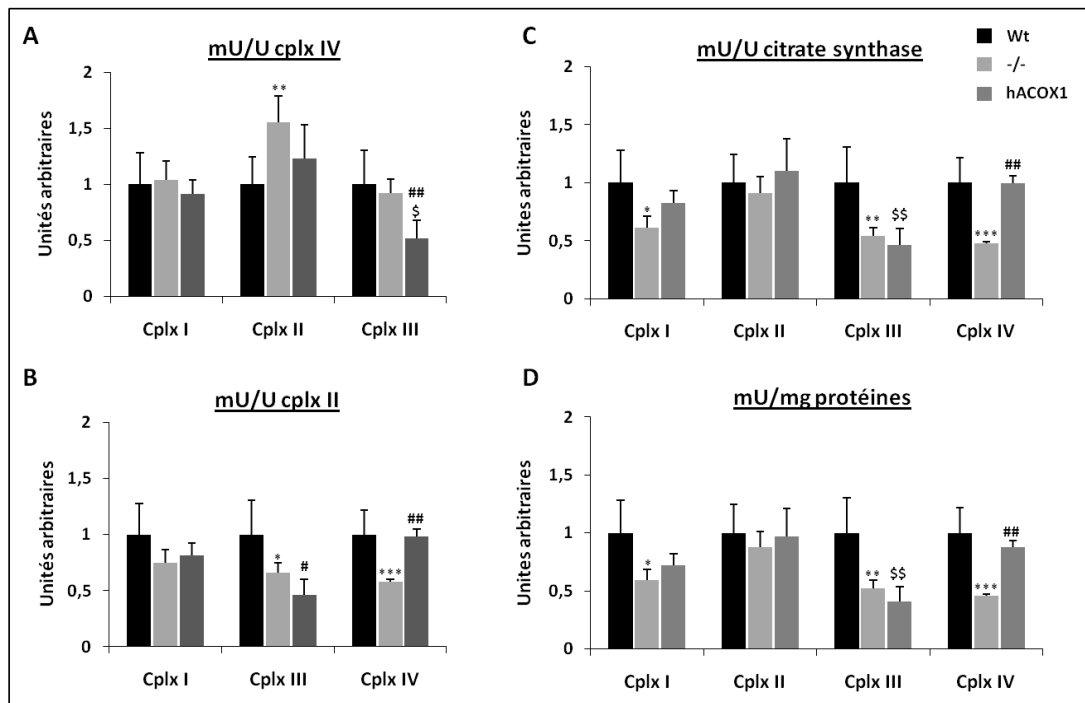


Figure 42. Activités des complexes de la chaîne respiratoire dans les foies de souris Wild-type (Wt), *ACOX1*^{-/-} (-/-) et hACOX1.

Les activités enzymatiques ont été mesurées sur la fraction mitochondriale et sont exprimées en milliUnités enzymatiques (mU) rapportées aux activités des complexes IV (A), II (B), citrate synthase (C) en unité enzymatique et aux mg de protéines (activités spécifiques) (D). Les rapports d'activités chez les souris *Acox1*^{-/-} (n=3, histogrammes gris clairs) et hACOX1 (n=3, histogrammes gris foncés) sont normalisés par rapport aux souris Wt (n=3, histogrammes noirs). Les résultats sont représentatifs de quatre mesures différentes. Les résultats sont représentatifs de six mesures différentes. La significativité est vérifiée par un test Wilcoxon (*** et ### pour $p < 0.001$; ** et ## pour $p < 0.01$; * et # pour $p < 0.05$). Les WT sont comparés aux -/- (*) et aux hACOX1 (\$) et les -/- sont comparés aux hACOX1 (#). Les barres d'erreur sur les histogrammes représentent les écarts types.

D.4. Mesure de la respiration et du niveau d'ATP cellulaire

D.4.1. Mesure de la synthèse d'ATP total et mitochondrial

Etant donné les variations observées au niveau des activités enzymatiques des complexes de la chaîne respiratoire, il était intéressant d'évaluer l'effet de ces variations sur les niveaux d'ATP dans les lignées de fibroblastes de patients atteints de P-NALD ainsi que dans les souris *Acox1*^{-/-} ou hACOX1.

La mesure du taux d'ATP total dans les lignées de fibroblastes montre un niveau comparable dans les fibroblastes contrôles (C1 et C2) et dans les fibroblastes de patients (P6,

P7, P8, P9 et P10) (Figure 43, **A**). Cela indique que le niveau d'ATP total, correspondant à l'ATP synthétisé au cours de la glycolyse et dans la mitochondrie, ne varie pas en cas de déficience en ACOX1. L'inhibition de la glycolyse par l'addition d'iodoacétate permet d'inhiber la synthèse de l'ATP provenant de la voie de glycolyse et par la suite la mesure de l'ATP synthétisé par la mitochondrie. La Figure 43 (**B**) montre une diminution du taux d'ATP mitochondrial chez les patients comparée aux deux lignées contrôles. Bien que le taux d'ATP total ne semble pas être influencé par la déficience en ACOX1, la synthèse de l'ATP mitochondrial est diminuée significativement.

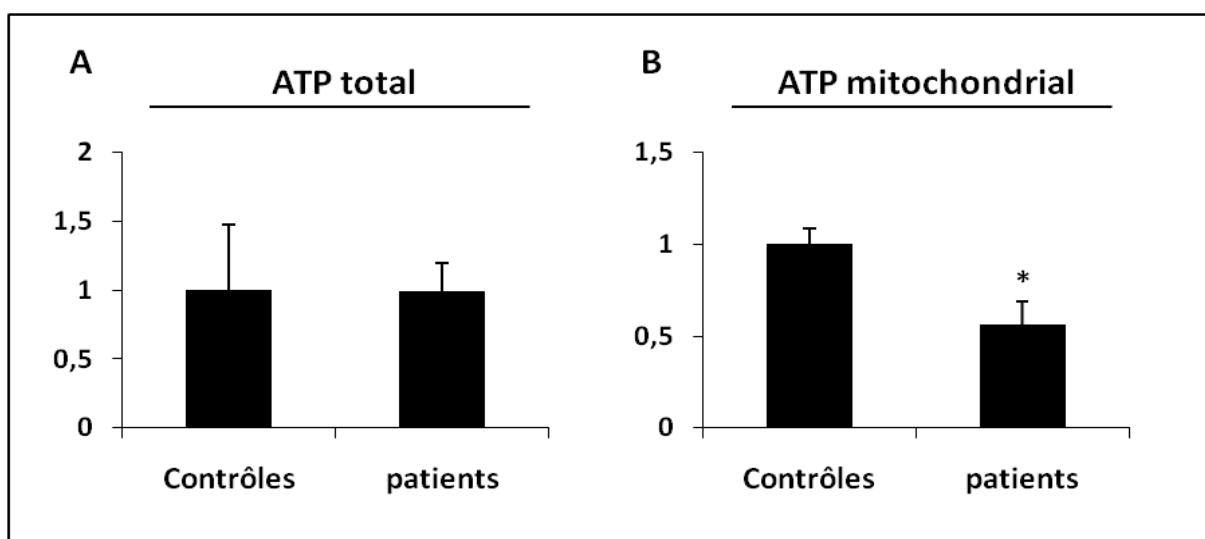


Figure 43. Taux relatif d'ATP dans les lignées de fibroblastes. (A) taux relatif d'ATP total, (B) taux relatif d'ATP mitochondrial mesuré après addition d'iodoacétate, un inhibiteur de la glycolyse. La mesure a été réalisée sur les lignées de contrôles C1 et C2 (n=2) et sur les lignées de patients P6, P7, P8, P9 et P10 (n=5). Les résultats sont représentatifs de deux expériences indépendantes. La significativité a été déterminée par le test statistiques Wilcoxon (*, $p < 0,05$; ** $p < 0,001$; *** $p < 0,0001$). Les barres d'erreur sur les histogrammes représentent les écarts types. Le contenu moyen en ATP dans les fibroblastes contrôles est de 0,0043 pmol ATP/8000 cellules.

Chez les souris *Acox1*^{-/-}, seules les activités enzymatiques du complexe I et du complexe IV diminuent. L'absence de la mesure de l'activité du complexe V a été complétée par l'évaluation du taux d'ATP dans les foies de souris (Figure 44). En effet, le niveau d'ATP chez les souris déficientes en *Acox1* est comparable à celui des souris WT indiquant aucun effet de l'absence de l'*Acox1* sur la production d'ATP comme chez les patients atteints de P-NALD. Cependant, les souris déficientes en *Acox1* et les souris hACOX1 montrent une

augmentation significative d'environ deux fois du taux d'ATP par rapport aux souris WT et aux souris *Acox1*^{-/-} indiquant ainsi un effet de l'ACOX1 humaine sur la production de l'ATP.

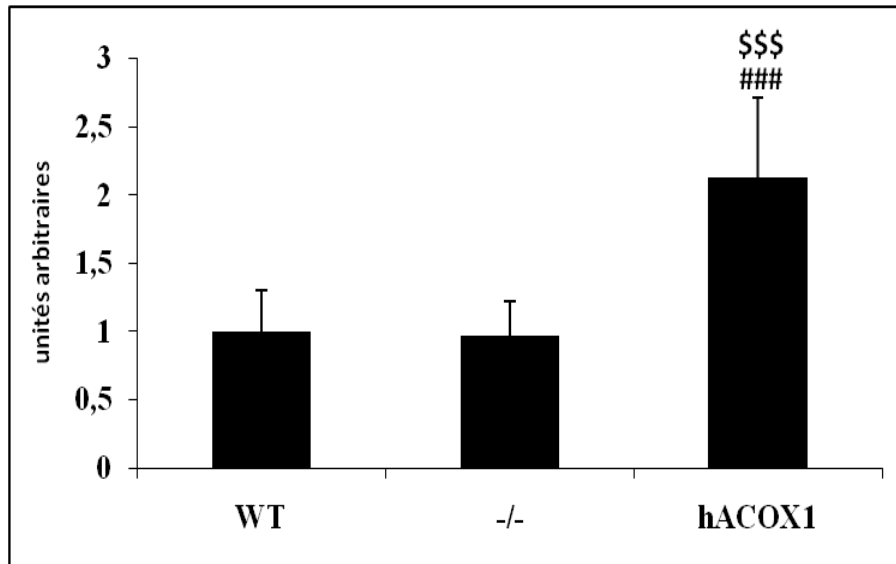


Figure 44. Taux relatif d'ATP dans les foies de souris WT, *ACOX1*^{-/-} (-/-) et hACOX1.

Les résultats sont exprimés en unités arbitraires par rapport aux souris Wt. Cinq mesures différentes ont été réalisées pour ce test avec chaque échantillon de foie de souris. Souris WT (n=3), souris *Acox1*^{-/-} (n=3) et souris hACOX1 (n=3). La significativité a été déterminée avec le test Wilcoxon : * pour Wt comparés aux -/- (*, p<0,05 ; ** p<0,001 ; *** p<0,0001), # pour hACOX1 comparés aux -/- (#, p<0,05 ; ## p<0,001 ; ### p<0,0001) et \$ pour hACOX1 comparés aux WT (\$, p<0,05 ; \$\$ p<0,001 ; \$\$\$ p<0,0001). Les barres d'erreur sur les histogrammes représentent les écarts types moyens. Le contenu moyen en ATP dans les foies de souris WT est de 0,022 μ mol ATP/g de foie.

D.4.2. Mesure de la respiration mitochondriale

La mesure de la respiration mitochondriale a consisté en une mesure de la consommation d'oxygène de façon indirecte grâce à une sonde fluorescente (MitoXpress, Luxcel Biosciences) qui émet un signal fluorescent au fur et à mesure de la consommation de l'oxygène moléculaire. Cette mesure a été effectuée en présence de substrats seuls comme le succinate ou le mélange glutamate/malate pour mesurer, respectivement, la consommation basale d'oxygène ou bien en présence d'ADP pour mesurer la respiration initiée. Ce type de mesure reflète l'activité respiratoire des mitochondries au cours du temps. Le mélange de substrats glutamate/malate ajouté dans le milieu permet de déclencher la respiration basale à partir du complexe I alors que l'ajout du substrat succinate permet de déclencher la respiration basale à partir complexe II et ainsi, dans les deux cas, permet de suivre le transfert d'électrons et la sortie des protons au niveau de ces deux complexes de la matrice vers l'espace

intermembranaire (stade 2). La stimulation de la production d'ATP par l'ajout d'ADP dans le milieu avec le glutamate/malate ou avec le succinate permet de suivre la respiration activée et le couplage respiratoire correspondant à la formation d'ATP couplée au passage des protons de l'espace intermembranaire vers la matrice (stade 3).

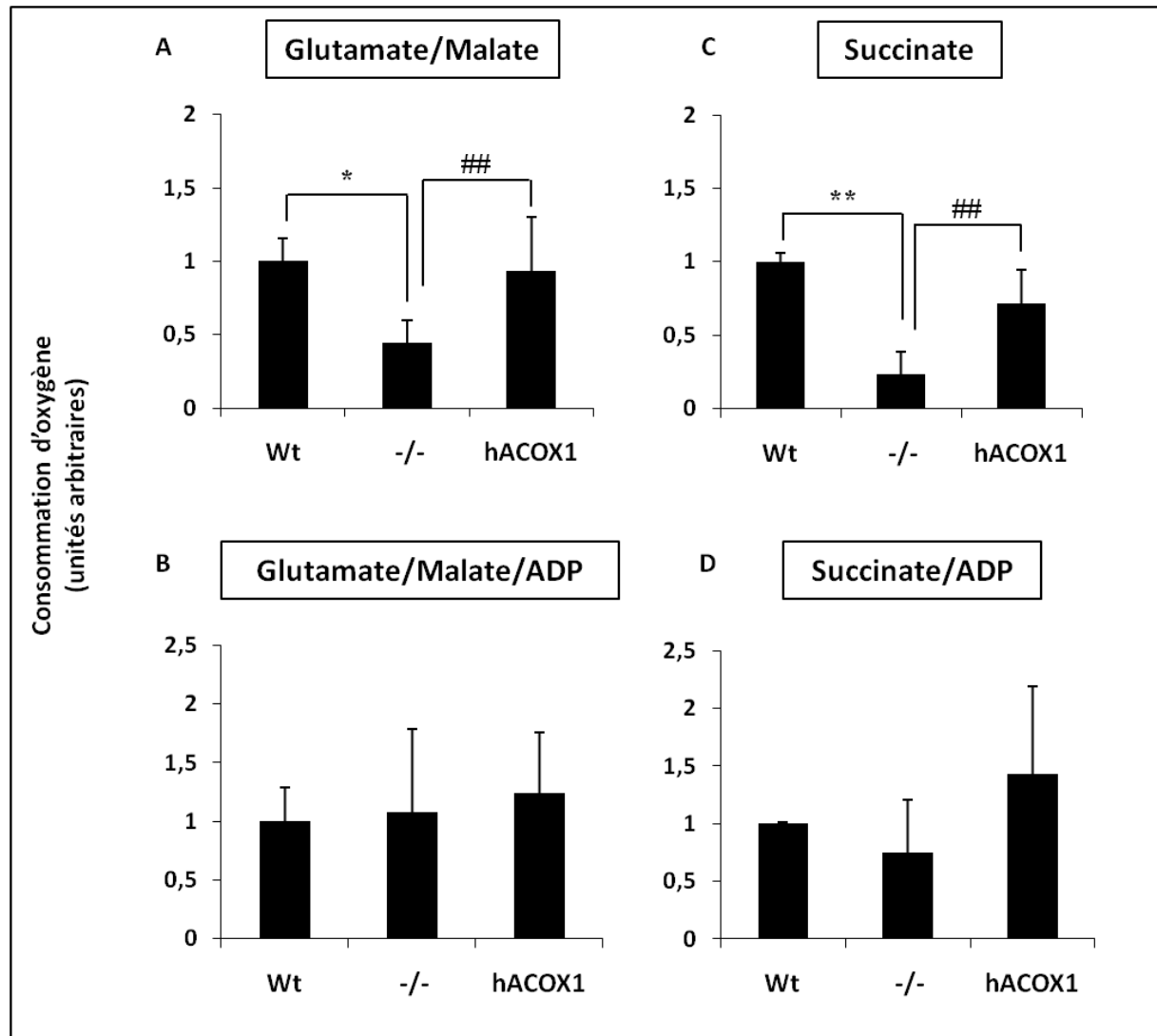


Figure 45. Mesure de la respiration mitochondriale (consommation d'oxygène) dans les foies de souris Wild-Type (WT), *Acox1*^{-/-} (-/-) et les souris hACOX1.

Cette mesure a été effectuée en présence du mélange glutamate/malate seul (A) ou avec le succinate seul (C) ou bien en présence d'ADP (B et D). Six mesures différentes de la respiration mitochondriale ont été réalisées avec chaque substrat pour chaque fraction mitochondriale de foie de souris. Souris Wt (n=3), souris *Acox1*^{-/-} (n=3) et souris hACOX1 (n=3). La significativité a été déterminée avec le test Student : * pour WT comparés aux -/- (*, p<0,05 ; ** p<0,001 ; *** p<0,0001), # pour hACOX1 comparés aux -/- (#, p<0,05 ; ## p<0,001 ; ### p<0,0001) et \$ pour hACOX1 comparés aux WT (\$, p<0,05 ; \$\$ p<0,001 ; \$\$\$ p<0,0001). Les barres d'erreur sur les histogrammes représentent les écarts types moyens.

Cette mesure a été réalisée sur les mitochondries purifiées à partir de foies de souris sauvages (Wt), des souris déficientes en *Acox1* (-/-) et les souris hACOX1. Les résultats

obtenus sont représentés par la Figure 45. L'addition du mélange glutamate/malate dans le milieu en présence des mitochondries (Figure 45, **A**) est suivie d'une diminution significative de la consommation d'oxygène dans les souris *Acox1*^{-/-} comparée aux souris WT alors que les souris hACOX1 montrent un niveau comparable à celui des souris WT. L'augmentation de la consommation d'O₂ chez les souris hACOX1 par rapport aux souris *Acox1*^{-/-} n'est cependant pas significative. Ce résultat indique que l'absence de l'ACOX1 peroxysomale se traduit au niveau mitochondrial par un déséquilibre du gradient de protons. Ces protons sont difficilement expulsés par le complexe I, III, ou IV.

La même mesure réalisée avec le substrat succinate fournit exactement le même résultat obtenu avec le substrat glutamate/malate (Figure 45, **C**). Cela indique que le flux de protons dans les mitochondries des souris *Acox1*^{-/-} passe normalement à travers le complexe I vers l'espace intermembranaire et que le flux pourrait être perturbé au niveau du complexe III ou IV.

L'addition d'ADP en présence du mélange glutamate/malate ou succinate ne montre pas chez les souris *Acox1*^{-/-} ou hACOX1 de variations significatives avec les souris WT (Figure 45, **B** et **D**). Ceci indique que le gradient de protons est normal au niveau du complexe V et que les protons se déplacent de façon normale de l'espace intermembranaire vers la matrice de la mitochondrie pour la synthèse d'ATP.

D'après ces résultats, nous pouvons conclure qu'au niveau hépatique, le flux de protons et par la suite la consommation d'oxygène sont perturbés dans les mitochondries de souris *Acox1*^{-/-} en raison d'une altération de l'expulsion des protons de la matrice vers l'espace intermembranaire.

D.5. Expression de l'ARNm du gène codant la protéine de découplage UCP2 chez les souris

L'UCP2 est une protéine ubiquitaire localisée dans la membrane interne mitochondriale responsable principalement du découplage du potentiel de la membrane interne mitochondriale. L'expression de l'ARNm de l'UCP2 a été évaluée dans les souris sauvages (WT), les souris *Acox1*^{-/-} et les souris hACOX1 (Figure 46). Le résultat obtenu montre une augmentation significative d'expression d'environ 6 fois chez les souris déficientes en ACOX1 par rapport aux souris sauvages. Ce taux est aussi augmenté significativement d'environ 3 fois chez les souris hACOX1 par rapport aux souris sauvages. Ce résultat suggère un découplage du potentiel membranaire mitochondrial en absence de l'ACOX1

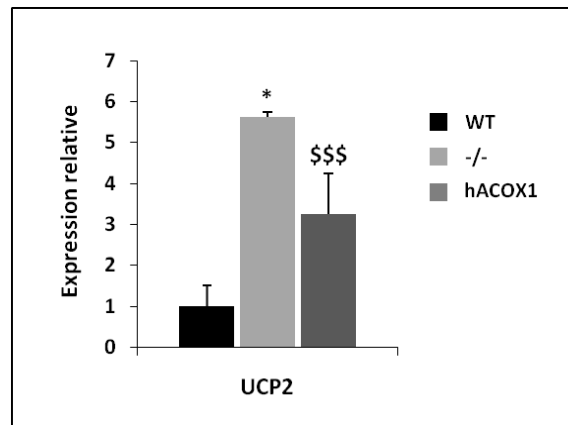


Figure 46. Expression des gènes de l'UCP2 chez les souris.

Expression relative en ARNm du gène de l'UCP2 dans les foies des souris Wild-Type (WT, n=3), *Acox1*^{-/-} (-/-, n=3) et hACOX1 (n=3). La réaction de qPCR a été réalisée en doublet. L'expression du gène est normalisée par rapport à celle des souris Wt. Les résultats sont représentatifs de deux expériences indépendantes. La significativité est vérifiée par un Random Statistical test (*** et ### pour $p < 0.001$; ** et ## pour $p < 0.01$; * et # pour $p < 0.05$). Les WT sont comparés aux -/- (*) et aux hACOX1 (\$) et les -/- sont comparés aux hACOX1 (#). Les barres d'erreur sur les histogrammes représentent les écarts types.

peroxydomale. Cet état n'est pas restauré chez les souris hACOX1 au même niveau que chez les souris sauvages. Cependant, le niveau d'expression de l'UCP2 augmente deux fois moins par rapport aux souris *Acox1*^{-/-}. Ceci indiquerait un lien potentiel entre la déficience en ACOX1 et le dysfonctionnement de la chaîne respiratoire chez les souris caractérisée par une altération de l'activité du complexe IV.

D.6. Expression de la protéine acyl-CoA déshydrogénase à chaîne moyenne

L'acyl-CoA déshydrogénase à chaîne moyenne (MCAD) est l'enzyme de la matrice mitochondriale qui catalyse la première étape de la β -oxydation mitochondriale des acyl-CoA à chaîne linéaire de taille moyenne (entre 6 et 12 atomes de carbone) (Matsubara et al., 1986). L'expression de cette protéine a été évaluée en Western blot dans les fibroblastes de patients (P3, P4 et P5) et dans les fibroblastes contrôles (C1) (Figure 47, p190). Les fibroblastes contrôles montrent une intensité faible pour la bande correspondante à la MCAD (50 kDa). Les fibroblastes de patients montrent une intensité cinq fois plus forte pour la bande de 50 kDa par rapport à celle détectée dans les fibroblastes contrôles. Cela signifierait que l'expression basale de la protéine MCAD dans les fibroblastes contrôles est faible, cependant, la déficience en ACOX1 dans les fibroblastes de patients se traduit par une induction de l'expression de cette protéine.

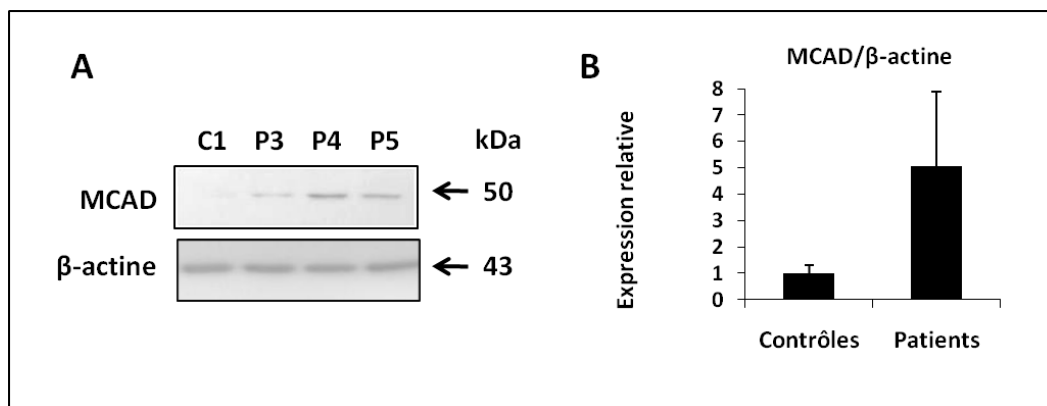


Figure 47. Expression de la protéine MCAD dans les fibroblastes.

(A) Les extraits cellulaires obtenus de la lignée contrôle C1 (n=1) et des lignées de patients P-NALD P3, P4 et P5 (n=3) ont été séparés par électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de SDS puis transférés sur une membrane de PVDF et immunodétectés avec l'anticorps anti-MCAD. La membrane a été ensuite découpée et exposée à l'anticorps anti-β-actine. (B) Le rapport des densités des bandes pour la MCAD et la β-actine a été déterminé avec le logiciel imageJ. Les résultats sont représentatifs de deux expériences indépendantes. Les barres d'erreur sur les histogrammes représentent les écarts types.

E. Régulation du métabolisme mitochondrial

Le coactivateur PGC-1α (« Peroxisome proliferator activated receptor-1 alpha ») est le co-régulateur majeur du métabolisme énergétique mitochondrial. PGC-1α participe fortement à la régulation de plusieurs voies de signalisations intracellulaires afin de maintenir le bon fonctionnement de la mitochondrie. Son activité favorise l'induction des gènes codant *NRF1*, *NRF2* et *TFAM*. Ces gènes codent pour des facteurs de transcription qui participent à l'expression, l'assemblage et le fonctionnement de la chaîne respiratoire afin d'amplifier la biogenèse de la mitochondrie ainsi que la production d'ATP lorsque la cellule en a besoin. Cependant, PGC-1α est lui-même régulé au niveau transcriptionnel et post-traductionnel par des signaux extracellulaires selon la demande de la cellule en énergie.

Dans cette partie, l'expression de PGC-1α, son activité de co-régulation de certains gènes ainsi que les voies de signalisations associées à PGC-1α ont été explorées. Ceci a été réalisé dans le but d'évaluer le rôle de ce coactivateur dans les altérations morphologiques et fonctionnelles mitochondriales observées dans les lignées de fibroblastes atteints de P-NALD.

E.1. Evaluation du taux d'expression des ARNm codant les facteurs de transcription impliqués dans la régulation du métabolisme mitochondrial

Des analyses par PCR quantitative des taux d'ARNm des facteurs de transcription impliqués dans le contrôle des fonctions mitochondriales tels que *NRF1*, *NRF2*, *TFAM* et

TFB1M ont été réalisées sur les fibroblastes humains contrôles et de patients ainsi que sur les homogénats de foies de souris.

Dans les fibroblastes de patients (P3, P4 et P5) (Figure 48), les taux d'ARNm correspondant à NRF1, TFAM, TFB1M et PGC-1 α ne montrent pas de variations significatives d'expression par rapport aux fibroblastes contrôles. Le coactivateur PRC appartenant à la même famille que PGC-1 α est, cependant, réprimé dans les fibroblastes de patients et montre un taux d'expression 2 fois inférieur que dans les fibroblastes contrôle. Malgré les altérations du fonctionnement de la chaîne respiratoire constatées et un taux d'ATP diminué dans les fibroblastes de patients, la déficience en ACOX1 ne semblerait affecter que l'expression de PRC parmi les gènes régulateurs de la biogenèse et du métabolisme mitochondrial (Figure 48).

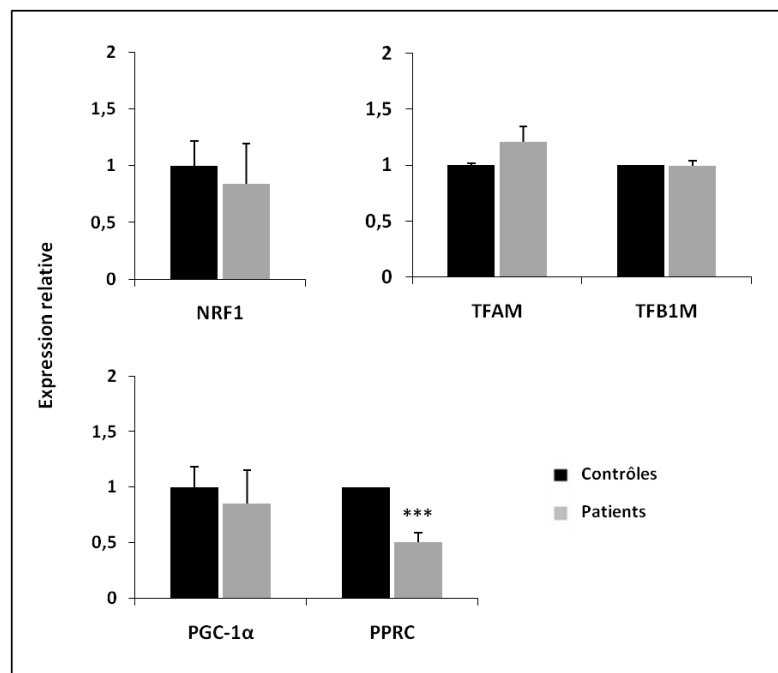


Figure 48. Evaluation de taux d'ARNm des facteurs de transcription mitochondriaux dans les fibroblastes humains.

L'expression relative des ARNm correspondent aux différents facteurs de transcription impliqués dans la régulation des fonctions respiratoire dans les fibroblastes contrôles (histogrammes noirs) et les fibroblastes de patients (histogrammes gris). Trois mesures différentes ont été réalisées pour ce test et les barres d'erreur sur les histogrammes représentent les écarts types.

L'analyse de l'expression d'ARNm chez les souris *Acox1*^{-/-} montre des variations plus importantes au niveau hépatique (Figure 49). En effet, bien que le taux d'expression de NRF1 soit similaire entre les souris sauvages (WT) et les souris KO pour l'*Acox1*, ce taux est augmenté chez les souris transgéniques hACOX1. Le niveau d'expression de NRF2 et TFAM est, cependant, diminué de manière similaire (50%) dans les souris *Acox1*^{-/-}. Ce taux est restauré dans les souris hACOX1 au même niveau que chez les souris sauvages.

Chez les souris, au niveau hépatique, l'expression du gène PGC-1 α ne varie pas en absence de l'*Acox1* (Figure 49). Ce résultat est comparable à celui obtenu dans les fibroblastes de patients P-NALD. Alors que l'expression du gène PRC diminue de manière significative d'environ 20% en absence de d'*Acox1*. Cependant, ce taux est similaire chez les souris sauvages et les souris hACOX1.

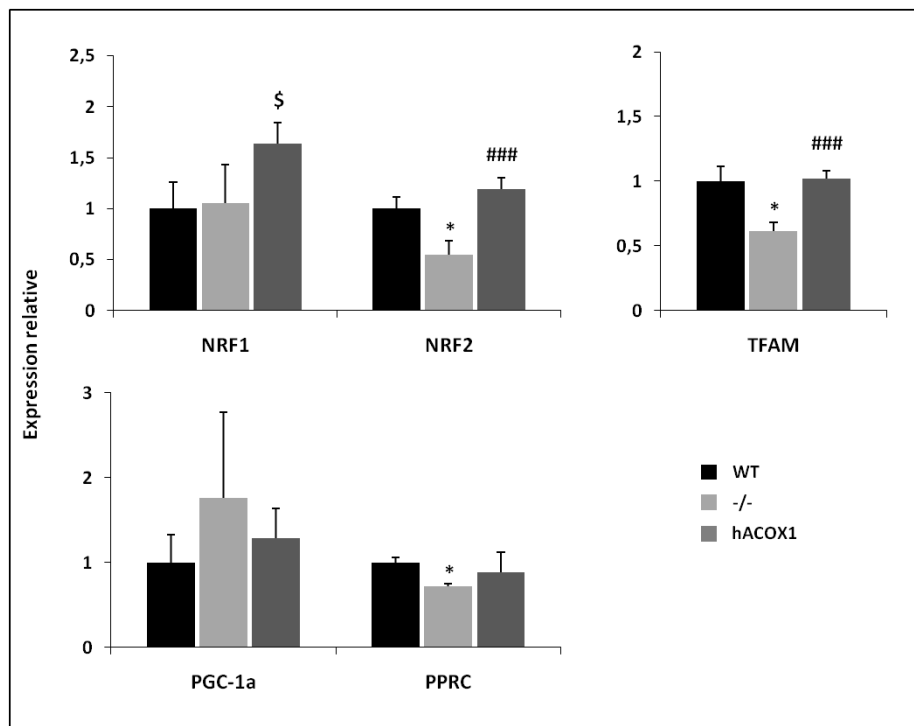


Figure 49. Evaluation de taux d'ARNm des facteurs de transcription mitochondriaux au niveau des foies de souris.

L'expression relative des ARNm correspondant aux différents facteurs de transcription (NRF1, NRF2, TFAM, PGC-1 α et PPRC) impliqués dans la régulation des fonctions respiratoires dans le foie des souris sauvages (WT, histogrammes noirs), les souris KO pour l'*Acox1* (-/-, histogrammes gris clairs) et les souris transgéniques pour l'ACOX1 humaine (hACOX1, histogrammes gris foncés). La significativité a été déterminée avec le test Wilcoxon. * pour Wt comparés aux -/- (*, $p < 0,05$; ** $p < 0,001$; *** $p < 0,0001$), # pour hACOX1 comparés aux -/- (#, $p < 0,05$; ## $p < 0,001$; ### $p < 0,0001$) et \$ pour hACOX1 comparés aux Wt (\$, $p < 0,05$; \$\$ $p < 0,001$; \$\$\$ $p < 0,0001$). Trois mesures différentes ont été réalisées pour ce test et les barres d'erreur sur les histogrammes représentent les écarts types.

Chez les souris, ces résultats indiqueraient un effet de la déficience en Acox1 sur l'expression en ARNm de certains facteurs régulateurs du métabolisme énergétique mitochondrial tels que NRF2, TFAM et PRC et le rôle potentiel de l'ACOX1 humaine dans la restauration de l'expression de ces gènes au même niveau que chez les souris sauvages.

E.2. Expression des facteurs de transcription NRF1, NRF2 et de la désacétylase SIRT1 en immunofluorescence dans les fibroblastes humains

NRF1 et NRF2 ont été décrits comme facteurs de transcription nucléaires qui jouent un rôle essentiel dans le métabolisme mitochondrial. NRF1 et NRF2 régulent plusieurs gènes nucléaires codant des protéines de la chaîne respiratoire (Virbasius et al., 1993a) et activent certains facteurs de transcription mitochondriaux tels que TFAM, TFB1M et TFB2M (Gleyzer et al., 2005) (cf. Rappels bibliographiques, paragraphe I.4.2, p90 et I5, p91).

La sirtuine 1 (SIRT1) est une désacétylase dont l'activité est contrôlée par le rapport NAD^+/NADH intracellulaire où le NAD^+ active SIRT1 et le NADH l'inhibe. Cette protéine renferme une activité désacétylase et une activité de ribosylation de l'ADP (Yamamoto et al., 2007). L'activité désacétylase de SIRT1 favorise la formation d'hétérochromatine par désacétylation de certaines protéines histones ainsi que la régulation de l'activité d'autres protéines non histones impliquées dans le contrôle de la transcription de certains gènes, dans le métabolisme, dans la formation de tumeur, dans la longévité et dans la régulation de la biogenèse et des fonctions mitochondriales (Alcain et Villalba, 2009; Aquilano et al., 2010). SIRT1 régule l'activité du coactivateur PGC-1 α en cas de besoin d'énergie. A ce stade, SIRT1/PGC-1 α peuvent réguler l'activité de NRF-1 induisant ainsi l'expression des composantes de la chaîne respiratoire (Knutti et Kralli, 2001; Rodgers et al., 2008). Récemment, SIRT1, de localisation nucléaire, a été décrite pour résider dans la mitochondrie associée avec le facteur de transcription mitochondrial TFAM au niveau de l'ADNmt suggérant un rôle de SIRT1 dans la régulation de la biogenèse et du métabolisme mitochondrial (Aquilano et al., 2010).

L'expression et la localisation cellulaire des facteurs de transcription ont été évaluées dans les fibroblastes humains contrôles (C1) et de patients P-NALD (P3 et P5) par immunofluorescence en utilisant des anticorps dirigés contre le NRF1, NRF2 et SIRT1. Pour chaque marquage, la sonde MitoTracker Red CMXRos a été utilisée pour colorer les mitochondries. Les cellules ont été par la suite contre-colorées par le Hoechst pour le marquage des noyaux.

E.2.1. Marquage de NRF1 dans les fibroblastes humains

Le marquage de NRF1 dans les fibroblastes contrôle grâce à l'utilisation d'un anticorps secondaire couplé à l'Alexa fluor-488 a révélé une fluorescence au niveau des noyaux et au niveau de formes cytoplasmiques rappelant la structure des mitochondries. Pour valider la localisation intracellulaire de ce marquage, la sonde MitoTracker Red CMXRos et le colorant Hoechst ont été utilisés en contre coloration (Figure 50). Les images obtenues avec le Hoechst confirment la localisation nucléaire du marquage par NRF1. De plus, la superposition des images obtenues avec le marquage des mitochondries en rouge et du marquage de NRF1 en vert montre une co-localisation des deux marquages mitochondrial et nucléaire pour NRF1. Ce résultat, inédit, suggérerait une double localisation intracellulaire du facteur de transcription NRF1 au niveau du noyau et de la mitochondrie dans fibroblastes. Bien que cela puisse suggérer différents mécanismes de régulation du métabolisme et de la biogenèse mitochondriale non décrits jusqu'à présent, la même expérience réalisée avec les fibroblastes de patients P-NALD (P3 et P5), montre exactement le même résultat obtenu avec les fibroblastes contrôles suggérant ainsi qu'il n'y a pas de lien entre l'expression/localisation du facteur NRF1 (Figure 50) et la déficience en ACOX1 dans les fibroblastes de patients P-NALD.

E.2.2. Marquage de NRF2 dans les fibroblastes humains

Le marquage de NRF2 dans les fibroblastes contrôles et de patients atteints de P-NALD a été réalisé de la même façon que celui pour NRF1 (cf. paragraphe E.2.1, ci-dessus). Les résultats du marquage avec l'anticorps anti-NRF2 montrent un marquage exclusivement nucléaire qui est confirmé par la coloration Hoechst des noyaux dans les fibroblastes contrôles (Figure 51, **p196**). La superposition des images obtenues avec l'anti-NRF2 et le MitoTracker Red CMXRos ne montrent pas une co-localisation NRF2/mitochondries indiquant une localisation uniquement nucléaire de ce facteur. Les fibroblastes P-NALD (P3 et P5) montre également une localisation nucléaire de NRF2 (Figure 51). Cela signifie que NRF2 est exprimé de la même manière dans les fibroblastes contrôles et dans les fibroblastes de patients et qu'il n'y a pas de différence de localisation intracellulaire de ce facteur qui réside dans le noyau.

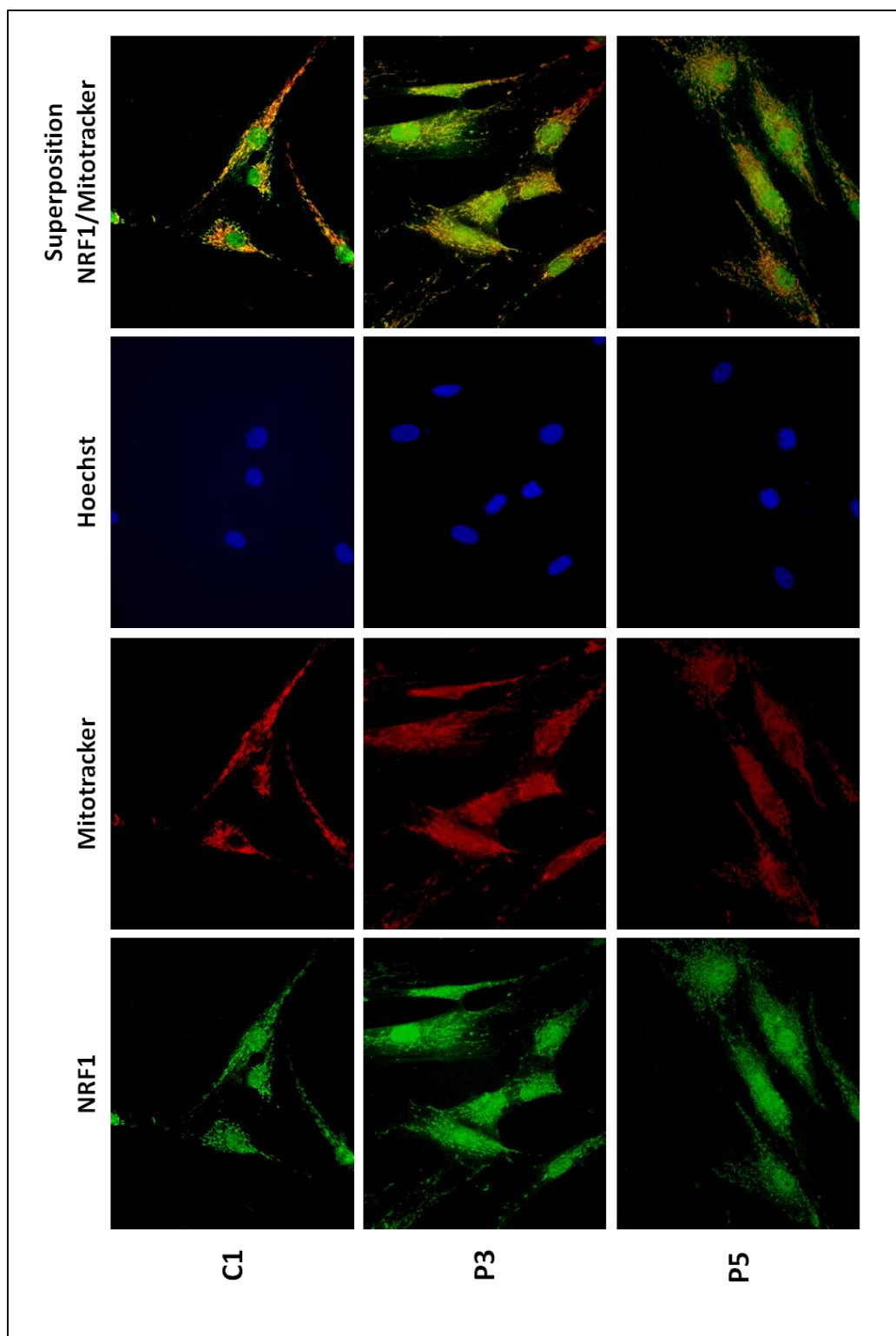


Figure 50. Images d'immunofluorescence par microscopie à fluorescence des fibroblastes contrôles (C1) et des fibroblastes de patients atteints de P-NALD (P3 et P5) pour les mitochondries et NRF1.

Les cellules ont été cultivées sur des lamelles pendant 24h. Les mitochondries ont été ensuite marquées avec le MitoTrackerRed CMXRos (marquage en rouge) puis fixées au paraformaldéhyde. Le marquage de NRF1 a été réalisé avec l'anticorps anti-NRF1. Les cellules ont été ensuite contremarquées avec un anticorps couplé à l'Alexa-Fluor 488 dirigé contre NRF1 (marquage en vert). Le noyau a été coloré avec du Hoechst. Les images de superpositions NRF1/MitoTracker ont été réalisées avec le logiciel image J. Les images sont représentatives de deux expériences indépendantes (Grossissement 63x).

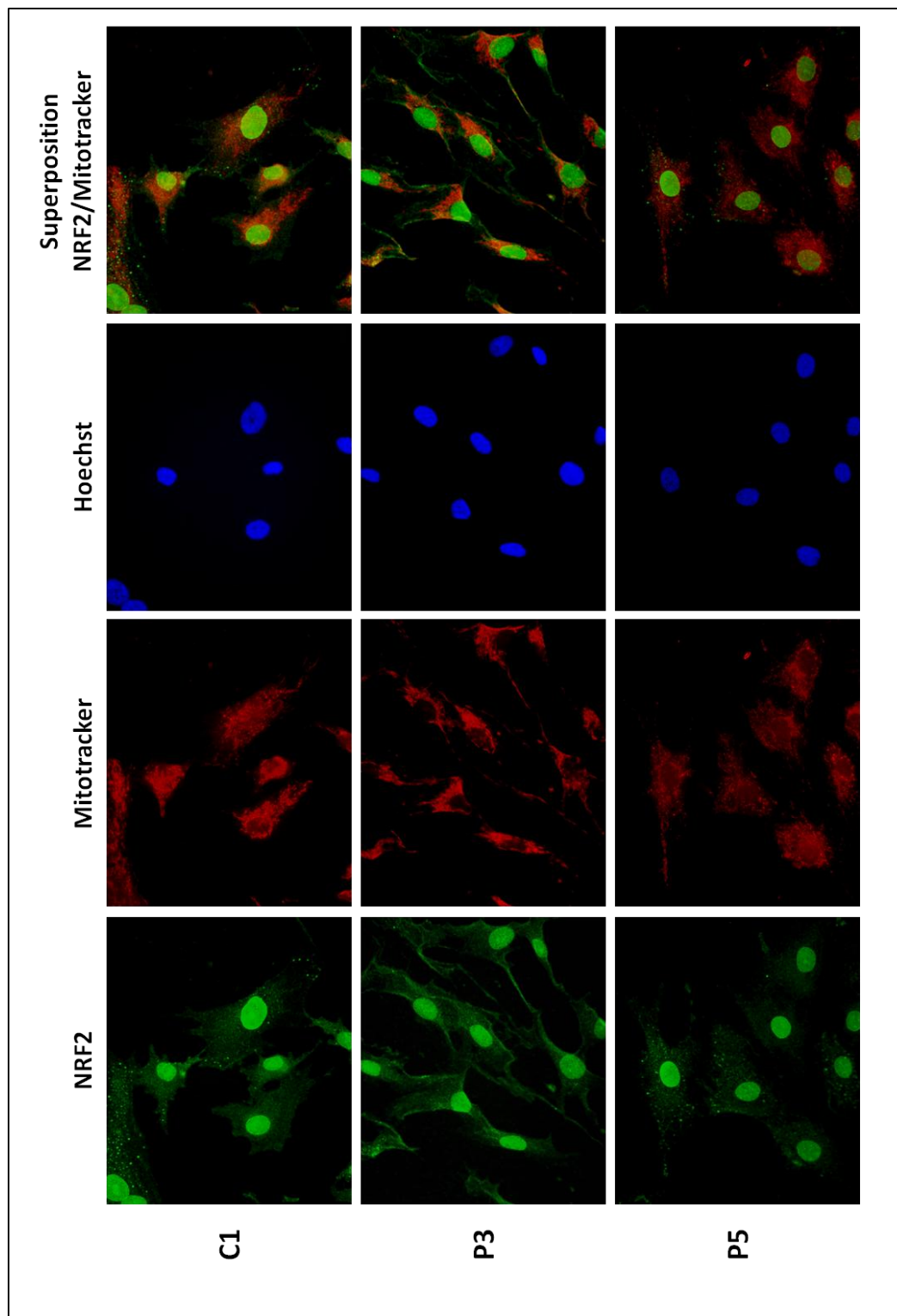


Figure 51. Images d'immunofluorescence par microscopie à fluorescence des fibroblastes contrôles (C1) et des fibroblastes de patients atteints de P-NALD (P3 et P5) pour les mitochondries et NRF2.

Les cellules ont été cultivées sur des lamelles pendant 24h. Les mitochondries ont été ensuite marquées avec le MitoTrackerRed CMXRos (marquage en rouge) puis fixées au paraformaldéhyde. Le marquage de NRF2 a été réalisé avec un anticorps anti-NRF2. Les cellules ont été ensuite contremarquées avec un anticorps couplé à l'Alexa-Fluor 488 dirigé contre NRF2 (marquage en vert). Le noyau a été coloré avec du Hoechst. Les images de superpositions NRF2/MitoTrackeront été réalisées avec le logiciel image J. Les images sont représentatives de deux expériences indépendantes (Grossissement 63x).

E.2.3. Marquage de SIRT1 dans les fibroblastes humains

Le marquage de SIRT1 dans les fibroblastes contrôles a été réalisé grâce à l'utilisation d'un anticorps anti-SIRT1 et d'un anticorps secondaire couplé à l'Alexa fluor-488 permettant de visualiser SIRT1 en vert. Les mitochondries ont été aussi marquées avec la sonde MitoTracker Red CMXRos (coloration rouge). La coloration des cellules avec le Hoechst a permis de révéler les noyaux (Figure 52, **p198**). Tout comme le marquage de NRF1, l'anti-SIRT1 montre la présence de SIRT1 au niveau du noyau et des mitochondries. La coloration du Hoechst confirme une localisation nucléaire de SIRT1. La superposition des images obtenues avec le marquage des mitochondries en rouge par le MitoTracker Red CMXRos et le marquage de SIRT1 en vert montre une co-localisation des deux marquages mitochondrial et nucléaire pour SIRT1 (Figure 52). Ce résultat confirme une double localisation de cette protéine au niveau nucléaire et mitochondrial, une observation déjà rapportée dans cellules de neuroblastome, les cellules HeLa et dans les cellules HEK293 chez l'homme (Aquilano et al., 2010). Les fibroblastes de patients P-NALD (P3 et P5), montrent exactement le même résultat que celui obtenu avec les fibroblastes contrôles suggérant ainsi que, comme pour NRF1 et NRF2, il n'y a pas de lien entre la déficience en ACOX1 dans les fibroblastes de patients P-NALD et l'expression/localisation de la SIRT1 (Figure 52).

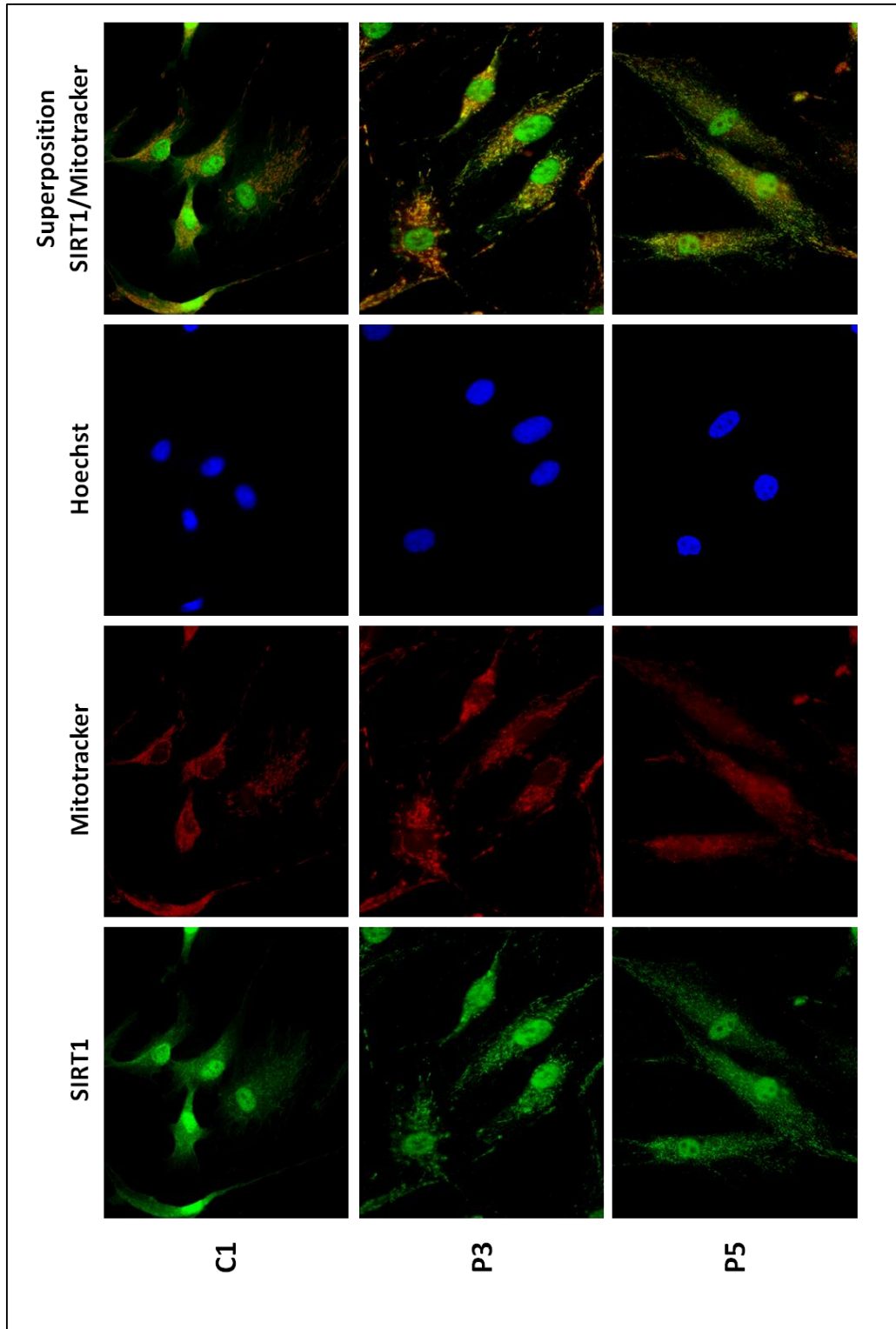


Figure 52. Images d'immunofluorescence par microscopie à fluorescence des fibroblastes contrôles (C1) et des fibroblastes de patients atteints de P-NALD (P3 et P5) pour les mitochondries et SIRT1.

Les cellules ont été cultivées sur des lamelles pendant 24h. Les mitochondries ont été ensuite marquées avec le MitoTrackerRed CMXRos (marquage en rouge) puis fixées au paraformaldéhyde. Le marquage pour SIRT1 a été réalisé avec l'anticorps anti-SIRT1. Les cellules ont été ensuite contre-marquées avec un anticorps couplé à l'Alexa-Fluor 488 dirigé contre SIRT1 (marquage en vert). Le noyau a été coloré avec du Hoechst. Les images de superpositions SIRT1/MitoTracker ont été réalisées avec le logiciel image J. Les images sont représentatives de deux expériences indépendantes (Grossissement 63x).

E.3. Expression protéique de NRF1 et NRF2 dans les fibroblastes humains par Western blot

Par Western blot, les expressions protéiques des deux facteurs de transcription NRF1 et NRF2 ont été analysées (Figure 53). Pour analyser le niveau d'expression protéique, nous avons d'abord estimé l'intensité des bandes par densitométrie, puis nous avons calculé le rapport intensité de bande NRF1/intensité de bande de β -actine (Figure 53, A). La Figure 53 (B) montre une diminution de la moyenne des rapports d'environ 50% dans les fibroblastes P-NALD. Cependant, ce résultat n'atteint pas le seuil de significativité.

De même, l'expression de NRF2 montre des intensités de bandes qui ne varient pas entre les fibroblastes contrôles et P-NALD (Figure 53, C), et cela est confirmé par l'analyse du rapport des densités NRF2/ β -actine qui ne montre pas de variation d'expression de NRF2 entre les contrôles et les patients (Figure 53, D).

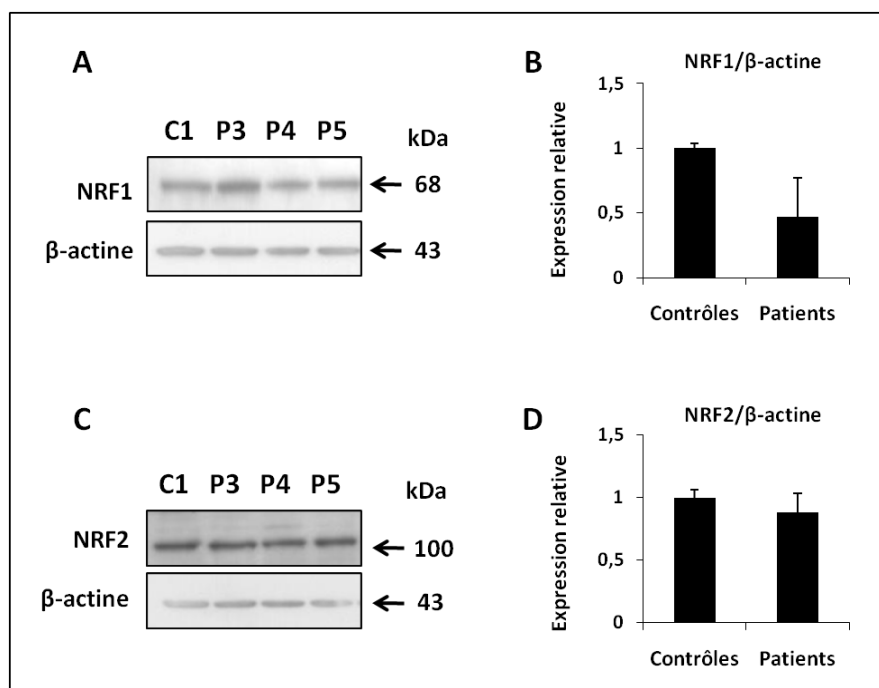


Figure 53. Analyse de l'expression de NRF1 et NRF2 dans les fibroblastes par Western blot. Les extraits cellulaires obtenus à partir de la lignée de fibroblastes contrôles C1 (n=1) et des fibroblastes de patients P-NALD P3, P4 et P5 (n=3) ont été séparés par électrophorèse en gel de polyacrylamide en présence de SDS puis transférés sur une membrane de PVDF et immunodétectés avec les anticorps anti-NRF1(A) et anti-NRF2 (C). Les membranes ont été ensuite découpées et exposées à l'anticorps anti- β -actine. (B) Les rapports des densités des bandes pour de NRF1 (B) ou NRF2 (D) et la β -actine ont été déterminées avec le logiciel imageJ. Les résultats sont représentatifs de deux expériences indépendantes. Les barres d'erreur sur les histogrammes représentent les écarts types.

Ces résultats confirment les observations réalisées par immunofluorescence des marquages de NRF1 et NRF2 et les résultats d'expression en ARNm de NRF1 dans les fibroblastes. Ce qui suggère de nouveau qu'il n'y aurait pas de lien existant entre la déficience en ACOX1 et l'expression de ces facteurs de transcription.

E.4. Expression de PGC-1 α dans les lignées de fibroblastes de patients P-NALD

E.4.1. Expression de PGC-1 α dans les lignées de fibroblastes

L'expression de PGC-1 α dans les lignées de patients P3 à P8, P10 et P11 et dans les lignées contrôles C1 à C4 de fibroblastes a été étudiée par Western blot (Figure 54). La densité de chaque bande obtenue pour PGC-1 α et pour la β -actine a été mesurée avec le logiciel image J. Le niveau d'expression relative de PGC-1 α dans chaque lignée a été obtenu en rapportant la densité des bandes de PGC-1 α à celles de la β -actine correspondantes.

L'expression relative du taux de la protéine PGC-1 α d'après les résultats du Western blot montre une diminution significative dans les lignées de patients d'environ 50% par rapport à celle des lignées de fibroblastes contrôles. L'absence de variations du niveau d'expression d'ARNm PGC-1 α (Figure) et la diminution significative du taux de la protéine PGC-1 α dans les fibroblastes P-NALD, indiqueraient une régulation au niveau traductionnel ou post-traductionnel de PGC-1 α .

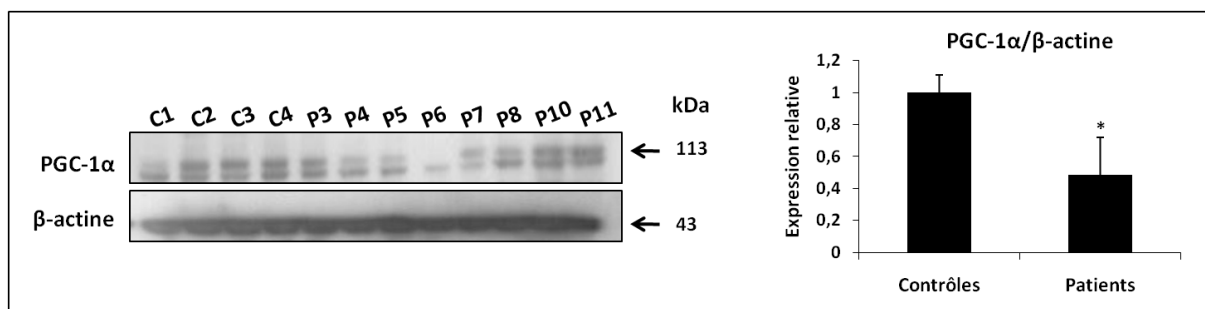


Figure 54. Analyse de l'expression de la protéine PGC-1 α par Western blot. La bande à 113 kDa correspond à PGC-1 α (d'après données fournisseur Calbiochem, réf. ST1202). La densité de chaque bande a été déterminée avec le logiciel imageJ. L'expression de PGC-1 α a été calculée en rapportant la densité de chaque bande à celle de la β -actine. L'expression relative a été obtenue en comparant la moyenne des rapports des patients (P3 à P8, P10 et P11) avec la moyenne des contrôles (C1 à C4). Les résultats sont représentatifs de deux expériences indépendantes. La significativité a été déterminée avec le test Wilcoxon (*, $p < 0,05$; ** $p < 0,001$; *** $p < 0,0001$). Les barres d'erreur sur les histogrammes représentent les écarts types.

E.4.2. Régulation du coactivateur PGC-1 α dans les fibroblastes humains

La séquence protéique de PGC-1 α renferme plusieurs sites de phosphorylation, d'acétylation, de méthylation et d'ubiquitinylation. Ces sites sont les cibles de différentes modifications post-traductionnelles modulant ainsi l'activité de PGC-1 α que nous avons voulu élucider. Pour cela, PGC-1 α a été immunoprécipité avec un anticorps anti-PGC-1 α à partir d'extraits totaux des fibroblastes contrôles (C1) et P-NALD (P3, P4 et P5). La fraction immunoprécipitée a été, par la suite, séparée sur un gel dénaturant de polyacrylamide et après transfert, révélée soit par un anticorps anti-sérine phosphorylée soit par un anticorps anti-lysine acétylée et enfin la présence de PGC-1 α dans la fraction immunoprécipitée a été révélée par l'anticorps anti-PGC-1 α .

La Figure 55 représente les résultats d'immunoprecipitation. L'anti-phospho sérine a révélé des bandes dans toutes les lignées de patients et de contrôle. Cependant, PGC-1 α montre des phosphorylations de sérines plus importantes dans les lignées de patients que dans la lignée contrôle. Cependant, seules les lignées de patients montrent une acétylation de PGC-1 α . Ce résultat montre que dans les fibroblastes de patients, le niveau de phosphorylation de la protéine PGC-1 α est augmenté par rapport aux contrôles et en même temps, cette augmentation de la phosphorylation est accompagnée d'une acétylation de PGC-1 α uniquement dans les fibroblastes P-NALD.

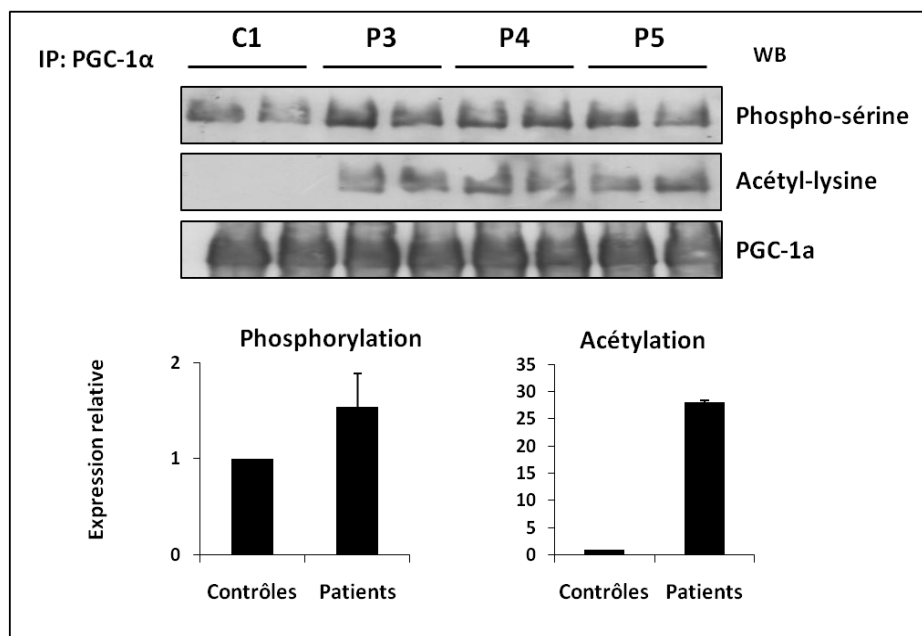


Figure 55. Régulation post-traductionnelle de PGC-1 α en immunoprécipitation. PGC-1 α a été immunoprécipité par un anticorps anti-PGC-1 α dans les extraits cellulaires (1mg) des lignées de fibroblastes contrôle C1 (n=1) et de patients P3, P4 et P5 (n=3). L'immunoprécipité a été ensuite déposé sur gel d'acrylamide et révélé en Western blot par les anticorps anti-phosphosérine, anti-acétyl-lysine et anti-PGC-1 α . Les résultats sont représentatifs d'une seule expérience. Les barres d'erreur sur les histogrammes représentent les écarts types.

E.5. Evaluation des voies de signalisation régulant l'expression de PGC-1 α

Les principales protéines des voies de signalisation régulant l'expression de PGC-1 α , appartenant à la voie de l'AMP kinase et à la voie Akt ont été étudiées dans les lignées de fibroblastes de patients et de contrôles. La forme phosphorylée et non phosphorylée de l'AMPK et de l'Akt ont été détectées par Western blot. L'expression relative de la phospho-AMPK et de la phospho-Akt a été calculée en rapportant l'expression des formes phosphorylées à celles des formes non phosphorylées respectives. Les résultats obtenus (Figure 56) montrent une diminution significative d'environ 60% de la phosphorylation de l'AMPK dans les lignées de patients par rapport aux lignées de contrôles. Pour la voie de l'Akt, les résultats obtenus ne montrent pas de différence de la phosphorylation d'Akt entre les fibroblastes de patients et ceux de contrôles.

La déficience en ACOX1 dans les lignées de patients P-NALD résulte en un effet inhibiteur de la voie de l'AMPK. Généralement, il est admis que l'AMPK est inhibée quand le rapport AMP/ATP augmente dans la cellule. Pour mieux apprécier l'activité de l'AMPK, nous avons évalué l'expression et la phosphorylation de l'acyl-CoA carboxylase, une protéine cible de l'AMPK.

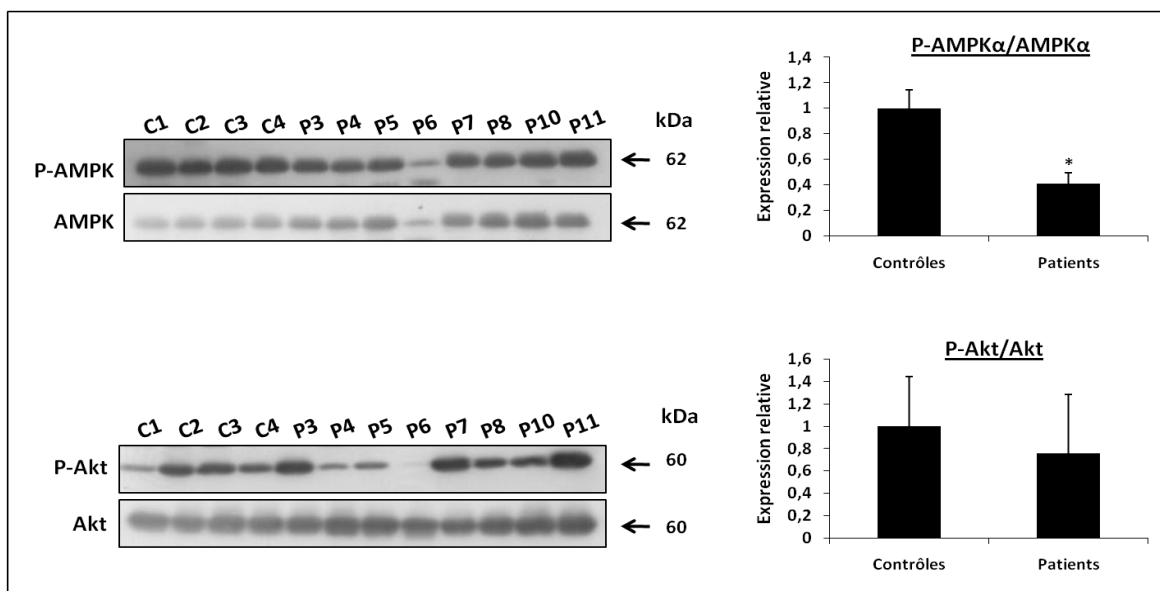


Figure 56. Etude de l'expression de l'AMPK et de l'Akt par Western blot.

La densité de chaque bande a été déterminée avec le logiciel imageJ. Les expressions relatives de la phospho-AMPK et de la phospho-Akt ont été calculées en rapportant la densité de chaque bande à celle de la forme non phosphorylée correspondante. L'expression relative a été obtenue en comparant la moyenne des rapports des patients P3 à P8, P10 et P11 (n=8) avec la moyenne des contrôles (n=4) (C1 à C4). Les résultats sont représentatifs de trois expériences indépendantes. La significativité a été déterminée avec le test Wilcoxon (*, $p < 0,05$; **, $p < 0,001$; ***, $p < 0,0001$). Les barres d'erreur sur les histogrammes représentent les écarts types.

F. Expression de l'acétyl-CoA carboxylase (ACC) dans les fibroblastes humains

L'acétyl-CoA carboxylase (ACC) est l'enzyme limitante de la voie de synthèse des acides gras *de novo*. Elle catalyse la réaction de carboxylation, ATP-dépendante, de l'acétyl-CoA en malonyl-CoA. Ce dernier constitue un substrat pour la Fatty acid synthase (FAS) au cours de l'élongation des acides gras et un inhibiteur de la carnitine palmitoyl-transférase 1 (CPT1) impliquée dans le transport des acides gras à travers la membrane mitochondriale pour la β -oxydation des AG (Tong, 2005). L'ACC existe sous plusieurs isoformes codées par un même gène résultat d'un épissage alternatif : l'ACC1 et l'ACC2. L'ACC1 est exprimée préférentiellement dans les tissus lipogéniques (foie, tissu adipeux) alors que l'ACC2 est exprimée essentiellement dans les tissus oxydatifs (muscle squelettique, foie et cœur). L'ACC1 est cytosolique alors que l'ACC2 possède une double localisation mitochondriale et cytosolique (Tong, 2005). Plusieurs facteurs régulent l'activité ACC tels que la phosphorylation de l'enzyme, les hormones, la concentration du citrate précurseur de l'acétyl-CoA cytosolique et l'acétyl-CoA (Beatty et Lane, 1983; Kim, 1979). Il a été décrit que l'ACC pourrait être phosphorylée par l'AMPK au niveau des serines 79, 1200 et 1215 inhibant ainsi son activité (Ha et al., 1994).

Le niveau d'expression de l'ACC dans les fibroblastes a été évalué par Western blot. Le résultat obtenu (Figure 57, A) montre une très faible intensité de bande pour l'ACC dans les fibroblastes contrôles, alors que dans les fibroblastes de patients P-NALD, les intensités des bandes de l'ACC sont plus élevées. L'analyse du rapport de densité phosphosérine 79-ACC (P-ACC)/ACC montre une induction de 4 fois dans les fibroblastes de patients (Figure 57, B). Cela montrerait qu'en absence de l'ACOX1 dans les fibroblastes humains, la phosphorylation

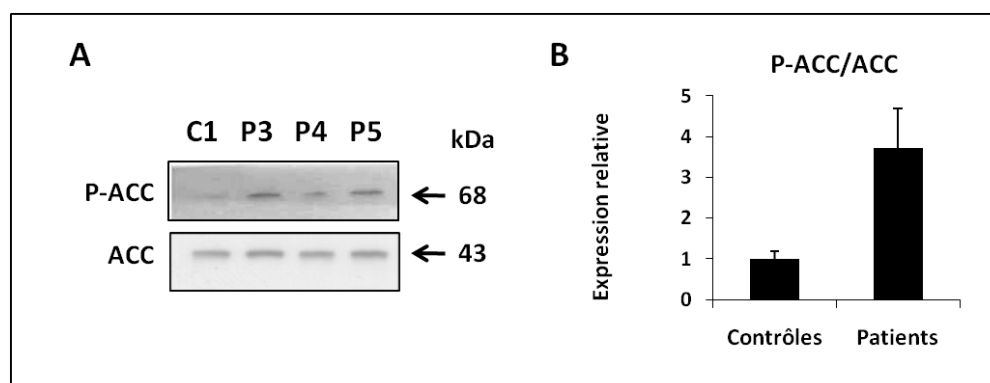


Figure 57. Niveau de phosphorylation de l'ACC dans les fibroblastes. Les extraits cellulaires obtenus des 4 lignées (contrôles C1 (n=1) et P-NALD P3, P4 et P5 (n=3)) ont été séparés par électrophorèse en gel de polyacrylamide en présence de SDS puis transférés sur une membrane de PVDF et immunodétectés avec les anticorps anti-P-ACC(A). Les membranes ont été ensuite découpées et exposées à l'anticorps anti-ACC. (B) Les rapports des densités des bandes pour de P-ACC/ACC a été déterminé avec le logiciel imageJ. Les résultats sont représentatifs d'une seule expérience. Les barres d'erreur sur les histogrammes représentent les écarts types.

de l'ACC serait induite indiquant l'inhibition de l'activité de cette enzyme. Cela suggère que la phosphorylation de l'ACC dépendante de l'AMPK est augmentée. Ce résultat est paradoxal du fait que la phosphorylation de l'AMPK est diminuée et donc son activité aussi. Cependant, il est à noter qu'une seule lignée contrôle a été utilisée, et qu'il serait nécessaire d'inclure d'autres lignées contrôles.

G. Conclusions

Les principaux résultats relatifs à l'étude de la morphologie, de la biogenèse et du métabolisme énergétique mitochondrial, ainsi que les voies de signalisations régulant la fonction mitochondriale, dans les fibroblastes humains et le tissu hépatique murin déficients en ACOX1, sont résumés dans le *Tableau 7*.

Tableau 7. Tableau récapitulatif des principaux résultats d'évaluation des fonctions mitochondriales dans les fibroblastes humains et dans le tissu hépatique murin en absence d'ACOX1.

Etudes réalisées	Fibroblastes ACOX1 ^{-/-}	Souris Acox1 ^{-/-} (foie)
Observations en microscopie à fluorescence	Mitochondries fragmentées, de forme et taille hétérogènes	-
Observations en microscopie électronique	Anomalies de la morphologie mitochondriale	-
Expression des gènes impliqués dans la biogenèse mitochondriale	Pas de variations	Diminution de MFN1 (ARNm)
Nombre de copies de l'ADNmt	Diminution	-
Expression protéique des complexes respiratoires	Diminution de l'expression des complexes I, II, III, IV et V	Diminution de l'expression du complexe IV
Activités des complexes respiratoires	Augmentation de l'activité du complexe V	Diminution de l'activité du complexe IV
Quantité d'ATP	ATP total normal ATP mitochondrial diminue	ATP total normal
Respiration mitochondriale	-	Diminution de la respiration basale
Expression en ARNm des facteurs de transcription NRF1, NRF2 et TFAM	Normale	Diminution de NRF2 et TFAM
Expression en ARNm des coactivateurs PGC-1 α et PRC	Diminution de PRC	Diminution de PRC
Activité de PGC-1 α	Inhibée par acétylation	-
Phosphorylation de l'AMPK	Diminution	-
Phosphorylation de l'Akt	Normale	-



Discussion

Le peroxysome a été considéré pendant longtemps comme un organite d'une importance secondaire. La découverte dans les années soixante-dix des premières pathologies liées à l'absence du peroxysome ou bien la déficience d'une ou de plusieurs de ses fonctions, pointait le rôle important de cet organite et de ses diverses fonctions dans le métabolisme cellulaire et le maintien de son homéostasie. Le peroxysome joue un rôle indispensable dans des voies métaboliques importantes telles que le métabolisme du glyoxylate, le mécanisme de détoxification des espèces réactives de l'oxygène, le métabolisme des acides aminés, l' α -oxydation de l'acide phytanique et la synthèse des éther-phospholipides. Cependant, une fonction majeure de cet organite est la β -oxydation des acides gras à très longue chaîne (AGTLC). Cette voie peroxysomale ne participe pas uniquement à la dégradation exclusive des AGTLC tels que le C26:0 et le C24:0 mais également à la synthèse des acides biliaires et des plasmalogènes et à la dégradation des eicosanoïdes et des acides dicarboxyliques.

Les maladies liées à une déficience peroxysomale sont classées en 2 groupes : le groupe 1 ou maladies associées à un défaut de la biogenèse des peroxysomes et le groupe 2 ou maladies causées par la déficience d'une seule enzyme peroxysomale.

L'acyl-CoA oxydase 1 ou ACOX1 est l'enzyme qui catalyse la première étape limitante de la β -oxydation peroxysomale. Le rôle important que joue cette enzyme au sein du peroxysome a été souligné par le diagnostic des deux premiers patients ayant une déficience en acyl-CoA oxydase 1 en 1988 (Poll-The et al., 1988). Cette déficience est connue sous le terme de pseudo-adrénoleucodystrophie néonatale (P-NALD) dont les symptômes ressemblent à ceux de l'adrénoleucodystrophie néonatale (NALD), une maladie peroxysomale liée à la déficience de la biogenèse peroxysomale. La P-NALD, appartenant au deuxième groupe des maladies peroxysomales, est une maladie autosomale récessive qui se manifeste à la naissance. Cette maladie s'accompagne d'une hypotonie généralisée, d'une surdité, d'un développement moteur très retardé, d'une hépatomégalie et les enfants atteints présentent une démyélinisation de la matière blanche cérébrale et meurent précocement (Fournier et al., 1994). La déficience en ACOX1 résulte en des taux élevés d'AGTLC plasmatiques. Le modèle murin de la P-NALD, la souris *Acox1*^{-/-} présente le même type de symptôme avec, à l'âge de deux à quatre mois, un taux élevé d'AGTLC plasmatiques, un retard de croissance et une hépatomégalie. Par contre, contrairement aux patients, le modèle murin ne présente pas de symptômes cérébraux.

A. Caractérisation de 3 lignées de fibroblastes de patients atteints de P-NALD

Les trois lignées de fibroblastes de patients P-NALD, P3, P4 et P5 ont été obtenues de l'institut Coriell (Etats-Unis). Les données disponibles pour ces trois lignées étaient restreintes à de simples descriptions du diagnostic sans aucune précision sur les paramètres biochimiques. Nous avons voulu étudier de plus près ces paramètres afin de valider ces lignées comme modèles d'études.

Nous avons, dans un premier temps, mesuré l'activité acyl-CoA oxydase 1 vis-à-vis du palmitoyl-CoA (C16:0) dans les trois lignées de patients (P3, P4 et P5) et dans la lignée de fibroblastes contrôles afin de valider l'absence d'activité enzymatique acyl-CoA oxydase chez les patients P-NALD. La mesure d'activité a révélé la présence d'activité résiduelle de l'enzyme pour le C16:0 dans la lignée P3 d'environ 20% et l'absence d'activité dans les lignées P4 et P5. La présence d'activité résiduelle dans la lignée P3 pourrait être expliquée par une mutation ponctuelle au niveau du gène aboutissant à la synthèse d'une enzyme mutée faiblement active. Cependant l'absence d'activité dans les deux lignées P4 et P5 laisse penser à une ou plusieurs mutations touchant le site actif ou le site catalytique de l'enzyme, abolissant ainsi son activité. L'hypothèse d'une large délétion au niveau du gène de l'ACOX1 dans les trois lignées aboutissant à l'absence de la protéine est écartée. En effet, l'immunomarquage réalisé sur les trois lignées avec les anticorps anti-ACOX1 a permis de mettre en évidence la présence de la protéine ACOX1 au sein des 3 lignées de patients. Ensuite, les lignées ont été caractérisées au niveau du nombre et de la taille apparente des peroxysomes. Ceci a été réalisé grâce au marquage de la catalase avec un anticorps anti-catalase en microscopie à fluorescence et avec la diaminobenzidine (DAB) en microscopie électronique. Les observations et les images obtenues ont montré une diminution du nombre de peroxysomes d'environ 50% et une augmentation de leurs tailles apparentes. Ainsi comme cela avait déjà été décrit chez les patients atteints de P-NALD au niveau du foie (Poll-The et al., 1988), l'absence de l'activité acyl-CoA oxydase 1 se traduit par une augmentation de la taille apparente des peroxysomes. Cela semble une des caractéristiques des maladies du deuxième groupe des désordres peroxysomaux. En effet, les immunomarquages de différentes protéines de la membrane et de la matrice peroxysomale réalisés sur des fibroblastes provenant de patients déficients en ACOX1 et en D-PBE ont montré une diminution du nombre et une augmentation de la taille des peroxysomes (Funato et al., 2006). De même, chez les souris knockout pour l'ACOX1, âgées de 1 à 4 mois, le marquage à la DAB de la catalase montre des hépatocytes pauvres en peroxysomes qui se trouvent en nombre réduit par

rapport aux souris contrôles (Fan et al., 1996a). Jusqu'à présent, l'origine de ces modifications reste inconnue. Cependant, il a été suggéré dans le cas de la déficience en ACOX1, que l'accumulation des AGTLC pourrait perturber les membranes peroxysomales et interférer avec le mécanisme d'import des protéines peroxysomales menant ainsi à des morphologies anormales ou bien à l'agrégation de plusieurs organites (Fan et al., 1996a; Funato et al., 2006).

La mesure de la β -oxydation peroxysomale du C26:0 dans les deux lignées de fibroblastes P-NALD, P3 et P5, a montré une activité de β -oxydation diminuée de 70% par rapport à la lignée contrôle C1. Ce taux résiduel de β -oxydation (30%) semble logique pour la lignée P3 qui présente une activité résiduelle acyl-CoA oxydase. Cependant, pour la lignée P5, l'absence d'activité acyl-CoA oxydase est aussi accompagnée d'un taux résiduel de 30 % de β -oxydation. En effet, la mesure des activités enzymatiques chez l'homme de l'ACOX1 (ou palmitoyl-CoA oxydase) et de l'acyl-CoA oxydase des acides gras branchés (ACOX2) au niveau du foie et des reins a montré que l'ACOX2 pourrait contribuer pour 25% à l'oxydation peroxysomale des acides gras à chaîne linéaire tels que le palmitoyl-CoA, l'hexadécanedioyl-CoA, les prostaglandines E2-CoA et pour 15% à l'oxydation du lignocéryl-CoA (Vanhove et al., 1993). L'activité résiduelle de 30% de la β -oxydation mesurée avec la lignée P3 peut alors correspondre à la contribution de l'ACOX2 dans la β -oxydation du C26:0.

L'analyse de l'expression en qPCR de l'ARNm de l'ACOX1 totale et de ses deux isoformes, ACOX1a et ACOX1b, montre de très fortes diminutions d'environ 90%, dans la lignée P3, d'environ 80% dans la lignée P4. La lignée P5 montre des expressions comparables à celles de la lignée contrôle C1 pour l'ACOX1 totale et de ses deux isoformes, ACOX1a et ACOX1b. Quand l'expression protéique de l'ACOX1 est évaluée en Western blot dans les homogénats des fibroblastes, la lignée contrôle C1 et la lignée de patient P5 montrent la présence de l'ACOX1 totale de 72 kDa ainsi que les formes clivées de 51 et 21 kDa. Cependant, dans les deux lignées P3 et P4, la protéine ACOX1 n'est pas détectable. Plusieurs mutations au niveau du gène codant l'ACOX1 aboutissent à des profils différents de la protéine en Western blot (Ferdinandusse et al., 2007). La mutation faux-sens p.R148X au niveau de l'exon 4 chez un patient est associée à une protéine tronquée non détectable. Le même résultat est obtenu chez un patient présentant une délétion (p.F124-p.N129) au niveau de l'exon 3 alors que la substitution p.S310P au niveau de l'exon 7 donne une protéine

inactive avec un profil similaire de la protéine en Western blot aux les lignées de fibroblastes contrôles (Ferdinandusse et al., 2007).

Tableau 8. Tableau récapitulatif des résultats de la caractérisation des lignées de fibroblastes de patients P-NALD P3, P4 et P5 par rapport à la lignée contrôle C1.

Lignées	P3	P4	P5
Nombre des peroxyosomes	↓	↓	↓
Taille des peroxyosomes	↑	↑	↑
Expression ARNm ACOX1	↓	↓	Normale
Expression ARNm ACOX1a	↓	↓	Normale
Expression ARNm ACOX1b	↓	↓	Normale
Expression de la protéine en Western blotting	Non détectable	Non détectable	Normale
Activité palmitoyl-CoA de l'acyl-CoA oxydase 1	Résiduelle	Non détectable	Non détectable
Niveau de β -oxydation	Résiduelle	Résiduelle	-

En résumé, les 3 lignées de patients P-NALD montrent une augmentation de la taille des peroxyosomes et la diminution de leur nombre (Tableau 8). Elles montrent aussi la présence de l'ACOX1 en immunomarquage. Les deux lignées P4 et P5 montrent une forte diminution des expressions en ARNm des ACOX1 totales, ACOX1a et ACOX1b et cela est accompagné d'une absence des bandes caractéristiques de l'ACOX1 en Western blot dans P4 alors que P5 montre un profil normal. De plus, la lignée P4 montre une activité résiduelle de β -oxydation peroxyosomale pour le C26:0. Ces résultats suggèrent dans la lignée P4 une délétion au niveau du gène de l'ACOX1 abolissant ainsi l'activité de l'enzyme ainsi que son expression en ARNm et en protéines. Dans la lignée P5, du fait d'un niveau d'expression normal de la protéine, l'absence d'activité de l'ACOX1 ne pourrait s'expliquer que par une mutation ponctuelle touchant le site catalytique de l'enzyme. Au niveau peroxyosomal, la lignée P3 présente des caractéristiques qui ressemblent à celles de la lignée P4. Cependant, malgré la mutation de l'ACOX1 dans cette lignée, une activité résiduelle de l'ACOX1 est détectée. Ceci suggérerait que la mutation au niveau du gène de l'ACOX1 pourrait perturber le site actif de l'enzyme ainsi que le clivage de l'enzyme après sa synthèse.

B. Déficience en ACOX1 et métabolisme du cholestérol dans les fibroblastes P-NALD

Le cholestérol joue un rôle clé dans la croissance et le développement des cellules eucaryotes. Le cholestérol est important pour la synthèse et la fluidité des membranes cellulaires. Il est également un précurseur essentiel pour la synthèse de biomolécules nécessaires pour le bon fonctionnement de la cellule tels que la vitamine D, les acides biliaires et les hormones stéroïdes. Le cholestérol peut provenir soit de l'alimentation soit de la synthèse *de novo* à partir de l'acétyl-CoA. L'homéostasie du cholestérol est maintenue grâce aux voies d'élimination. La voie majeure de l'élimination du cholestérol consiste en sa conversion en acides biliaires qui permettent la solubilisation et l'absorption des lipides d'origine alimentaire et des vitamines au niveau de l'intestin (Monte et al., 2009).

Les effets du dysfonctionnement peroxysomal sur la synthèse du cholestérol ont été étudiés essentiellement dans le cas du syndrome de Zellweger (ZS). Cependant, de telles études ont fourni des résultats contradictoires (Kovacs et al., 2002). Bien que le taux du cholestérol plasmatique soit diminué chez des patients atteints de ZS (Kovacs et al., 2002), une étude a rapporté des activités enzymatiques normales des enzymes MVK, MPD et IPP dans les fibroblastes de patients ZS (Wanders et Romeijn, 1996). D'autres études ont décrit une diminution de l'activité de la MVK dans les fibroblastes de patients ZS et NALD (Biardi et al., 1994). La synthèse du cholestérol a été également un sujet d'une controverse. Alors que certaines équipes ont montré une diminution de la synthèse du cholestérol dans les fibroblastes de patients ZS (Hodge et al., 1991; Mandel et al., 1995), d'autres ont noté un taux normal ou faiblement élevé (Malle et al., 1995; van Heusden et al., 1992).

La voie de synthèse du cholestérol a été également étudiée dans les modèles murins du ZS, notamment les souris déficientes soit pour la protéine PEX5, soit pour PEX2. Les souris *Pex5*^{-/-} nouveau-nées ont un taux normal de cholestérol dans le plasma, le foie et le cerveau (Vanhorebeek et al., 2001). Les activités des enzymes participant à la synthèse du cholestérol chez ces souris sont soit normales, soit légèrement augmentées (Hogenboom et al., 2002), alors que dans le second modèle murin déficient en PEX2, les taux de cholestérol plasmatique et hépatique sont diminués de 40%, tandis que ce taux est normal dans le cerveau et les autres tissus (Kovacs et al., 2004).

Dans les fibroblastes de patients P-NALD, nous avons montré une induction, au niveau transcriptionnel, de la voie de synthèse du cholestérol par rapport aux fibroblastes contrôles. Cette induction est caractérisée, par des études de transcriptomique (puces à ADN) et PCR

quantitative, par une augmentation de l'expression du gène de la HMGCR, enzyme limitante de la voie de synthèse du cholestérol. Ceci est également suivi par l'augmentation de l'expression des composantes de la voie du mévalonate. Seule la farnésyl diphosphate synthase semblait induite au niveau des puces à ADN mais cela n'a pas été confirmée par qPCR. Ces résultats montrent, du moins au niveau transcriptionnel, que dans le cas de la déficience en ACOX1, les gènes de la voie de synthèse du cholestérol sont induits. De plus, l'expression en ARNm de SREBP-2, un facteur de transcription impliqué principalement dans la régulation de la voie de synthèse du cholestérol, est augmentée dans les fibroblastes P-NALD. L'origine de l'induction de cette voie au niveau des fibroblastes P-NALD signifie soit une baisse du taux de cholestérol dans la cellule, soit une dérégulation de cette voie dans ce contexte pathologique. Cela nécessitera une mesure du taux de cholestérol dans ces cellules.

La déficience en ACOX1 dans les fibroblastes de patients P-NALD bloque la β -oxydation peroxysomale. Or, chez les souris déficientes en MFP2 (ou D-PBE), qui catalyse la deuxième et la troisième réaction de la β -oxydation peroxysomale, Martens *et coll.* ont montré une dérégulation dans le sens d'une induction de 14 gènes codant des enzymes de la voie de synthèse du cholestérol sans que cette dérégulation affecte le taux de cholestérol plasmatique (Martens et al., 2008). De la même manière, le taux de cholestérol plasmatique chez les souris *Acox1*^{-/-} est normal mais ce taux augmente lorsque les 2 isoformes de l'ACOX1, ACOX1a et ACOX1b sont exprimées chez les souris déficientes (Vluggens et al., 2010). Cela suggère que la déficience de la β -oxydation peroxysomale est à l'origine de la perturbation de cette voie au niveau transcriptionnel. Cette hypothèse est renforcée par les études menées sur les souris déficientes en Pex5 et en Pex2. Chez ces souris, le contenu en cholestérol dans le cerveau est normal, suggérant que la synthèse du cholestérol n'est pas affectée par l'absence d'import de protéines peroxysomales (Vanhorebeek et al., 2001). De plus, il a été suggéré que la perturbation de l'homéostasie du cholestérol dans les foies des souris *Pex2*^{-/-} pourrait être la conséquence des perturbations métaboliques notamment caractérisées par une stéatose hépatique et une cholestase (Kovacs et al., 2004).

SREBP2 appartient à la famille des facteurs de transcription SREBPs (ou Sterol Regulatory Element Binding Proteins) et joue un rôle central dans la régulation de la synthèse du cholestérol. Chez l'homme, SREBP-1a et SREBP-1c régulent préférentiellement les gènes impliqués dans la synthèse des acides gras et des triglycérides alors que SREBP-2 active les gènes nécessaires pour la synthèse du cholestérol. Le gène codant SREBP2 est un des gènes

cibles de PPAR α . Ceci a été décrit au niveau des cellules HepG2 traitées par l'agoniste GW7647 de PPAR α provoquant l'induction de SREBP2 et de ses gènes cibles (van der Meer et al., 2010). D'une manière très intéressante, l'activation de PPAR α dans ces cellules stimule son interaction physique et sa liaison aux promoteurs des gènes codant les enzymes impliquées dans la voie de synthèse du cholestérol telles que HMGCS1, HMGCR, FDFT1 et SC4MOL (van der Meer et al., 2010). Le lien entre la déficience de la β -oxydation peroxysomale et l'activation de PPAR α chez la souris a été rapporté dans le cas de la déficience en ACOX1 (Fan et al., 1996a; Vluggens et al., 2010), en MFP2 (Jia et al., 2003) et en SCPx (Seedorf et al., 1998). Dans ce sens, il a été suggéré que l'activation de PPAR α , suite à la déficience en MFP2 chez la souris et l'accumulation des ligands endogènes, induise et active SREBP2 qui, à son tour, active ses gènes cibles, notamment les gènes de la synthèse du cholestérol. L'implication de PPAR α dans l'induction de ces gènes a été vérifiée chez les souris double KO *D-Pbe/Ppara*. Ces souris ne montrent aucune induction de ces gènes comparées aux souris KO *Ppara* (Martens et al., 2008). Il est à noter que les cultures primaires d'hépatocytes de souris *Mfp2*^{-/-} traitées avec l'agoniste WY14.643 de PPAR α ne montrent aucune augmentation de l'expression du gène SREBP2 contrairement au gène codant HMGCR qui montre une légère augmentation. Cette contradiction par rapport à ce qui a été cité précédemment avec l'agoniste GW7647, pourrait être expliquée par les modes d'actions différents des agonistes de PPAR α , surtout que PPAR α pourrait activer les gènes de la synthèse du cholestérol indépendamment de l'activation de SREBP2 (van der Meer et al., 2010). Dans les fibroblastes de patients P-NALD, l'analyse transcriptomique montre une légère induction de l'expression de PPAR α (1,54 fois). A titre indicatif, les expressions de différents gènes cibles de PPAR α dans ces fibroblastes, obtenues par puce à ADN, sont présentées dans le Tableau 9. Ces résultats, non confirmés par PCR quantitative, suggèreraient une induction de PPAR α suite à l'accumulation de ses ligands endogènes provoquée par la déficience en ACOX1. L'activation de PPAR α induirait le gène SREBP2 qui, à son tour, induirait les gènes de la synthèse du cholestérol. Cette hypothèse, qui nécessite des investigations beaucoup plus avancées pour confirmer les activations du facteur de transcription PPAR α , de SREBP2 et des enzymes de la voie de cholestérol, n'est pourtant pas la seule hypothèse plausible. En effet, le DHA, l'EPA et l'acide arachidonique n-6 ont été décrits pour inhiber le processus de maturation de SREBP (Worgall et al., 1998). Or, chez les patients atteints de P-NALD (Ferdinandusse et al., 2010), tout comme chez les souris *Acox1*^{-/-} (Vluggens et al., 2010), les taux de DHA et d'acide arachidonique (AA) diminuent au niveau hépatique. De plus, chez la souris *Acox1*^{-/-}, les taux de DHA et d'AA sont restaurés par

l'expression soit de l'isoforme ACOX1b soit des deux isoformes 1a et 1b (Vluggens et al., 2010). La diminution du taux de DHA lèverait-elle l'inhibition de SREBP2 et provoquerait-elle par la suite l'induction de ses gènes cibles ?

Tableau 9. Tableau montrant les facteurs d'induction des gènes cibles de PPAR α .

Les résultats ont été obtenus par analyse transcriptomique en puce à ADN.

Gène	Numéro d'accession	Description	Facteur d'induction
ACADVL	NM_000018	acyl-Coenzyme A dehydrogenase, very long chain	1,14
CRAT	BC000723	carnitine acetyltransferase	1,55
SLC25A20	BC001689	carnitine/acylcarnitine translocase, member 20	1,57
ACAA1	NM_001607	acetyl-Coenzyme A acyltransferase 1	1,58
ACOT4	AA046424	acyl-CoA thioesterase 4	1,41
ACOT8	NM_005469	acyl-CoA thioesterase 8	1,57
CROT	NM_021151	carnitine O-octanoyltransferase	1,12
EHHADH	NM_001966	enoyl-Coenzyme A, hydratase/3-hydroxyacyl Coenzyme A dehydrogenase	2,29
DECR2	AL523860	2,4-dienoyl CoA reductase 2, peroxisomal	1,72
PPARA	N48315	peroxisome proliferative activated receptor, alpha	1,54
UCP2	U94592	uncoupling protein 2	2,89

L'expression de l'ACAT2, une enzyme responsable de la synthèse d'esters de cholestérol, est augmentée dans les fibroblastes P-NALD. Cela est aussi confirmé par l'induction au niveau transcriptomique de SOAT1 et STARD4. L'estérification du cholestérol a déjà été décrite dans un contexte d'accumulation d'AGTLC. En effet, il a été montré au niveau des régions présentant des démyélinisations au niveau du cerveau chez les patients X-ALD, l'existence d'esters de cholestérol contenant des AGTLC (Dubois-Dalcq et al., 1999; Reinecke et al., 1985). Cette accumulation des AGTLC sous forme d'esters de cholestérol a été aussi décrite dans le cortex surrénal et les testicules (Powers et Schaumburg, 1973; Powers et Schaumburg, 1981; Powers et al., 1980). La formation de ces esters de cholestérol piégeant les AGTLC conduit à une augmentation de leur concentration dans les neuroblastomes Neuro2a de souris (Jia et al., 2004). Cette estérification est catalysée par l'ACAT1 chez la souris après activation sous forme d'acyl-CoA. Cela laisserait supposer qu'en cas de déficience en ACOX1, l'accumulation des AGTLC toxiques pour la cellule provoquerait l'activation de PPAR α qui induirait SREBP2 et les gènes de voie de synthèse du cholestérol.

Le cholestérol synthétisé serait utilisé pour séquestrer les AGTLC afin de minimiser leurs effets sur la cellule.

Le gène de la CYP7B1 catalyse la première réaction de dégradation du cholestérol en acides biliaires et son expression est augmentée dans les fibroblastes P-NALD. Ce résultat semble contradictoire à l'augmentation de la synthèse du cholestérol. De la même manière, les augmentations d'expression des ARNm de INSIG1 et INSIG2 sont contradictoires avec l'induction de SREBP2 puisque ces protéines retiennent SREBP2 ancré à la membrane du RE empêchant sa translocation vers l'appareil de Golgi pour sa maturation. Ceci pourrait suggérer un rétrocontrôle négatif par l'induction de ces gènes dans le but de maintenir le taux de cholestérol à un certain niveau surtout dans le cas où la cellule n'a pas besoin d'une synthèse élevée de cholestérol.

En conclusion, la déficience en ACOX1 et par voie de conséquence, le blocage de la β -oxydation peroxysomale perturbe la voie de synthèse et de dégradation du cholestérol au niveau transcriptionnel. L'accumulation des dérivés d'AG en absence d'activité ACOX1 chez les patients P-NALD, pourrait activer PPAR α . Ce dernier induirait SREBP2 qui, avec PPAR α , induiraient la transcription de gènes cibles de la voie de synthèse du cholestérol. Ceci montre un lien entre une activité enzymatique peroxysomale et la biosynthèse de cholestérol.

C. Déficience en ACOX1 et altérations de la mitochondrie dans les fibroblastes P-NALD

Dans la cellule, plusieurs organites participent à la β -oxydation des acides gras contribuant soit à leur dégradation soit à la synthèse d'autres composés dérivés. La majorité des AG sont β -oxydés dans la mitochondrie qui prend en charge les AG de courte, moyenne et longue chaîne. Cependant, les AGTLC sont dégradés exclusivement dans le peroxysome (Hashimoto, 1999; Mannaerts et Debeer, 1982). Le réticulum endoplasmique (RE) participe également à la dégradation des AGLC et des AGTLC à travers les ω -hydroxylases CYP4A1 et CYP4A3 pour former les acides dicarboxyliques (DCA) qui seront dégradés par le système peroxysomal de β -oxydation (Kimura et al., 1989; Muerhoff et al., 1992).

Bien que la mitochondrie et le peroxysome soient capables de dégrader les AG, seule la β -oxydation mitochondriale aboutit à la synthèse d'ATP grâce au processus de la phosphorylation oxydative (Mannaerts et van Veldhoven, 1996). Dans le peroxysome, deux systèmes de β -oxydation ont été décrits (Hashimoto, 1999; Mannaerts et van Veldhoven, 1996). Le premier système regroupe l'acyl-CoA oxydase 1 (ACOX1), la L-PBE et la 3-cétoacyl-CoA thiolase (pTH1). Ces enzymes prennent en charge la β -oxydation des AGTLC à

chaîne linéaire et sont inductibles par les proliférateurs de peroxyosome (PPs) (Hashimoto, 1999; Reddy et Hashimoto, 2001a; Wanders et al., 2001b). Le deuxième système regroupe l'acyl-CoA oxydase des AG ramifiés (ACOX2), la D-PBE et la pTH2 (ou SCPx) prenant en charge les AGTLC à chaîne ramifiée (acide pristanique et les intermédiaires des acides biliaires) et ces enzymes ne sont pas inductibles par les PPs (Hashimoto, 1999; Seedorf et al., 1998).

La P-NALD est une maladie neurodégénérative provoquée par la déficience en activité ACOX1 et accompagnée par une démyélinisation de la matière blanche cérébrale, une accumulation des AGTLC tels que l'acide cérotique (C26:0) et l'acide tétracosanoïque (C24:0) dans le plasma et les tissus, un rapport C26:0/C22:0 élevé et une hépatomégalie avec des peroxyosomes élargis en taille et réduits en nombre (Fournier et al., 1994; Poll-The et al., 1988).

Dans le travail présenté dans ce manuscrit, nous avons démontré pour la première fois des altérations de la morphologie et de la fonction mitochondriale dans les fibroblastes déficients en ACOX1 issues de patients atteints de P-NALD.

De nombreuses études ont montrées les liens étroits qui existent entre peroxyosome et mitochondrie. Ces deux organites présentent des similarités telles que leurs rôles dans la β -oxydation de la majorité des acides gras (Poirier et al., 2006; Wanders, 2004b) et la dégradation des espèces réactives de l'oxygène (ERO) (Jezek et Hlavata, 2005; Schrader et Fahimi, 2006). Au-delà des similarités au niveau de leurs fonctions, le peroxyosome et la mitochondrie partagent même certains processus tels que le processus de fusion/fission (Camoës et al., 2009; Schrader, 2006) et communiquent par l'intermédiaire de vésicules de transport/échange dont le contenu et le rôle restent jusqu'à présent inconnu (Neuspiel et al., 2008).

Plusieurs maladies à l'origine de la déficience en peroxyosome, ou en une enzyme peroxyosomale, ainsi que des modèles murins de maladies peroxyosomales, s'accompagnent d'altérations structurales et fonctionnelles des mitochondries (Baumgart et al., 2001; Dirx et al., 2005; Goldfischer et al., 1973; Jia et al., 2003; McGuinness et al., 2003).

C.1. Morphologie et biogenèse des mitochondries chez les patients P-NALD

Les fibroblastes issus des patients P-NALD renferment des mitochondries morphologiquement anormales en microscopie à fluorescence et en microscopie électronique.

Ces mitochondries présentent des formes et des tailles hétérogènes et apparaissent gonflées. Les crêtes mitochondriales sont rares, remplacées par des structures empilées ou bien présentant des aspects curvilignes et vésiculaires. De plus, la membrane externe mitochondriale dans les fibroblastes de patients, présente des évaginations et des invaginations anormales. Cependant, certaines mitochondries apparaissent normales, similaires à celles observées dans les fibroblastes contrôles. Plusieurs anomalies de la morphologie mitochondriale ont été déjà décrites dans des maladies peroxysomales. En effet, au niveau hépatique, les patients atteints du syndrome de Zellweger présentent des mitochondries anormales ressemblant à celles observées chez les patients P-NALD (Goldfischer et al., 1973). Ces perturbations au niveau mitochondrial ont été essentiellement décrites en absence de peroxysomes. Ceci est également confirmé dans les modèles murins de déficience peroxysomale, notamment dans les souris *Pex5*^{-/-} (souris model du ZS) (Baumgart et al., 2001; Dirkx et al., 2005). Cependant, des altérations mitochondriales ont été également observées dans les souris double KO *L-Pbe*^{-/-}, *D-Pbe*^{-/-} (Jia et al., 2003) et les souris ALD (McGuinness et al., 2003) où la β -oxydation peroxysomale est soit fortement réduite, soit absente. Nos résultats, en absence d'activité ACOX1 et donc de la β -oxydation peroxysomale, confortent l'idée de l'effet de l'absence de la β -oxydation peroxysomale sur la biogenèse de la mitochondrie plutôt qu'un effet lié à un défaut de la biogenèse du peroxysome.

A la suite des observations des mitochondries dans les fibroblastes P-NALD, nous nous sommes demandés si les anomalies de la morphologie mitochondriale pourraient être le résultat de la perturbation du processus de la biogenèse de la mitochondrie. Pour répondre à cette question, les expressions en ARNm des gènes MFN1, MFN2, OPA1 (fusion) et de DNML1 (fission) ont été évaluées par PCR quantitative. Bien que les résultats obtenus ne montrent pas des différences statistiquement significatives entre les fibroblastes contrôles et les fibroblastes P-NALD, les expressions des gènes montrent une tendance à la surexpression de ces ARNm. Ceci pourrait indiquer une perturbation de l'équilibre entre fission et fusion de la mitochondrie, résultant en une morphologie anormale des mitochondries. Un déséquilibre du processus de biogenèse de la mitochondrie a été illustré par des modèles cellulaires déficients pour les protéines de fusion, montrant un effet sur la morphologie mitochondriale notamment des mitochondries fragmentées (Chen et al., 2005). Or, dans les fibroblastes P-NALD, les marquages du cytochrome c et avec le MitoTracker Red CMXRos des mitochondries en microscopie à fluorescence montrent des mitochondries fragmentées. L'altération de la morphologie mitochondriale est accompagnée par une diminution du

nombre de copies d'ADNmt indiquant un effet de l'absence d'activité ACOX1 sur la morphologie et le nombre de mitochondries.

C.2 Métabolisme énergétique mitochondrial chez les patients P-NALD

La perturbation de la morphologie et de la biogenèse mitochondriale est souvent associée à des altérations de la fonction énergétique de la mitochondrie notamment au niveau des activités enzymatiques de la chaîne respiratoire, de la respiration cellulaire et du potentiel membranaire (Chen et al., 2005).

Parmi les activités enzymatiques de la chaîne respiratoire, seule l'activité du complexe V est augmentée d'environ 40% dans les fibroblastes P-NALD. En effet, l'analyse des activités des complexes rapportées aux activités soit du complexe II, soit du complexe IV, confirment l'augmentation de l'activité du complexe V sans montrer de variations pour les activités des complexes I, II, III et IV. L'activité spécifique de chaque complexe ne montre aucune variation entre les fibroblastes P-NALD et les fibroblastes contrôles. Mais il apparaît que les résultats des activités mesurées des complexes exprimés sous forme d'activités spécifiques ne seraient pas assez informatifs sur le fonctionnement réel de la chaîne respiratoire d'où la présentation de nos résultats sous forme d'activités rapportées aux activités soit du complexe II, soit du complexe IV. L'augmentation de l'activité du complexe V est accompagnée d'une diminution du taux d'ATP mitochondrial dans les fibroblastes de patients P-NALD alors que le taux d'ATP total reste invariable. Ces résultats indiquent l'incapacité des fibroblastes en absence de l'ACOX1 à maintenir une production d'ATP mitochondrial normale et que l'augmentation de l'activité du complexe V pourrait être une compensation pour combler le manque en ATP mitochondrial. Il faut aussi noter que dans les fibroblastes de patients P-NALD, l'expression en ARNm de l'UCP2 augmente suggérant ainsi un découplage au niveau de la membrane interne mitochondriale. Cependant, malgré la baisse du taux d'ATP produit par la mitochondrie, le taux d'ATP total reste équivalent à celui des fibroblastes contrôles. Nous avons montré que le manque en ATP mitochondrial produit par la phosphorylation oxydative est compensé par la voie de glycolyse. Ceci est en accord avec nos résultats chez les souris déficientes en ACOX1 et avec celui de Baumgart *et coll.*, chez les souris déficientes en PEX5 (Baumgart et al., 2001). Ce travail doit encore être complété par une étude des ARNm et des activités enzymatiques de la voie de glycolyse.

L'analyse de l'abondance des transcrits des sous-unités des complexes de la chaîne respiratoire dans les fibroblastes P-NALD ne montre aucune différence significative par

rapport aux cellules contrôles suggérant qu'au niveau transcriptionnel, la déficience en ACOX1 n'affecte pas ces expressions. En effet plusieurs facteurs de transcription ont été décrits pour réguler l'expression des gènes codant les complexes respiratoires, tels que NRF1, NRF2, TFAM (Scarpulla, 2008a; Scarpulla, 2011). PGC1- α est connu pour coactiver la transcription de NRF1 et NRF2 pour activer la biogenèse et le métabolisme mitochondrial (Wu et al., 1999b). Cette activation passe par le facteur TFAM qui régule la transcription du génome mitochondrial (Parisi et Clayton, 1991). Dans les fibroblastes P-NALD, l'expression en ARNm de ces facteurs ne varie pas ce qui peut expliquer un profil d'expression normal des sous-unités des complexes. Ce profil est de plus confirmé par les expressions protéiques de NRF1 et NRF2. Bien que NRF1 montre une diminution du taux de protéine dans les fibroblastes P-NALD, cette diminution n'est statistiquement pas significative de même pour NRF2 dont l'expression protéique est comparable à celle du contrôle. Dans le même contexte, la localisation cellulaire de NRF1, NRF2 et SIRT1 est similaire à celle des cellules contrôles indiquant une fois de plus que l'expression et la localisation de ces facteurs ne sont pas influencées par l'absence de l'ACOX1. Il est à noter que la localisation mitochondriale de NRF1 et SIRT1 dans les fibroblastes, indépendamment de la présence ou de l'absence de l'activité ACOX1, est intrigante. Ce résultat rappelle en plus de leur localisation nucléaire, la localisation mitochondriale décrite pour PGC-1 α et SIRT1 qui suppose que ces deux facteurs sont associés à l'ADNmt pour faciliter la liaison de TFAM à l'ADNmt et la modulation de la transcription du génome mitochondrial (Aquilano et al., 2010). Ceci mérite des investigations plus approfondies pour établir la fonction exacte de ces facteurs au niveau des mitochondries.

Dans les fibroblastes de patients P-NALD on montre une diminution des expressions protéiques de la sous-unité NDUF8 (complexe I), de la sous-unité FeS 30 kDa (complexe II), de la sous-unité core II (complexe III), de la sous-unité α (complexe V) et de la sous-unité (complexe IV). Ces diminutions pourraient être liées à la diminution du nombre de mitochondrie caractérisée par la diminution d'environ 40% du nombre de copies de l'ADNmt. Plusieurs études ont démontré une répression de PGC-1 α associée à une diminution du nombre de mitochondrie en cas d'accumulation d'acides gras chez des sujets obèses dans le tissu adipeux (Semple et al., 2004). De plus, une diminution de l'activation de la voie AMPK/PGC-1 α a été décrite dans le tissu musculaire de sujets obèses aboutissant à une diminution du nombre des mitochondries et de leurs capacités de production d'énergie (Kadowaki et Yamauchi, 2005). Ces effets sur le nombre et sur le fonctionnement de la mitochondrie sont provoqués par un déséquilibre d'expression des adipokines qui favorisent

la sensibilité à l'insuline (Kadowaki et Yamauchi, 2005). Les effets d'accumulation d'acides gras ne se limitent pas au tissu adipeux mais sont également observés dans les cellules musculaires traitées par le palmitate. Certains auteurs affirment que l'accumulation d'AG corrélée à la réduction de l'abondance des mitochondries serait à l'origine de l'insulino-résistance (Choo et al., 2006). L'induction d'un dysfonctionnement mitochondrial dans des cellules musculaires provoque des perturbations de la signalisation de l'insuline ainsi qu'une utilisation du glucose (Lim et al., 2006). De même, la déplétion en ADNmt provoque une insulino-résistance dans les myocytes de rat (Park et Lee, 2007). Bien que chez les souris *Pex5^{-/-}*, l'AMPK soit phosphorylée, l'homéostasie du glucose en absence de peroxyosome est perturbée. Chez ces souris, la voie de la glycolyse est induite pour restaurer le déficit cellulaire en ATP mitochondrial (Peeters et al., 2011). Il serait nécessaire d'évaluer l'état du glucose dans les fibroblastes P-NALD pour essayer de trouver le déficit dans le métabolisme glycolytique et les perturbations des mitochondries.

Dans les fibroblastes P-NALD, la phosphorylation de l'AMPK est diminuée d'environ 60%. Cette protéine est un senseur du rapport AMP/ATP. Nous avons constaté qu'en absence d'ACO1, le taux cellulaire d'ATP total ne varie pas. Pour estimer la production mitochondriale en ATP, nous avons mesuré le taux d'ATP en inhibant la glycolyse par l'iodoacétate. On constate une diminution de 50% du taux d'ATP mitochondrial dans les fibroblastes P-NALD. Si on suppose que le besoin en ATP cellulaire dû au manque d'ATP mitochondrial est compensé par la glycolyse, la diminution de la phosphorylation de l'AMPK est contradictoire avec ce qui a été décrit dans le cas d'absence de peroxyosome chez les souris *Pex5^{-/-}* (Peeters et al., 2011). En effet, l'activation de l'AMPK est associée à une diminution de la synthèse de glycogène par l'enzyme glycogène synthase suite à son inhibition par phosphorylation (Carling et Hardie, 1989). La diminution de la synthèse de glycogène suite à l'activation de l'AMPK est couplée à une augmentation du flux glycolytique par phosphorylation directe de la 6-phosphofructo-2-kinase (PFK-2) qui catalyse la synthèse du fructose 2-6-diphosphate, un stimulateur de la glycolyse (Marsin et al., 2000). Ceci montre que l'AMPK mobilise le glucose pour la formation d'ATP. La contradiction entre la diminution de la phosphorylation de l'AMPK dans les fibroblastes P-NALD est d'autant plus marquée qu'on observe en parallèle, une augmentation de la phosphorylation de l'ACC. Un besoin accru en ATP au niveau cellulaire favorise l'activation de l'AMPK qui phosphoryle directement l'ACC-1 et l'ACC-2 sur les serines 79 et 212 (Hardie et Pan, 2002). L'ACC catalyse la formation du malonyl-CoA à partir de l'acétyl-CoA pour la synthèse d'AG. De

plus, le malonyl-CoA est un inhibiteur de la CPT-1b responsable du transport des AG dans la mitochondrie pour la β -oxydation (Mills et al., 1983). La phosphorylation de l'ACC par l'AMPK inhibe son activité et lève l'inhibition de la CPT-1b favorisant ainsi un flux d'AG vers la mitochondrie pour la β -oxydation. L'induction de la β -oxydation mitochondriale, associée à l'augmentation du taux de glycolyse, stimule la production d'ATP pour répondre aux besoins cellulaires en énergie.

Le niveau de phosphorylation de la protéine Akt de signalisation est similaire dans les fibroblastes P-NALD et les contrôles. Cette protéine est phosphorylée en réponse à l'insuline et agit en phosphorylant FOXO1 qui se détache du promoteur du gène de PGC-1 α diminuant ainsi sa transcription. Bien que le niveau de phosphorylation totale de la protéine Akt ne varie pas entre patients et contrôles, son expression varie entre les patients et les contrôles eux-mêmes montrant ainsi que le niveau de phosphorylation de cette protéine varie indépendamment de la présence ou l'absence de l'activité ACOX1.

Un résultat étonnant dans les fibroblastes P-NALD est l'inhibition de l'activité de PGC-1 α , un régulateur essentiel du métabolisme énergétique. Bien que l'abondance de transcrits de PGC-1 α ne varie pas entre fibroblastes P-NALD et contrôles, ce facteur est fortement acétylé en l'absence d'activité ACOX1, indiquant un état inactif. L'activité de PGC-1 α est déterminée par les modifications post-transcriptionnelles telles que l'acétylation, la phosphorylation, la méthylation et l'ubiquitinylation (Fernandez-Marcos et Auwerx, 2011). L'acétylation de PGC-1 α et par la suite son inactivation est régulée par GCN5 (Jeninga et al., 2010). Il a été proposé que dans les hépatocytes des souris *Pex5*^{-/-}, la suppression de l'activité PGC-1 α contribue à la perturbation de la voie de la néoglucogenèse (Peeters et al., 2011). Dans les fibroblastes P-NALD, la suppression de l'activité de PGC-1 α par acétylation provoquerait également l'inhibition de la voie de la néoglucogenèse qui serait accompagnée de l'induction de la voie de glycolyse. Ceci permettrait ainsi de rétablir le niveau d'ATP cellulaire. Pour le moment, cette hypothèse nécessite l'évaluation de l'état de ces deux voies dans les fibroblastes.

Les résultats obtenus dans les fibroblastes P-NALD montrent que la déficience en ACOX1 perturbe l'activation de l'axe AMPK/PGC-1 α . Cette perturbation est corrélée par une diminution de la quantité de l'ADNmt et à une réduction du nombre de mitochondrie et pourrait être associée à une perturbation du métabolisme du glucose. Bien que pour le moment, l'origine de la diminution de l'AMPK, et de la diminution d'expression de PGC-1 α

reste inconnue, il n'est pas à exclure que l'accumulation des dérivés acyl-CoA de très longue chaîne en absence d'ACOX1, serait à l'origine de la perturbation de l'homéostasie des lipides au niveau cellulaire et affecterait les voies de signalisations cellulaires associées.

En conclusion, la déficience en ACOX1 dans les fibroblastes de patients P-NALD perturbe la biogenèse et la morphologie de la mitochondrie. Ces mitochondries anormales n'arriveraient pas à produire suffisamment d'ATP pour répondre aux besoins de la cellule, notamment peut être du fait d'un découplage de l'activité du complexe V de la chaîne respiratoire mitochondriale, ajouter à cela, que la diminution constatée de l'activité de PGC-1 α serait à l'origine de la perturbation de la fonction énergétique mitochondriale. Il est à noter que les fibroblastes, le seul modèle cellulaire humain disponible issu de patients P-NALD est utile pour étudier l'effet de l'absence en activité ACOX1, cependant, les fibroblastes sont issus d'un tissu dont la principale fonction est le soutien et la sécrétion de la matrice extracellulaire et dont le niveau du métabolisme général est incomparable à celui du métabolisme hépatique. Il n'est pas à exclure qu'au niveau de ce tissu, les perturbations métaboliques dues à la déficience en ACOX1 et par la suite, le blocage de la β -oxydation peroxysomale et l'accumulation des AGTLC, ne sont pas de la même amplitude que dans les tissus à forte activité métabolique tel que le foie. Il serait utile, en plus des fibroblastes, d'évaluer le degré du déséquilibre mitochondrial, morphologique et fonctionnel sur des biopsies de foies de patients P-NALD.

D. Effets de la déficience en ACOX1 sur la fonction mitochondriale au niveau hépatique chez les souris

La morphologie et les fonctions mitochondriales ont été étudiées au niveau hépatique chez les souris déficientes pour l'ACOX1 (*Acox1*^{-/-}) et dans les souris transgéniques pour l'ACOX1 humaine (hACOX1) comparées aux souris sauvages (WT). L'étude des expressions en ARNm des gènes de la fusion mitochondriale (MFN1, MFN2 et OPA1) montrent des diminutions de leurs expressions. En effet, bien que les expressions de MFN2 et OPA1 diminuent, ils n'atteignent pas le seuil de significativité contrairement à MFN1 indiquant ainsi une dérégulation du processus de fusion mitochondriale.

Pour comprendre la nature des altérations au niveau mitochondrial, nous avons tout d'abord mesuré les expressions de gènes codant des sous-unités des complexes respiratoires. Nos résultats montrent une diminution de ces ARNm dans les foies de souris KO *Acox1*, alors

que chez les souris hACOX1, le niveau d'expression est rétabli au même niveau que chez les souris sauvages.

Au niveau post-traductionnel, chez les souris *Acox1*^{-/-}, on constate uniquement une diminution de l'expression protéique du complexe IV (sous-unité I). Cette diminution est accompagnée également par 50% de perte d'activité du complexe IV (rapportée à l'activité du complexe II et à l'activité citrate synthase) mais aussi de l'activité du complexe III. Il est à noter que seule l'activité du complexe IV est restaurée dans les souris hACOX1 alors que l'activité du complexe III est diminuée dans ces souris de la même façon que chez les souris *Acox1*^{-/-}. De plus, l'activité du complexe II est augmentée (rapportée au complexe IV) en cas de déficience en ACOX1 et restaurée par l'ACOX1 humaine. Ces résultats montrent, en cas de déficience en ACOX1, une perturbation du fonctionnement de la chaîne respiratoire depuis le complexe II jusqu'au complexe IV. Ceci est confirmé par la mesure de la respiration cellulaire montrant une perturbation de la consommation d'oxygène. Effectivement, en cas de déficience en ACOX1, le flux de protons est potentiellement en déséquilibre soit au niveau du complexe III soit au niveau du complexe IV sans que ce gradient ne soit perturbé au niveau du complexe V pour la production d'ATP. La capacité de la phosphorylation oxydative à produire de l'ATP reste pour l'instant inconnue. Alors que le taux d'ATP total chez les souris *Acox1*^{-/-} n'est pas modifié, ce taux augmente de deux fois chez les souris hACOX1 par rapport aux souris WT et *Acox1*^{-/-}. Parallèlement au dosage de l'ATP, l'expression en ARNm de l'UCP2, une protéine de découplage exprimée de manière ubiquitaire, est induite chez les souris KO *Acox1* d'environ 6 fois. Bien que cette expression soit réduite en présence de l'ACOX1 humaine, elle reste induite de 3 fois chez ces souris par rapport aux souris sauvages. Cela pourrait constituer un indice d'une dissipation du gradient de protons et d'un découplage de la phosphorylation oxydative et production de chaleur en absence d'activité ACOX1 chez la souris. L'analyse des niveaux d'ARNm du coactivateur de PPAR γ , PGC-1 α , régulant la biogenèse et le métabolisme mitochondrial et de NRF1 et NRF2 montre des taux d'expression similaires entre les souris sauvages, *Acox1*^{-/-} et hACOX1. Cependant, l'expression de NRF2 est réprimée chez les *Acox1*^{-/-} et restaurée par l'expression de l'ACOX1 humaine tout comme l'expression de PRC, un membre de la famille des coactivateurs de PPAR γ . Le facteur de transcription TFAM régulé par NRF1 et NRF2 et responsable de la biogenèse, de la réplication de l'ADN et de l'expression des gènes mitochondriaux est aussi réprimée chez les *Acox1*^{-/-}.

Les souris *Acox1*^{-/-} ont été générées dans le laboratoire du Pr. Reddy en 1996 par recombinaison homologue basée sur l'exclusion de l'exon 9 du gène de l'ACOX1 (Fan et al., 1996a). Ces souris n'exprimant pas la protéine ACOX1, présentent un retard de croissance, sont infertiles et accumulent les AGTLC dans leur plasma. A l'âge de 3-4 mois, ces souris montrent une hépatomégalie accompagnée d'une sévère stéatose microvésiculaire. Dans ces hépatocytes stéatosiques, les peroxysomes sont absents ou diminués en nombre. A l'âge de 4 à 5 mois, des lipogranulomas inflammatoires contenant des lymphocytes, des macrophages et des éosinophiles se forment dans le foie stéatosique. A l'âge de 6-8 mois, les souris *Acox1*^{-/-} montrent une forte régénération des hépatocytes non stéatosiques accompagnée d'une forte prolifération des peroxysomes, remplacent les hépatocytes dépourvus de peroxysomes. En fin, ces souris à l'âge de 10-15 mois développent une hépatocarcinogenèse due à l'activation chronique de PPAR α (Fan et al., 1996a; Fan et al., 1998; Hashimoto et al., 1999).

Une observation étonnante chez les souris *Acox1*^{-/-} est la diminution du nombre de peroxysomes et la présence de membranes peroxysomales fantômes (Fan et al., 1996a). Il a été suggéré que l'accumulation des AGTLC toxiques dans les hépatocytes pourrait interférer avec l'importation des protéines peroxysomales et perturber la perméabilité des membranes peroxysomales (Fan et al., 1996a). De plus, chez ces souris où la β -oxydation peroxysomale est absente, des observations indiquent la présence au niveau hépatique de structures mitochondriales anormales (Fan et al., 1996b). Plusieurs modèles murins, dans lesquels la β -oxydation peroxysomale est déficiente telles que les souris *Pex5*^{-/-} (le modèle murin du syndrome de Zellweger), les souris ALD (modèle de l'X-ALD) et les souris double K.O *L-Pbe*^{-/-} *D-Pbe*^{-/-}, montrent des altérations de la structure des mitochondries aussi bien au niveau hépatique que rénal (Baumgart et al., 2001; Jia et al., 2003; McGuinness et al., 2003). Concernant les souris *Acox1*^{-/-}, il est nécessaire d'explorer par microscopie électronique la présence ou non d'anomalies structurales au niveau mitochondrial. Cependant, nos travaux révèlent des perturbations des activités de la chaîne respiratoire mitochondriale avec l'augmentation de l'activité du complexe II (rapportée au complexe IV) et la diminution des activités des complexes III et IV chez ces souris *Acox1*^{-/-}. Le rétablissement des activités complexes respiratoires, suite à la restauration de l'activité ACOX1 chez les souris hACOX1, met en évidence l'existence d'un lien entre l'activité ACOX1 et la fonction mitochondriale. De la même manière, l'absence de peroxysome chez les souris *Pex5*^{-/-} et donc l'absence d'un système de β -oxydation peroxysomal fonctionnel affecte les fonctions de la mitochondrie notamment par une réduction importante de l'activité du complexe I, III et V (Dirkx et al.,

2005). Plus généralement, il apparaît donc que la déficience de la β -oxydation peroxysomale affecte le fonctionnement de la mitochondrie.

Les souris *Acox1*^{-/-} développent à l'âge de 2 mois une stéatose microvésiculaire au niveau hépatique (Fan et al., 1996a). La stéatose hépatique non alcoolique (NASH pour non alcoholic steatohepatitis) est la maladie la plus commune des maladies touchant le foie. Les patients atteints de NASH ainsi que les souris modèles de cette maladie développent une stéatose hépatique et montrent des mitochondries présentant des altérations structurales (Caldwell et al., 1999; Sanyal et al., 2001). Chez l'homme, des études ont montrés que les tumeurs de foie sont souvent accompagnées d'une diminution de l'expression des gènes codant le complexe IV et les protéines de la respiration mitochondriale (Sato, 2007). De plus chez les patients atteint de NASH, il a été décrit des délétions au niveau de l'ADNmt qui pourraient être à l'origine du dysfonctionnement mitochondrial, et notamment des réductions au niveau des activités enzymatiques des complexes I, II, IV et V (Chen et al., 1998; Perez-Carreras et al., 2003). Alors que chez les souris *Acox1*^{-/-} l'altération de la fonction mitochondriale est limitée au complexe II et IV, cela paraît suffisant pour provoquer une réduction de la respiration mitochondriale et la perturbation du flux d'électrons à travers les composantes de la chaîne respiratoire. L'ensemble de ces observations pose la question sur le rôle du dysfonctionnement mitochondrial, dû à l'absence de la β -oxydation peroxysomale, dans le déclenchement de la stéatose hépatique (Schattenberg et Schuppan, 2011).

La perturbation du flux d'électrons chez les souris *Acox1*^{-/-} a été caractérisée grâce à la mesure de la respiration mitochondriale. Or, il a été décrit que si le flux d'électrons est perturbé ou interrompu à n'importe quel niveau de la chaîne respiratoire, le reste des composantes de la chaîne pourraient transférer les électrons à l'oxygène moléculaire pour produire des anions superoxydes et du peroxyde d'hydrogène (Garcia-Ruiz et al., 1995). Ceci est vrai dans le cas de la déficience en ACOX1 puisque les souris *Acox1*^{-/-} produisent du peroxyde d'hydrogène au niveau hépatique et la concentration de ce dernier augmente chez les souris *Acox1*^{-/-} entre l'âge de 2 à 13 mois (Fan et al., 1998). Le stress oxydant chez les souris *Acox1*^{-/-} pourrait être accentué d'avantage puisque ces souris montrent une forte réduction du nombre de peroxysome au niveau du foie et résulte en l'absence de la fonction de détoxification du peroxysome. Une augmentation du stress oxydant a été détectée également dans des fibroblastes de patients déficients en MFP2 et chez les souris *Pex5*^{-/-} (Baumgart et al., 2001; Ferdinandusse et al., 2003). En effet, dans le cas de la stéatose non alcoolique, la génération d'espèces réactives de l'oxygène (ERO) a été associée à une

altération de la chaîne respiratoire (Hruszkewycz et Bergtold, 1990). De même, le modèle murin pour le carcinome hépatique (HCC) présente une augmentation de production d'ERO associée à la diminution du pouvoir antioxydant de la glutathion peroxydase (Factor et al., 1998). Les ERO qui ont des effets néfastes sur la cellule, associés à un environnement riche en lipides, induisent la peroxydation des lipides. Ces derniers libèrent des dérivés aldéhydiques hautement réactifs qui altèrent d'avantage le fonctionnement de la chaîne respiratoire et endommagent le génome mitochondrial (Hruszkewycz et Bergtold, 1990). De plus, il a été montré dans des hépatocytes de souris traitées par l'éthanol, une surproduction d'ERO et une peroxydation lipidique provoquant une stéatose microvésiculaire, une déplétion de l'ADNmt et des mitochondries de structures anormales (Demeilliers et al., 2002). Il est clair que chez les souris *Acox1*^{-/-}, la réduction du nombre de peroxysome et de leur fonction de détoxification ainsi que la surproduction d'H₂O₂ indiquent un statut de stress oxydant au niveau du foie. Cependant, dans le cas de la déficience en ACOX1, le stress oxydant serait-il la cause ou la conséquence du dysfonctionnement de la mitochondrie ? Cela ramène à une autre question concernant le niveau de la β-oxydation mitochondriale, est-elle réduite ou induite chez les souris *Acox1*^{-/-} ? Ces souris accumulent des AGTLC toxiques pour la cellule qui constituent des ligands endogènes de PPARα. L'induction de PPARα et de ses gènes cibles a été déjà démontrée chez ces souris notamment les gènes MFP, THL, les monooxygénases CYP4A1 et CYP4A3 (Fan et al., 1998; Vluggens et al., 2010) mais aussi les gènes cibles de la β-oxydation mitochondriale tels que les gènes CPTII, VLCAD, LCAD, MCAD, SCAD et HADH (Hashimoto et al., 1999). Ces résultats supposent une induction de la β-oxydation suite à l'induction de PPARα. Cependant, certaines drogues induisant la stéatose hépatique ont été décrites pour altérer la β-oxydation mitochondriale (Pessayre et al., 2002). Cette altération provoque une accumulation des acides gras normalement pris en charge par la mitochondrie (Pessayre et al., 2002). De plus, dans les cellules HepG2, une lipotoxicité induite par l'acide palmitique provoque un dysfonctionnement mitochondrial caractérisé par une diminution du taux de la β-oxydation mitochondriale et une production d'ERO (Jun et al., 2011). De plus, une augmentation de la production d'ERO associée à une accumulation de lipides due à une altération de la β-oxydation mitochondriale, aboutirait à une peroxydation des lipides. Les produits de la peroxydation lipidique tels que le malondialdéhyde et le 4-hydroxynonanal peuvent inhiber le complexe IV (Demeilliers et al., 2002). Le 4-HNE, produit de la peroxydation lipidique a été détecté dans le modèle murin de NASH (Jun et al., 2011). Dans le contexte de cette lipotoxicité, une étude a montré que le traitement par des concentrations d'acyl-CoA supérieures à 2 μM au niveau du muscle de

souris inhibe le transport d'électrons et interfère avec la synthèse d'ATP (Abdul-Ghani et al., 2008). Il est clair que le taux d'ATP total dans les souris *Acox1*^{-/-}, malgré les perturbations des activités des complexes II et IV et la diminution de la respiration mitochondriale, ne varie pas. Dans le cas des souris *Pex5*^{-/-}, il a été montré un taux d'ATP normal malgré les déficiences de la chaîne respiratoire (Baumgart et al., 2001). Ceci a été attribué à la présence de mitochondries de structure normale parmi les mitochondries endommagées. Cependant, dans le cas de souris *Acox1*^{-/-}, une telle explication nécessite des observations approfondies de la structures des mitochondries au niveau du foie ainsi que le dosage du taux d'ATP mitochondrial. Ceci n'écarte pas l'hypothèse d'une compensation du déficit en ATP mitochondrial, s'il existe, par une synthèse accrue de l'ATP par la voie de glycolyse.

Les souris *Acox1*^{-/-} développent une stéatose microvésiculaire au niveau hépatique à un très jeune âge. Cependant, les mécanismes moléculaires responsables du développement de la stéatose chez ces souris restent pour le moment inconnus. Le rôle de PPAR α dans le développement de la stéatose hépatique chez les souris *Acox1*^{-/-} a été étudié par l'obtention de souris double KO *Ppara*^{-/-}/*Acox1*^{-/-}. Ces souris double KO ne développent pas de stéatose hépatique (Hashimoto et al., 1999). La déficience en ACOX1 bloque la β -oxydation peroxysomale et provoque l'accumulation des substrats de l'ACOX1. Ces derniers, sont des composés toxiques et constituent des ligands endogènes pour PPAR α . L'activation de PPAR α induit la voie d' ω -oxydation (Hashimoto et al., 1999) et aboutit à la transformation des AGLC en acides dicarboxyliques (DCAs) qui sont des produits toxiques pour la mitochondrie provoquant le découplage de la phosphorylation oxydative (Tonsgard et Getz, 1985) et endommageant les membranes mitochondriales (Ho et al., 1995). Les DCAs ont été décrits pour leurs effets cytotoxiques et anti-mitochondriaux (effets inhibiteurs) sur la respiration mitochondriale et sur les activités des complexes I, II et IV. Cette étude suggère également que, dans les mitochondries hépatiques de rat, plus la chaîne des DCAs est longue et plus leurs effets inhibiteurs sur la mitochondrie sont importants (Passi et al., 1984). L'absence de perturbation mitochondriale dans le modèle de souris double KO *Ppara*^{-/-}/*Acox1*^{-/-}, suggère que l'absence de PPAR α limiterait la production de DCAs et par la suite les atteintes mitochondriales.

L'étude des expressions en ARNm des principales protéines participant au processus de fission/fusion de la mitochondrie a été réalisée chez les souris *Acox1*^{-/-}. Chez ces souris, ce phénomène est plus marqué avec une diminution de l'expression de l'ARNm de MFN1. Cependant, cette diminution n'est pas restaurée par l'expression de l'ACOX1 chez les souris

hACOX1, alors que les expressions des ARNm de MFN2 et OPA1 ne montrent pas de variations chez les souris *Acox1*^{-/-} par rapport aux souris sauvages WT. L'augmentation des taux en ARNm de MFN2 et OPA1 chez les souris hACOX1 par rapport aux souris WT est intrigant dans le sens où aucune variation de l'expression de ces facteurs n'est détectée chez les souris *Acox1*^{-/-}. Cela pourrait suggérer un lien indirect entre l'absence de l'ACOX1 et la perturbation de la biogenèse de la mitochondrie comme conséquence des désordres métaboliques liés à la déficience en ACOX1. Cependant, l'étude de l'expression par Western blot des différentes protéines impliquées dans la fission/fusion des mitochondries pourrait conforter les résultats obtenus au niveau transcriptionnel. Le maintien de la morphologie mitochondriale à travers l'équilibre des phénomènes de fusion/fission pourrait jouer un rôle critique pour le fonctionnement mitochondrial (Chan, 2006a; Chen et Chan, 2005).

Ce lien structure/fonction a été vérifié à plusieurs reprises dans des modèles déficients pour des protéines de fusion ou de fission. Les cellules déficientes en MFN1 et MFN2 ou en OPA1 poussent lentement, possèdent des mitochondries fragmentées et montrent un potentiel membranaire perturbé ainsi qu'une diminution de la respiration cellulaire suite à la diminution des activités des complexes respiratoires de la mitochondrie (Chen et al., 2005). Est-ce que la perturbation de la structure mitochondriale est la conséquence du dysfonctionnement de la mitochondrie ou plutôt la cause de ce dysfonctionnement ? Ceci reste à déterminer.

L'expression transgénique de l'ACOX1 humaine chez les souris *Acox1*^{-/-} (hACOX1) rectifie les anomalies fonctionnelles de la mitochondrie en rétablissant les activités enzymatiques des complexes II et IV à un niveau comparable à celui des souris sauvages (WT). De plus, l'expression de l'ACOX1 humaine permet à la fois la restauration de la respiration mitochondriale et les expressions des gènes impliqués dans le processus de fusion/fission de la mitochondrie. Bien que chez les souris *Acox1*^{-/-} le taux d'ATP total ne varie pas, l'augmentation de ce taux de 2 fois chez les souris hACOX1 est un résultat inattendu. Cela peut être dû à la réactivation des systèmes de β -oxydation peroxysomal et mitochondrial dans un environnement de stéatose nécessitant une forte induction de ces systèmes par la cellule pour éliminer des acides gras toxiques accumulés et restaurer un phénotype similaire à celui des souris sauvages. Chez les souris *Acox1*^{-/-}, il a été montré que le stress du réticulum endoplasmique est un phénomène qui favorise la progression de la stéatose avec l'âge vers une stéatohépatite, une fibrose et une hépatocarcinogénèse. Chez ces mêmes souris, l'expression transgénique de l'ACOX1 humaine empêche le développement du stress du réticulum endoplasmique et par la suite, le développement du phénotype hépatique observé

chez les souris *Acox1*^{-/-} (Huang et al., 2011). Cela constitue ainsi une preuve que le gène humain de l'ACOX1 remplace le gène de la souris du point de vue fonctionnel. La restauration de l'activité ACOX1 permettrait la dégradation d'un certain nombre de métabolites qui constituent à la fois des substrats de l'enzyme et des ligands de PPAR α (Huang et al., 2011).

Pour expliquer le dysfonctionnement de la mitochondrie chez les souris *Acox1*^{-/-} on peut suggérer le scénario suivant : la déficience en ACOX1 provoque le blocage de la β -oxydation peroxysomale et l'accumulation des AGTLC et des dérivés-CoA substrats de l'ACOX1. Parmi ces métabolites, certains constituent des ligands endogènes de PPAR α provoquant ainsi son activation. L'activation de PPAR α aboutit à l'induction de ses gènes cibles notamment les gènes codant les CYP4A1 et CYP4A3 induisant ainsi la voie de l' ω -oxydation. Cette voie métabolise les AGLC au niveau microsomal en DCAs. L'accumulation des DCAs suite à l'incapacité de la β -oxydation peroxysomale à les dégrader et parallèlement à l'induction soutenue de la voie d' ω -oxydation par PPAR α , induisent une toxicité au niveau de la mitochondrie. Cette toxicité pourrait provoquer une inhibition de la voie de β -oxydation mitochondriale, une réduction des activités des complexes de la chaîne respiratoire aboutissant à un découplage de la phosphorylation oxydative et une dissipation du flux d'électrons. Ces perturbations induisent un stress oxydatif amplifié par l'absence de peroxysoxe et de leur fonction de détoxification chez les souris *Acox1*^{-/-}, provoquant ainsi la production des radicaux oxygénés. Ces produits extrêmement toxiques pour la cellule pourraient endommager l'ADNmt et l'ADN nucléaire perturbant ainsi la synthèse de protéines et endommageant la structure de la mitochondrie. L'inhibition des fonctions mitochondriales en plus du stress oxydatif provoque d'avantage l'accumulation des substrats qui doivent être pris en charge par la mitochondrie pour leurs β -oxydation. L'accumulation accrue de ces substrats (acides gras de courtes, moyennes et longues chaînes) dans la cellule en plus de l'accumulation des AGTLC suite à l'inhibition de la β -oxydation peroxysomale déclencherait la stéatose au niveau des hépatocytes qui progresse vers une hépatocarcinogénèse et un développement du stress du RE.

E. Déficience en ACOX1 et effets sur la biogénèse et le métabolisme énergétique dans les fibroblastes P-NALD et souris *Acox1*^{-/-}

Sur le plan phénotypique, la déficience en ACOX1 chez l'homme se traduit par une hypotonie musculaire, une hépatomégalie et un retard mental en plus d'une démyélinisation. Chez la souris, l'absence de l'ACOX1 provoque un retard de croissance, et le développement

d'une stéatose hépatique qui évolue vers un stress du réticulum endoplasmique puis une hépatocarcinogénèse. Cependant, ces souris ne développent pas de symptômes neurologiques, ni musculaires.

Aussi bien chez l'homme que chez la souris, l'absence de l'activité acyl-CoA oxydase 1 influence la fonction mitochondriale. Dans les fibroblastes humains, la morphologie de la mitochondrie est anormale. Ceci est accompagné par une perturbation du processus de biogenèse. Ce processus est également marqué au niveau hépatique chez les souris indiquant un déséquilibre de la fusion des mitochondries.

Au cours de ce travail, nous avons montré l'effet de la déficience en ACOX1 sur la mitochondrie dans les deux modèles humain (fibroblastes) et murin (foie).

L'amplitude des perturbations, dues à la déficience en ACOX1, n'est pas la même dans les fibroblastes humains que chez les souris. Les expressions en ARNm des mitofusines montrent une forte tendance pour un déséquilibre du processus de biogenèse des mitochondries, ce processus est réprimé chez les souris montrant un déficit de la fusion mitochondriale (mitofusine 1), un processus indispensable pour le fonctionnement optimal de la mitochondrie.

Ces altérations de la morphologie, dans les fibroblastes humains, s'accompagnent d'une diminution du nombre de mitochondrie bien que les expressions en ARNm des différentes sous-unités des complexes respiratoires ne varient pas. Contrairement à ce qui se passe chez l'homme, chez les souris les expressions en ARNm des différents gènes codant les sous-unités des complexes de la chaîne respiratoire diminuent. Ceci montre un effet plus sévère de la déficience en ACOX1 chez la souris que chez l'homme sur le dysfonctionnement mitochondrial mais ceci montre également que chez les deux espèces, l'activité de l'ACOX1 est nécessaire pour maintenir indirectement une morphologie mitochondriale normale.

La phosphorylation oxydative est altérée aussi bien chez l'homme que chez la souris. Dans les fibroblastes, l'activité du complexe V est augmentée avec un taux d'ATP mitochondrial qui diminue. Chez la souris, l'activité du complexe V n'a pas été mesurée, cependant, le dysfonctionnement de la chaîne respiratoire est situé au niveau du complexe IV avec une respiration mitochondriale altérée indiquant un découplage entre les protons et la production en ATP mitochondrial. Bien qu'on ne trouve pas l'altération au niveau du même complexe, le résultat final semble être similaire quant au dysfonctionnement de la

phosphorylation oxydative et à l'incapacité de synthèse normale d'ATP mitochondrial pour répondre aux besoins cellulaires.

Il est à prendre en considération quelques différences importantes observées entre la souris et l'homme. Dans les fibroblastes humains déficients en ACOX1, les peroxysomes diminuent en nombre alors que chez les souris, peu de peroxysomes sont présents au niveau hépatique et dans certaines cellules sont absents. Chez les souris, PPAR α est fortement activé suite à l'accumulation de ses ligands endogènes en absence de l'activité ACOX1 induisant ainsi la voie d' ω -oxydation et aboutissant au développement de la stéatose hépatique. Dans les fibroblastes humains, il semble que le niveau de β -oxydation peroxysomale soit faible par rapport à celui de la souris. De plus, chez l'homme, le niveau d'activation de PPAR α par ses agonistes est plus faible que celui chez la souris. On peut également rappeler la difficulté de comparer les résultats dans le foie, un tissu hautement métabolique, et les fibroblastes ayant un métabolisme très faible. Cependant, l'expression de l'ACOX1 humaine chez les souris *Acox1*^{-/-} est capable de rétablir un phénotype normal similaire à celui observé avec les souris sauvages.

Ces différences doivent être considérées pour comprendre la différence en ampleur du dysfonctionnement mitochondrial. L'obtention de modèles cellulaires équivalents chez l'homme et chez la souris devrait apporter des réponses plus approfondies.



**Conclusions et
Perspectives**

Conclusions

Les travaux réalisés au cours de cette thèse soulignent le rôle métabolique indispensable que joue l'ACOX1 dans l'homéostasie du métabolisme cellulaire. Ainsi, en utilisant des fibroblastes déficients pour l'activité ACOX1 issus de patients P-NALD, nous avons montré :

- Que l'absence de l'activité ACOX1 réduit fortement la β -oxydation peroxysomale et affecte le nombre et la morphologie des peroxysomes. Les peroxysomes sont réduits en nombre et élargis en taille.
- Que l'accumulation des AGTLC dans les fibroblastes déficients en ACOX1 active la voie d'IL-1 et aboutit à la sécrétion d'IL-6 et D'IL-8. La production de ces cytokines inflammatoires inhibe à son tour la β -oxydation peroxysomale et aggrave la réponse inflammatoire.
- Une induction au niveau transcriptionnel des composantes de la voie de synthèse du cholestérol qui pourrait permettre une production accrue d'esters de cholestérol afin de séquestrer les AGTLC toxiques accumulés.
- Une altération de la morphologie mitochondriale et une diminution du nombre de mitochondries. Ces altérations sont accompagnées par un fonctionnement anormal du complexe V de la chaîne respiratoire et par une baisse de la production d'ATP mitochondrial compensée par une augmentation de la production d'ATP par glycolyse.
- Une diminution de la phosphorylation de l'AMPK et une inhibition de PGC-1 α par acétylation indiquant la perturbation de ces voies de signalisations régulant la biogenèse et le métabolisme énergétique mitochondriaux.

Par ailleurs, nous avons évalué l'effet de la déficience en ACOX1 sur le métabolisme mitochondrial au niveau hépatique chez les souris *Acox1*^{-/-} et les souris *Acox1*^{-/-} transgéniques pour l'ACOX1 humaine et nous avons montré :

- Que le profil anormal de l'expression des gènes de la fusion mitochondriale, chez les souris *Acox1*^{-/-}, est rétabli par l'expression de l'ACOX1 humaine.

- Qu'une diminution de l'expression des gènes codant des protéines de la chaîne respiratoire mitochondriale chez les souris *Acox1*^{-/-} est rétablie par l'expression de l'ACOX1 humaine.
- Qu'une diminution de l'expression de certaines protéines du complexe IV accompagnée d'une baisse de l'activité enzymatique de ce complexe, d'une diminution de la respiration mitochondriale avec un taux d'ATP normal. Ces altérations du métabolisme énergétique de la mitochondrie sont rétablies par l'ACOX1 humaine aux mêmes niveaux que chez les souris sauvages.

L'ensemble des résultats présentés dans ce manuscrit souligne l'incidence de la déficience de l'ACOX1 sur l'équilibre de la production de cytokines pro- et anti-inflammatoires, sur l'homéostasie du métabolisme du cholestérol et sur la morphologie et le métabolisme énergétique mitochondrial.

Perspectives

Les phénomènes moléculaires reliant d'un côté l'accumulation des AGTLC et l'inflammation (voie IL-1) et d'un autre côté la démyélinisation restent jusqu'à présent inconnus. Dans un premier temps, il serait intéressant d'effectuer des analyses de marqueurs inflammatoires plasmatiques chez les patients atteints de P-NALD et dans un deuxième temps de développer un modèle de cellules du système nerveux déficientes en ACOX1 telles que des oligodendrocytes qui sont des cellules qui assurent la formation de myéline autour des axones.

L'étude de l'induction de la voie de synthèse du cholestérol sera poursuivie dans les fibroblastes P-NALD et dans le foie des souris *Acox1*^{-/-}. Cette étude sera complétée par la mesure des activités des enzymes clés de la voie de synthèse du cholestérol et par le dosage du cholestérol intracellulaire.

Dans les fibroblastes P-NALD, il serait indispensable de décortiquer le mécanisme qui fait le lien entre la déficience en ACOX1 et les altérations des fonctions mitochondriales. Cependant, certains points devraient être clarifiés concernant le niveau de la β -oxydation mitochondriale, l'état de la respiration mitochondriale, le potentiel membranaire

mitochondrial et l'état du stress oxydant notamment les activités des enzymes glutathion peroxydase et Cu/Mn-SOD et les niveaux des espèces réactives de l'oxygène. Nous envisageons également de déterminer au niveau des fibroblastes le niveau de la glycolyse dans le cadre de la diminution de la phosphorylation de la protéine AMPK.

Dans les fibroblastes P-NALD, le coactivateur PGC-1 α joue un rôle clé dans la régulation de la biogenèse et du statut énergétique de la mitochondrie. Il serait nécessaire d'identifier le mécanisme ou la voie de signalisation responsable de la répression de ce co-coactivateur en absence de l'activité ACOX1. Cela permettra dans un premier temps de définir le mécanisme ou bien la voie de signalisation responsable de la répression. Dans un deuxième temps, nous poursuivrons les essais pour lever la répression de l'AMPK et de PGC-1 α par des activateurs de l'AMPK dans le but de restaurer un phénotype mitochondrial normal.

Chez les souris *Acox1*^{-/-}, au niveau hépatique, la mesure de l'activité enzymatique de complexe V avec l'étude du potentiel de la membrane interne mitochondriale permettra de compléter le travail présenté dans ce manuscrit. Cependant, il serait indispensable d'étudier le comportement des voies de signalisations contrôlant la biogenèse et le métabolisme mitochondrial ainsi que la β -oxydation peroxysomale.

Finalement, un modèle cellulaire d'hépatocytes humain déficitaires en ACOX1 pourrait être établi par shRNA. Ainsi, nous pourrions étudier les effets de la déficience de l'ACOX1 dans des cellules où le métabolisme énergétique est plus actif. Ceci dans le but de comparer les différences et les similitudes entre l'homme et les modèles murins.



**Références
bibliographiques**

- Abdul-Ghani, M.A., F.L. Muller, Y. Liu, A.O. Chavez, B. Balas, P. Zuo, Z. Chang, D. Tripathy, R. Jani, M. Molina-Carrion, A. Monroy, F. Folli, H. Van Remmen, and R.A. DeFronzo. 2008. Deleterious action of FA metabolites on ATP synthesis: possible link between lipotoxicity, mitochondrial dysfunction, and insulin resistance. *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism*. 295:E678-685.
- Abe, I., and Y. Fujiki. 1998. cDNA cloning and characterization of a constitutively expressed isoform of the human peroxin Pex11p. *Biochemical and biophysical research communications*. 252:529-533.
- Aboushadi, N., and S.K. Krisans. 1998. Analysis of isoprenoid biosynthesis in peroxisomal-deficient Pex2 CHO cell lines. *Journal of lipid research*. 39:1781-1791.
- Afzelius, B.A. 1965. The occurrence and structure of microbodies : a comparative study. *The Journal of cell biology*. 26:835-843.
- Alcain, F.J., and J.M. Villalba. 2009. Sirtuin inhibitors. *Expert opinion on therapeutic patents*. 19:283-294.
- Anderson, R.M., J.L. Barger, M.G. Edwards, K.H. Braun, C.E. O'Connor, T.A. Prolla, and R. Weindruch. 2008. Dynamic regulation of PGC-1alpha localization and turnover implicates mitochondrial adaptation in calorie restriction and the stress response. *Aging cell*. 7:101-111.
- Andrade-Navarro, M.A., L. Sanchez-Pulido, and H.M. McBride. 2009. Mitochondrial vesicles: an ancient process providing new links to peroxisomes. *Current opinion in cell biology*. 21:560-567.
- Antonenkov, V.D., P.P. Van Veldhoven, E. Waelkens, and G.P. Mannaerts. 1999. Comparison of the stability and substrate specificity of purified peroxisomal 3-oxoacyl-CoA thiolases A and B from rat liver. *Biochimica et biophysica acta*. 1437:136-141.
- Aquilano, K., P. Vigilanza, S. Baldelli, B. Pagliei, G. Rotilio, and M.R. Ciriolo. 2010. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma co-activator 1alpha (PGC-1alpha) and sirtuin 1 (SIRT1) reside in mitochondria: possible direct function in mitochondrial biogenesis. *The Journal of biological chemistry*. 285:21590-21599.
- Asin-Cayuela, J., and C.M. Gustafsson. 2007. Mitochondrial transcription and its regulation in mammalian cells. *Trends in biochemical sciences*. 32:111-117.
- Au, H.C., and I.E. Scheffler. 1998. Promoter analysis of the human succinate dehydrogenase iron-protein gene-- both nuclear respiratory factors NRF-1 and NRF-2 are required. *European journal of biochemistry / FEBS*. 251:164-174.
- Bagattin, A., L. Hugendubler, and E. Mueller. 2010. Transcriptional coactivator PGC-1alpha promotes peroxisomal remodeling and biogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 107:20376-20381.
- Balaban, R.S., S. Nemoto, and T. Finkel. 2005. Mitochondria, oxidants, and aging. *Cell*. 120:483-495.
- Basu, A., N. Lenka, J. Mullick, and N.G. Avadhani. 1997. Regulation of murine cytochrome oxidase Vb gene expression in different tissues and during myogenesis. Role of a YY-1 factor-binding negative enhancer. *The Journal of biological chemistry*. 272:5899-5908.
- Baudhuin, P., H. Beaufay, and C. De Duve. 1965. Combined biochemical and morphological study of particulate fractions from rat liver. Analysis of preparations enriched in lysosomes or in particles containing urate oxidase, D-amino acid oxidase, and catalase. *The Journal of cell biology*. 26:219-243.

- Baumgart, E., H.D. Fahimi, A. Stich, and A. Volkl. 1996a. L-lactate dehydrogenase A4- and A3B isoforms are bona fide peroxisomal enzymes in rat liver. Evidence for involvement in intraperoxisomal NADH reoxidation. *The Journal of biological chemistry*. 271:3846-3855.
- Baumgart, E., J.C. Vanhooren, M. Fransen, P. Marynen, M. Puype, J. Vandekerckhove, J.A. Leunissen, H.D. Fahimi, G.P. Mannaerts, and P.P. van Veldhoven. 1996b. Molecular characterization of the human peroxisomal branched-chain acyl-CoA oxidase: cDNA cloning, chromosomal assignment, tissue distribution, and evidence for the absence of the protein in Zellweger syndrome. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 93:13748-13753.
- Baumgart, E., I. Vanhorebeek, M. Grabenbauer, M. Borgers, P.E. Declercq, H.D. Fahimi, and M. Baes. 2001. Mitochondrial alterations caused by defective peroxisomal biogenesis in a mouse model for Zellweger syndrome (PEX5 knockout mouse). *The American journal of pathology*. 159:1477-1494.
- Beatty, N.B., and M.D. Lane. 1983. Kinetics of activation of acetyl-CoA carboxylase by citrate. Relationship to the rate of polymerization of the enzyme. *The Journal of biological chemistry*. 258:13043-13050.
- Bernhard, W., and C. Rouiller. 1956. Microbodies and the problem of mitochondrial regeneration in liver cells. *The Journal of biophysical and biochemical cytology*. 2:355-360.
- Bhaumik, P., M.K. Koski, T. Glumoff, J.K. Hiltunen, and R.K. Wierenga. 2005. Structural biology of the thioester-dependent degradation and synthesis of fatty acids. *Current opinion in structural biology*. 15:621-628.
- Biardi, L., A. Sreedhar, A. Zokaei, N.B. Vartak, R.L. Bozeat, J.E. Shackelford, G.A. Keller, and S.K. Krisans. 1994. Mevalonate kinase is predominantly localized in peroxisomes and is defective in patients with peroxisome deficiency disorders. *The Journal of biological chemistry*. 269:1197-1205.
- Borisov, V.B. 2002. Defects in mitochondrial respiratory complexes III and IV, and human pathologies. *Molecular aspects of medicine*. 23:385-412.
- Breidenbach, R.W., and H. Beevers. 1967. Association of the glyoxylate cycle enzymes in a novel subcellular particle from castor bean endosperm. *Biochemical and biophysical research communications*. 27:462-469.
- Briere, J.J., J. Favier, V. El Ghouzzi, F. Djouadi, P. Benit, A.P. Gimenez, and P. Rustin. 2005. Succinate dehydrogenase deficiency in human. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*. 62:2317-2324.
- Brites, P., H.R. Waterham, and R.J. Wanders. 2004. Functions and biosynthesis of plasmalogens in health and disease. *Biochimica et biophysica acta*. 1636:219-231.
- Brocard, C., M. Es-Souni, L.C. Ramirez, N. Latruffe, and P. Bournot. 1993. Stimulation of peroxisomal palmitoyl-CoA oxidase activity by ciprofibrate in hepatic cell lines: comparative studies in Fao, MH1C1 and HepG2 cells. *Biol Cell*. 77:37-41.
- Brocard, C., and A. Hartig. 2006. Peroxisome targeting signal 1: is it really a simple tripeptide? *Biochimica et biophysica acta*. 1763:1565-1573.
- Brown, L.A., and A. Baker. 2008. Shuttles and cycles: transport of proteins into the peroxisome matrix (review). *Molecular membrane biology*. 25:363-375.
- Busquets, S., D. Sanchis, B. Alvarez, D. Ricquier, F.J. Lopez-Soriano, and J.M. Argiles. 1998. In the rat, tumor necrosis factor alpha administration results in an increase in both UCP2 and UCP3 mRNAs in skeletal muscle: a possible mechanism for cytokine-induced thermogenesis? *FEBS letters*. 440:348-350.

- Caira, F., M. Cherkaoui-Malki, G. Hoefler, and N. Latruffe. 1996. Cloning and tissue expression of two cDNAs encoding the peroxisomal 2-enoyl-CoA hydratase/3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase in the guinea pig liver. *FEBS letters*. 378:57-60.
- Caira, F., M.C. Clemencet, M. Cherkaoui-Malki, M. Dieuaide-Noubhani, C. Pacot, P.P. Van Veldhoven, and N. Latruffe. 1998. Differential regulation by a peroxisome proliferator of the different multifunctional proteins in guinea pig: cDNA cloning of the guinea pig D-specific multifunctional protein 2. *The Biochemical journal*. 330 (Pt 3):1361-1368.
- Caira, F., C. Pacot, O. Bardot, M. Cherkaoui Malki, and N. Latruffe. 1995. Transcriptional and post-transcriptional analysis of peroxisomal protein encoding genes from rat treated with an hypolipemic agent, ciprofibrate. Effect of an intermittent treatment and influence of obesity. *Biochemical pharmacology*. 49:611-619.
- Caldwell, S.H., R.H. Swerdlow, E.M. Khan, J.C. Iezzoni, E.E. Hespeneide, J.K. Parks, and W.D. Parker, Jr. 1999. Mitochondrial abnormalities in non-alcoholic steatohepatitis. *Journal of hepatology*. 31:430-434.
- Camoses, F., N.A. Bonekamp, H.K. Delille, and M. Schrader. 2009. Organelle dynamics and dysfunction: A closer link between peroxisomes and mitochondria. *Journal of inherited metabolic disease*. 32:163-180.
- Canto, C., Z. Gerhart-Hines, J.N. Feige, M. Lagouge, L. Noriega, J.C. Milne, P.J. Elliott, P. Puigserver, and J. Auwerx. 2009. AMPK regulates energy expenditure by modulating NAD⁺ metabolism and SIRT1 activity. *Nature*. 458:1056-1060.
- Carling, D., and D.G. Hardie. 1989. The substrate and sequence specificity of the AMP-activated protein kinase. Phosphorylation of glycogen synthase and phosphorylase kinase. *Biochimica et biophysica acta*. 1012:81-86.
- Carroll, J., I.M. Fearnley, J.M. Skehel, R.J. Shannon, J. Hirst, and J.E. Walker. 2006. Bovine complex I is a complex of 45 different subunits. *The Journal of biological chemistry*. 281:32724-32727.
- Carrozzo, R., C. Bellini, S. Luciola, F. Deodato, D. Cassandrini, M. Cassanello, U. Caruso, C. Rizzo, T. Rizza, M.L. Napolitano, R.J. Wanders, C. Jakobs, C. Bruno, F.M. Santorelli, C. Dionisi-Vici, and E. Bonioli. 2008. Peroxisomal acyl-CoA-oxidase deficiency: two new cases. *American journal of medical genetics. Part A*. 146A:1676-1681.
- Casteels, M., L. Schepers, P.P. Van Veldhoven, H.J. Eysen, and G.P. Mannaerts. 1990. Separate peroxisomal oxidases for fatty acyl-CoAs and trihydroxycoprostanoyl-CoA in human liver. *Journal of lipid research*. 31:1865-1872.
- Chan, D.C. 2006a. Mitochondria: dynamic organelles in disease, aging, and development. *Cell*. 125:1241-1252.
- Chan, D.C. 2006b. Mitochondrial fusion and fission in mammals. *Annual review of cell and developmental biology*. 22:79-99.
- Chang, J.S., P. Huypens, Y. Zhang, C. Black, A. Kralli, and T.W. Gettys. 2010. Regulation of NT-PGC-1alpha subcellular localization and function by protein kinase A-dependent modulation of nuclear export by CRM1. *The Journal of biological chemistry*. 285:18039-18050.
- Chau, C.M., M.J. Evans, and R.C. Scarpulla. 1992. Nuclear respiratory factor 1 activation sites in genes encoding the gamma-subunit of ATP synthase, eukaryotic initiation factor 2 alpha, and tyrosine aminotransferase. Specific interaction of purified NRF-1 with multiple target genes. *The Journal of biological chemistry*. 267:6999-7006.
- Chen, H., and D.C. Chan. 2005. Emerging functions of mammalian mitochondrial fusion and fission. *Human molecular genetics*. 14 Spec No. 2:R283-289.

- Chen, H., A. Chomyn, and D.C. Chan. 2005. Disruption of fusion results in mitochondrial heterogeneity and dysfunction. *The Journal of biological chemistry*. 280:26185-26192.
- Chen, J., S. Schenker, T.A. Frosto, and G.I. Henderson. 1998. Inhibition of cytochrome c oxidase activity by 4-hydroxynonenal (HNE). Role of HNE adduct formation with the enzyme subunits. *Biochimica et biophysica acta*. 1380:336-344.
- Cherkaoui Malki, M., O. Bardot, J.C. Lhuguenot, and N. Latruffe. 1990a. Expression of liver peroxisomal proteins as compared to other organelle marker enzymes in rats treated with hypolipidemic agents. *Biology of the cell / under the auspices of the European Cell Biology Organization*. 69:83-92.
- Cherkaoui Malki, M., Y.C. Lone, M. Corral-Debrinski, and N. Latruffe. 1990b. Differential proto-oncogene mRNA induction from rats treated with peroxisome proliferators. *Biochemical and biophysical research communications*. 173:855-861.
- Choo, H.J., J.H. Kim, O.B. Kwon, C.S. Lee, J.Y. Mun, S.S. Han, Y.S. Yoon, G. Yoon, K.M. Choi, and Y.G. Ko. 2006. Mitochondria are impaired in the adipocytes of type 2 diabetic mice. *Diabetologia*. 49:784-791.
- Chu, R., U. Varanasi, S. Chu, Y. Lin, N. Usuda, M.S. Rao, and J.K. Reddy. 1995. Overexpression and characterization of the human peroxisomal acyl-CoA oxidase in insect cells. *The Journal of biological chemistry*. 270:4908-4915.
- Clayton, D.A. 2000. Vertebrate mitochondrial DNA-a circle of surprises. *Experimental cell research*. 255:4-9.
- Clostre, F. 2001. [Mitochondria: recent pathophysiological discoveries and new therapeutic perspectives]. *Annales pharmaceutiques francaises*. 59:3-21.
- Coe, N.R., A.J. Smith, B.I. Frohnert, P.A. Watkins, and D.A. Bernlohr. 1999. The fatty acid transport protein (FATP1) is a very long chain acyl-CoA synthetase. *The Journal of biological chemistry*. 274:36300-36304.
- Cooper, T.G., and H. Beevers. 1969. Beta oxidation in glyoxysomes from castor bean endosperm. *The Journal of biological chemistry*. 244:3514-3520.
- Coste, A., J.F. Louet, M. Lagouge, C. Lerin, M.C. Antal, H. Meziane, K. Schoonjans, P. Puigserver, B.W. O'Malley, and J. Auwerx. 2008. The genetic ablation of SRC-3 protects against obesity and improves insulin sensitivity by reducing the acetylation of PGC-1{alpha}. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 105:17187-17192.
- Dairaghi, D.J., G.S. Shadel, and D.A. Clayton. 1995. Addition of a 29 residue carboxyl-terminal tail converts a simple HMG box-containing protein into a transcriptional activator. *Journal of molecular biology*. 249:11-28.
- De Duve, C., and P. Baudhuin. 1966. Peroxisomes (microbodies and related particles). *Physiological reviews*. 46:323-357.
- Delille, H.K., and M. Schrader. 2008. Targeting of hFis1 to peroxisomes is mediated by Pex19p. *The Journal of biological chemistry*. 283:31107-31115.
- Demeilliers, C., C. Maisonneuve, A. Grodet, A. Mansouri, R. Nguyen, M. Tinel, P. Letteron, C. Degott, G. Feldmann, D. Pessayre, and B. Fromenty. 2002. Impaired adaptive resynthesis and prolonged depletion of hepatic mitochondrial DNA after repeated alcohol binges in mice. *Gastroenterology*. 123:1278-1290.
- Desvergne, B., L. Michalik, and W. Wahli. 2006. Transcriptional regulation of metabolism. *Physiological reviews*. 86:465-514.

- Dieuaide-Noubhani, M., S. Asselberghs, G.P. Mannaerts, and P.P. Van Veldhoven. 1997a. Evidence that multifunctional protein 2, and not multifunctional protein 1, is involved in the peroxisomal beta-oxidation of pristanic acid. *The Biochemical journal*. 325 (Pt 2):367-373.
- Dieuaide-Noubhani, M., D. Novikov, E. Baumgart, J.C. Vanhooren, M. Fransen, M. Goethals, J. Vandekerckhove, P.P. Van Veldhoven, and G.P. Mannaerts. 1996. Further characterization of the peroxisomal 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenases from rat liver. Relationship between the different dehydrogenases and evidence that fatty acids and the C27 bile acids di- and tri-hydroxycoprostanic acids are metabolized by separate multifunctional proteins. *European journal of biochemistry / FEBS*. 240:660-666.
- Dieuaide-Noubhani, M., D. Novikov, J. Vandekerckhove, P.P. Veldhoven, and G.P. Mannaerts. 1997b. Identification and characterization of the 2-enoyl-CoA hydratases involved in peroxisomal beta-oxidation in rat liver. *The Biochemical journal*. 321 (Pt 1):253-259.
- Dirkx, R., I. Vanhorebeek, K. Martens, A. Schad, M. Grabenbauer, D. Fahimi, P. Declercq, P.P. Van Veldhoven, and M. Baes. 2005. Absence of peroxisomes in mouse hepatocytes causes mitochondrial and ER abnormalities. *Hepatology*. 41:868-878.
- DiRusso, C.C., H. Li, D. Darwis, P.A. Watkins, J. Berger, and P.N. Black. 2005. Comparative biochemical studies of the murine fatty acid transport proteins (FATP) expressed in yeast. *The Journal of biological chemistry*. 280:16829-16837.
- Dubois-Dalcq, M., V. Feigenbaum, and P. Aubourg. 1999. The neurobiology of X-linked adrenoleukodystrophy, a demyelinating peroxisomal disorder. *Trends in neurosciences*. 22:4-12.
- Dubuisson, M., D. Vander Stricht, A. Clippe, F. Etienne, T. Nauser, R. Kissner, W.H. Koppenol, J.F. Rees, and B. Knoops. 2004. Human peroxiredoxin 5 is a peroxynitrite reductase. *FEBS letters*. 571:161-165.
- Eckert, J.H., and R. Erdmann. 2003. Peroxisome biogenesis. *Reviews of physiology, biochemistry and pharmacology*. 147:75-121.
- Eichler, F., and K. Van Haren. 2007. Immune response in leukodystrophies. *Pediatric neurology*. 37:235-244.
- Eichler, F.S., J.Q. Ren, M. Cossoy, A.M. Rietsch, S. Nagpal, A.B. Moser, M.P. Frosch, and R.M. Ransohoff. 2008. Is microglial apoptosis an early pathogenic change in cerebral X-linked adrenoleukodystrophy? *Annals of neurology*. 63:729-742.
- El Kebbaj, Z., P. Andreoletti, D. Mountassif, M. Kabine, H. Schohn, M. Dauca, N. Latruffe, M.S. El Kebbaj, and M. Cherkaoui-Malki. 2009. Differential regulation of peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)-alpha1 and truncated PPARalpha2 as an adaptive response to fasting in the control of hepatic peroxisomal fatty acid beta-oxidation in the hibernating mammal. *Endocrinology*. 150:1192-1201.
- Erdmann, R., and W. Schliebs. 2005. Peroxisomal matrix protein import: the transient pore model. *Nature reviews. Molecular cell biology*. 6:738-742.
- Evans, M.J., and R.C. Scarpulla. 1989. Interaction of nuclear factors with multiple sites in the somatic cytochrome c promoter. Characterization of upstream NRF-1, ATF, and intron Sp1 recognition sequences. *The Journal of biological chemistry*. 264:14361-14368.
- Evans, M.J., and R.C. Scarpulla. 1990. NRF-1: a trans-activator of nuclear-encoded respiratory genes in animal cells. *Genes & development*. 4:1023-1034.

- Factor, V.M., A. Kiss, J.T. Woitach, P.J. Wirth, and S.S. Thorgeirsson. 1998. Disruption of redox homeostasis in the transforming growth factor- α /c-myc transgenic mouse model of accelerated hepatocarcinogenesis. *The Journal of biological chemistry*. 273:15846-15853.
- Fagarasanu, A., M. Fagarasanu, and R.A. Rachubinski. 2007. Maintaining peroxisome populations: a story of division and inheritance. *Annual review of cell and developmental biology*. 23:321-344.
- Fahimi, H.D. 1968. Cytochemical localization of peroxidase activity in rat hepatic microbodies (peroxisomes). *The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society*. 16:547-550.
- Fahimi, H.D. 1969. Cytochemical localization of peroxidatic activity of catalase in rat hepatic microbodies (peroxisomes). *The Journal of cell biology*. 43:275-288.
- Falkenberg, M., M. Gaspari, A. Rantanen, A. Trifunovic, N.G. Larsson, and C.M. Gustafsson. 2002. Mitochondrial transcription factors B1 and B2 activate transcription of human mtDNA. *Nature genetics*. 31:289-294.
- Fan, C.Y., J. Pan, R. Chu, D. Lee, K.D. Kluckman, N. Usuda, I. Singh, A.V. Yeldandi, M.S. Rao, N. Maeda, and J.K. Reddy. 1996a. Hepatocellular and hepatic peroxisomal alterations in mice with a disrupted peroxisomal fatty acyl-coenzyme A oxidase gene. *The Journal of biological chemistry*. 271:24698-24710.
- Fan, C.Y., J. Pan, R. Chu, D. Lee, K.D. Kluckman, N. Usuda, I. Singh, A.V. Yeldandi, M.S. Rao, N. Maeda, and J.K. Reddy. 1996b. Targeted disruption of the peroxisomal fatty acyl-CoA oxidase gene: generation of a mouse model of pseudoneonatal adrenoleukodystrophy. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 804:530-541.
- Fan, C.Y., J. Pan, N. Usuda, A.V. Yeldandi, M.S. Rao, and J.K. Reddy. 1998. Steatohepatitis, spontaneous peroxisome proliferation and liver tumors in mice lacking peroxisomal fatty acyl-CoA oxidase. Implications for peroxisome proliferator-activated receptor α natural ligand metabolism. *The Journal of biological chemistry*. 273:15639-15645.
- Fan, M., J. Rhee, J. St-Pierre, C. Handschin, P. Puigserver, J. Lin, S. Jaeger, H. Erdjument-Bromage, P. Tempst, and B.M. Spiegelman. 2004. Suppression of mitochondrial respiration through recruitment of p160 myb binding protein to PGC-1 α : modulation by p38 MAPK. *Genes & development*. 18:278-289.
- Fang, Y., J.C. Morrell, J.M. Jones, and S.J. Gould. 2004. PEX3 functions as a PEX19 docking factor in the import of class I peroxisomal membrane proteins. *The Journal of cell biology*. 164:863-875.
- Ferdinandusse, S., S. Barker, K. Lachlan, M. Duran, H.R. Waterham, R.J. Wanders, and S. Hammans. 2010. Adult peroxisomal acyl-coenzyme A oxidase deficiency with cerebellar and brainstem atrophy. *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry*. 81:310-312.
- Ferdinandusse, S., S. Denis, P.T. Clayton, A. Graham, J.E. Rees, J.T. Allen, B.N. McLean, A.Y. Brown, P. Vreken, H.R. Waterham, and R.J. Wanders. 2000. Mutations in the gene encoding peroxisomal α -methylacyl-CoA racemase cause adult-onset sensory motor neuropathy. *Nature genetics*. 24:188-191.
- Ferdinandusse, S., S. Denis, P.L. Faust, and R.J. Wanders. 2009. Bile acids: the role of peroxisomes. *Journal of lipid research*. 50:2139-2147.
- Ferdinandusse, S., S. Denis, E.M. Hogenhout, J. Koster, C.W. van Roermund, I.J. L. A.B. Moser, R.J. Wanders, and H.R. Waterham. 2007. Clinical, biochemical, and mutational spectrum of peroxisomal acyl-coenzyme A oxidase deficiency. *Human mutation*. 28:904-912.
- Ferdinandusse, S., S. Denis, P.A. Mooijer, Z. Zhang, J.K. Reddy, A.A. Spector, and R.J. Wanders. 2001. Identification of the peroxisomal β -oxidation enzymes involved in the biosynthesis of docosahexaenoic acid. *Journal of lipid research*. 42:1987-1995.

Ferdinandusse, S., S. Denis, P.A. Mooyer, C. Dekker, M. Duran, R.J. Soorani-Luning, E. Boltshauser, A. Macaya, J. Gartner, C.B. Majoie, P.G. Barth, R.J. Wanders, and B.T. Poll-The. 2006. Clinical and biochemical spectrum of D-bifunctional protein deficiency. *Annals of neurology*. 59:92-104.

Ferdinandusse, S., S. Denis, C.W. Van Roermund, R.J. Wanders, and G. Dacremont. 2004. Identification of the peroxisomal beta-oxidation enzymes involved in the degradation of long-chain dicarboxylic acids. *Journal of lipid research*. 45:1104-1111.

Ferdinandusse, S., B. Finckh, Y.C. de Hingh, L.E. Stroomer, S. Denis, A. Kohlschutter, and R.J. Wanders. 2003. Evidence for increased oxidative stress in peroxisomal D-bifunctional protein deficiency. *Molecular genetics and metabolism*. 79:281-287.

Ferdinandusse, S., and S.M. Houten. 2006. Peroxisomes and bile acid biosynthesis. *Biochimica et biophysica acta*. 1763:1427-1440.

Ferdinandusse, S., T. Meissner, R.J. Wanders, and E. Mayatepek. 2002. Identification of the peroxisomal beta-oxidation enzymes involved in the degradation of leukotrienes. *Biochemical and biophysical research communications*. 293:269-273.

Ferdinandusse, S., J. Mulders, I.J. L. S. Denis, G. Dacremont, H.R. Waterham, and R.J. Wanders. 1999. Molecular cloning and expression of human carnitine octanoyltransferase: evidence for its role in the peroxisomal beta-oxidation of branched-chain fatty acids. *Biochem Biophys Res Commun*. 263:213-218.

Fernandez-Marcos, P.J., and J. Auwerx. 2011. Regulation of PGC-1alpha, a nodal regulator of mitochondrial biogenesis. *The American journal of clinical nutrition*. 93:884S-890.

Fernandez-Silva, P., F. Martinez-Azorin, V. Micol, and G. Attardi. 1997. The human mitochondrial transcription termination factor (mTERF) is a multizipper protein but binds to DNA as a monomer, with evidence pointing to intramolecular leucine zipper interactions. *The EMBO journal*. 16:1066-1079.

Ferrer, I., J.P. Kapfhammer, C. Hindelang, S. Kemp, N. Troffer-Charlier, V. Broccoli, N. Callyzot, P. Mooyer, J. Selhorst, P. Vreken, R.J. Wanders, J.L. Mandel, and A. Pujol. 2005. Inactivation of the peroxisomal ABCD2 transporter in the mouse leads to late-onset ataxia involving mitochondria, Golgi and endoplasmic reticulum damage. *Human molecular genetics*. 14:3565-3577.

Fisher, R.P., and D.A. Clayton. 1985. A transcription factor required for promoter recognition by human mitochondrial RNA polymerase. Accurate initiation at the heavy- and light-strand promoters dissected and reconstituted in vitro. *The Journal of biological chemistry*. 260:11330-11338.

Fisher, R.P., and D.A. Clayton. 1988. Purification and characterization of human mitochondrial transcription factor 1. *Molecular and cellular biology*. 8:3496-3509.

Fleischer, S., and M. Kervina. 1974. Long-term preservation of liver for subcellular fractionation. *Methods in enzymology*. 31:3-6.

Fournier, B., J.M. Saudubray, B. Benichou, S. Lyonnet, A. Munnich, H. Clevers, and B.T. Poll-The. 1994. Large deletion of the peroxisomal acyl-CoA oxidase gene in pseudoneonatal adrenoleukodystrophy. *The Journal of clinical investigation*. 94:526-531.

Foxworthy, P.S., S.L. White, D.M. Hoover, and P.I. Eacho. 1990. Effect of ciprofibrate, bezafibrate, and LY171883 on peroxisomal beta-oxidation in cultured rat, dog, and rhesus monkey hepatocytes. *Toxicology and applied pharmacology*. 104:386-394.

- Frank, S., B. Gaume, E.S. Bergmann-Leitner, W.W. Leitner, E.G. Robert, F. Catez, C.L. Smith, and R.J. Youle. 2001. The role of dynamin-related protein 1, a mediator of mitochondrial fission, in apoptosis. *Developmental cell*. 1:515-525.
- Funato, M., N. Shimozawa, T. Nagase, Y. Takemoto, Y. Suzuki, Y. Imamura, T. Matsumoto, T. Tsukamoto, T. Kojidani, T. Osumi, T. Fukao, and N. Kondo. 2006. Aberrant peroxisome morphology in peroxisomal beta-oxidation enzyme deficiencies. *Brain & development*. 28:287-292.
- Garcia-Ruiz, C., A. Colell, A. Morales, N. Kaplowitz, and J.C. Fernandez-Checa. 1995. Role of oxidative stress generated from the mitochondrial electron transport chain and mitochondrial glutathione status in loss of mitochondrial function and activation of transcription factor nuclear factor-kappa B: studies with isolated mitochondria and rat hepatocytes. *Molecular pharmacology*. 48:825-834.
- Gaspari, M., M. Falkenberg, N.G. Larsson, and C.M. Gustafsson. 2004. The mitochondrial RNA polymerase contributes critically to promoter specificity in mammalian cells. *The EMBO journal*. 23:4606-4614.
- Genin, E.C., F. Geillon, C. Gondcaille, A. Athias, P. Gambert, D. Trompier, and S. Savary. 2011. Substrate specificity overlap and interaction between adrenoleukodystrophy protein (ALDP/ABCD1) and adrenoleukodystrophy-related protein (ALDRP/ABCD2). *The Journal of biological chemistry*. 286:8075-8084.
- Geuze, H.J., J.L. Murk, A.K. Stroobants, J.M. Griffith, M.J. Kleijmeer, A.J. Koster, A.J. Verkleij, B. Distel, and H.F. Tabak. 2003. Involvement of the endoplasmic reticulum in peroxisome formation. *Molecular biology of the cell*. 14:2900-2907.
- Glatz, J.F., and J. Storch. 2001. Unravelling the significance of cellular fatty acid-binding proteins. *Current opinion in lipidology*. 12:267-274.
- Gleyzer, N., K. Vercauteren, and R.C. Scarpulla. 2005. Control of mitochondrial transcription specificity factors (TFB1M and TFB2M) by nuclear respiratory factors (NRF-1 and NRF-2) and PGC-1 family coactivators. *Molecular and cellular biology*. 25:1354-1366.
- Goldfischer, S., C.L. Moore, A.B. Johnson, A.J. Spiro, M.P. Valsamis, H.K. Wisniewski, R.H. Ritch, W.T. Norton, I. Rapin, and L.M. Gartner. 1973. Peroxisomal and mitochondrial defects in the cerebro-hepato-renal syndrome. *Science*. 182:62-64.
- Goldstein, J.L., R.A. DeBose-Boyd, and M.S. Brown. 2006. Protein sensors for membrane sterols. *Cell*. 124:35-46.
- Gondcaille, C., M. Depreter, S. Fourcade, M.R. Lecca, S. Leclercq, P.G. Martin, T. Pineau, F. Cadepond, M. ElEtr, N. Bertrand, A. Beley, S. Duclos, D. De Craemer, F. Roels, S. Savary, and M. Bugaut. 2005. Phenylbutyrate up-regulates the adrenoleukodystrophy-related gene as a nonclassical peroxisome proliferator. *The Journal of cell biology*. 169:93-104.
- Gould, S.J., G.A. Keller, N. Hosken, J. Wilkinson, and S. Subramani. 1989. A conserved tripeptide sorts proteins to peroxisomes. *The Journal of cell biology*. 108:1657-1664.
- Gould, S.J., and D. Valle. 2000. Peroxisome biogenesis disorders: genetics and cell biology. *Trends in genetics : TIG*. 16:340-345.
- Griparic, L., N.N. van der Wel, I.J. Orozco, P.J. Peters, and A.M. van der Blik. 2004. Loss of the intermembrane space protein Mgm1/OPA1 induces swelling and localized constrictions along the lengths of mitochondria. *The Journal of biological chemistry*. 279:18792-18798.

- Ha, J., S. Daniel, S.S. Broyles, and K.H. Kim. 1994. Critical phosphorylation sites for acetyl-CoA carboxylase activity. *The Journal of biological chemistry*. 269:22162-22168.
- Hardie, D.G., and D.A. Pan. 2002. Regulation of fatty acid synthesis and oxidation by the AMP-activated protein kinase. *Biochemical Society transactions*. 30:1064-1070.
- Hashimoto, T. 1996. Peroxisomal beta-oxidation: enzymology and molecular biology. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 804:86-98.
- Hashimoto, T. 1999. Peroxisomal beta-oxidation enzymes. *Neurochemical research*. 24:551-563.
- Hashimoto, T. 2000. Peroxisomal beta-oxidation enzymes. *Cell biochemistry and biophysics*. 32 Spring:63-72.
- Hashimoto, T., T. Fujita, N. Usuda, W. Cook, C. Qi, J.M. Peters, F.J. Gonzalez, A.V. Yeldandi, M.S. Rao, and J.K. Reddy. 1999. Peroxisomal and mitochondrial fatty acid beta-oxidation in mice nullizygous for both peroxisome proliferator-activated receptor alpha and peroxisomal fatty acyl-CoA oxidase. Genotype correlation with fatty liver phenotype. *The Journal of biological chemistry*. 274:19228-19236.
- Heiland, I., and R. Erdmann. 2005. Biogenesis of peroxisomes. Topogenesis of the peroxisomal membrane and matrix proteins. *The FEBS journal*. 272:2362-2372.
- Ho, J.K., H. Moser, Y. Kishimoto, and J.A. Hamilton. 1995. Interactions of a very long chain fatty acid with model membranes and serum albumin. Implications for the pathogenesis of adrenoleukodystrophy. *The Journal of clinical investigation*. 96:1455-1463.
- Hodge, V.J., S.J. Gould, S. Subramani, H.W. Moser, and S.K. Krisans. 1991. Normal cholesterol synthesis in human cells requires functional peroxisomes. *Biochemical and biophysical research communications*. 181:537-541.
- Hoefler, G., M. Forstner, M.C. McGuinness, W. Hulla, M. Hiden, P. Krisper, L. Kenner, T. Ried, C. Lengauer, R. Zechner, and et al. 1994. cDNA cloning of the human peroxisomal enoyl-CoA hydratase: 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase bifunctional enzyme and localization to chromosome 3q26.3-3q28: a free left Alu Arm is inserted in the 3' noncoding region. *Genomics*. 19:60-67.
- Hoepfner, D., D. Schildknecht, I. Braakman, P. Philippsen, and H.F. Tabak. 2005. Contribution of the endoplasmic reticulum to peroxisome formation. *Cell*. 122:85-95.
- Hoepfner, D., M. van den Berg, P. Philippsen, H.F. Tabak, and E.H. Hettema. 2001. A role for Vps1p, actin, and the Myo2p motor in peroxisome abundance and inheritance in *Saccharomyces cerevisiae*. *The Journal of cell biology*. 155:979-990.
- Hogenboom, S., G.J. Romeijn, S.M. Houten, M. Baes, R.J. Wanders, and H.R. Waterham. 2002. Absence of functional peroxisomes does not lead to deficiency of enzymes involved in cholesterol biosynthesis. *Journal of lipid research*. 43:90-98.
- Hogenboom, S., J.J. Tuijp, M. Espeel, J. Koster, R.J. Wanders, and H.R. Waterham. 2004. Mevalonate kinase is a cytosolic enzyme in humans. *Journal of cell science*. 117:631-639.
- Holroyd, C., and R. Erdmann. 2001. Protein translocation machineries of peroxisomes. *FEBS letters*. 501:6-10.
- Horton, J.D., N.A. Shah, J.A. Warrington, N.N. Anderson, S.W. Park, M.S. Brown, and J.L. Goldstein. 2003. Combined analysis of oligonucleotide microarray data from transgenic and knockout mice identifies direct SREBP target genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 100:12027-12032.

- Horvat, S., J. McWhir, and D. Rozman. 2011. Defects in cholesterol synthesis genes in mouse and in humans: lessons for drug development and safer treatments. *Drug metabolism reviews*. 43:69-90.
- Hovik, R., B. Brodal, K. Bartlett, and H. Osmundsen. 1991. Metabolism of acetyl-CoA by isolated peroxisomal fractions: formation of acetate and acetoacetyl-CoA. *Journal of lipid research*. 32:993-999.
- Hruban, Z., E.L. Vigil, A. Slesers, and E. Hopkins. 1972. Microbodies: constituent organelles of animal cells. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology*. 27:184-191.
- Hruszkewycz, A.M., and D.S. Bergtold. 1990. The 8-hydroxyguanine content of isolated mitochondria increases with lipid peroxidation. *Mutation research*. 244:123-128.
- Huang, J., N. Viswakarma, S. Yu, Y. Jia, L. Bai, A. Vluggens, M. Cherkaoui-Malki, M. Khan, I. Singh, G. Yang, M.S. Rao, J. Borensztajn, and J.K. Reddy. 2011. Progressive endoplasmic reticulum stress contributes to hepatocarcinogenesis in fatty acyl-CoA oxidase 1-deficient mice. *The American journal of pathology*. 179:703-713.
- Hughes, J.L., A. Poulos, E. Robertson, C.W. Chow, L.J. Sheffield, J. Christodoulou, and R.F. Carter. 1990. Pathology of hepatic peroxisomes and mitochondria in patients with peroxisomal disorders. *Virchows Archiv. A, Pathological anatomy and histopathology*. 416:255-264.
- Hulshagen, L., O. Krysko, A. Bottelbergs, S. Huyghe, R. Klein, P.P. Van Veldhoven, P.P. De Deyn, R. D'Hooge, D. Hartmann, and M. Baes. 2008. Absence of functional peroxisomes from mouse CNS causes dysmyelination and axon degeneration. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 28:4015-4027.
- Hunt, M.C., and S.E. Alexson. 2008. Novel functions of acyl-CoA thioesterases and acyltransferases as auxiliary enzymes in peroxisomal lipid metabolism. *Progress in lipid research*. 47:405-421.
- Huyghe, S., G.P. Mannaerts, M. Baes, and P.P. Van Veldhoven. 2006. Peroxisomal multifunctional protein-2: the enzyme, the patients and the knockout mouse model. *Biochimica et biophysica acta*. 1761:973-994.
- Inestrosa, N.C., M. Bronfman, and F. Leighton. 1979. Detection of peroxisomal fatty acyl-coenzyme A oxidase activity. *The Biochemical journal*. 182:779-788.
- Ito, M., B.M. Blumberg, D.J. Mock, A.D. Goodman, A.B. Moser, H.W. Moser, K.D. Smith, and J.M. Powers. 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. *Journal of neuropathology and experimental neurology*. 60:1004-1019.
- Jager, S., C. Handschin, J. St-Pierre, and B.M. Spiegelman. 2007. AMP-activated protein kinase (AMPK) action in skeletal muscle via direct phosphorylation of PGC-1alpha. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 104:12017-12022.
- James, A.M., Y.H. Wei, C.Y. Pang, and M.P. Murphy. 1996. Altered mitochondrial function in fibroblasts containing MELAS or MERRF mitochondrial DNA mutations. *The Biochemical journal*. 318 (Pt 2):401-407.
- Jeninga, E.H., K. Schoonjans, and J. Auwerx. 2010. Reversible acetylation of PGC-1: connecting energy sensors and effectors to guarantee metabolic flexibility. *Oncogene*. 29:4617-4624.
- Jezek, P., and L. Hlavata. 2005. Mitochondria in homeostasis of reactive oxygen species in cell, tissues, and organism. *The international journal of biochemistry & cell biology*. 37:2478-2503.

- Jia, Y., C. Qi, Z. Zhang, T. Hashimoto, M.S. Rao, S. Huyghe, Y. Suzuki, P.P. Van Veldhoven, M. Baes, and J.K. Reddy. 2003. Overexpression of peroxisome proliferator-activated receptor-alpha (PPARalpha)-regulated genes in liver in the absence of peroxisome proliferation in mice deficient in both L- and D-forms of enoyl-CoA hydratase/dehydrogenase enzymes of peroxisomal beta-oxidation system. *The Journal of biological chemistry*. 278:47232-47239.
- Jia, Z., Z. Pei, Y. Li, L. Wei, K.D. Smith, and P.A. Watkins. 2004. X-linked adrenoleukodystrophy: role of very long-chain acyl-CoA synthetases. *Molecular genetics and metabolism*. 83:117-127.
- Jiang, L.L., A. Kobayashi, H. Matsuura, H. Fukushima, and T. Hashimoto. 1996. Purification and properties of human D-3-hydroxyacyl-CoA dehydratase: medium-chain enoyl-CoA hydratase is D-3-hydroxyacyl-CoA dehydratase. *Journal of biochemistry*. 120:624-632.
- Jiang, L.L., T. Kurosawa, M. Sato, Y. Suzuki, and T. Hashimoto. 1997. Physiological role of D-3-hydroxyacyl-CoA dehydratase/D-3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase bifunctional protein. *Journal of biochemistry*. 121:506-513.
- Jun, D.W., W.K. Cho, J.H. Jun, H.J. Kwon, K.S. Jang, H.J. Kim, H.J. Jeon, K.N. Lee, H.L. Lee, O.Y. Lee, B.C. Yoon, H.S. Choi, J.S. Hahm, and M.H. Lee. 2011. Prevention of free fatty acid-induced hepatic lipotoxicity by carnitine via reversal of mitochondrial dysfunction. *Liver international : official journal of the International Association for the Study of the Liver*. 31:1315-1324.
- Kadowaki, T., and T. Yamauchi. 2005. Adiponectin and adiponectin receptors. *Endocrine reviews*. 26:439-451.
- Kang, D., S.H. Kim, and N. Hamasaki. 2007. Mitochondrial transcription factor A (TFAM): roles in maintenance of mtDNA and cellular functions. *Mitochondrion*. 7:39-44.
- Keller, G.A., M.C. Barton, D.J. Shapiro, and S.J. Singer. 1985. 3-Hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase is present in peroxisomes in normal rat liver cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 82:770-774.
- Keller, G.A., M. Pazirandeh, and S. Krisans. 1986. 3-Hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase localization in rat liver peroxisomes and microsomes of control and cholestyramine-treated animals: quantitative biochemical and immunoelectron microscopical analyses. *The Journal of cell biology*. 103:875-886.
- Kelly, T.J., C. Lerin, W. Haas, S.P. Gygi, and P. Puigserver. 2009. GCN5-mediated transcriptional control of the metabolic coactivator PGC-1beta through lysine acetylation. *The Journal of biological chemistry*. 284:19945-19952.
- Kerner, J., and C. Hoppel. 2000. Fatty acid import into mitochondria. *Biochimica et biophysica acta*. 1486:1-17.
- Kim, K.H. 1979. Control of acetyl-CoA carboxylase by covalent modification. *Molecular and cellular biochemistry*. 28:27-43.
- Kim, P.K., R.T. Mullen, U. Schumann, and J. Lippincott-Schwartz. 2006. The origin and maintenance of mammalian peroxisomes involves a de novo PEX16-dependent pathway from the ER. *The Journal of cell biology*. 173:521-532.
- Kimura, S., J.P. Hardwick, C.A. Kozak, and F.J. Gonzalez. 1989. The rat clofibrate-inducible CYP4A subfamily. II. cDNA sequence of IVA3, mapping of the Cyp4a locus to mouse chromosome 4, and coordinate and tissue-specific regulation of the CYP4A genes. *DNA*. 8:517-525.
- Knutti, D., and A. Kralli. 2001. PGC-1, a versatile coactivator. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM*. 12:360-365.

- Kovacs, W.J., L.M. Olivier, and S.K. Krisans. 2002. Central role of peroxisomes in isoprenoid biosynthesis. *Progress in lipid research*. 41:369-391.
- Kovacs, W.J., J.E. Shackelford, K.N. Tape, M.J. Richards, P.L. Faust, S.J. Fliesler, and S.K. Krisans. 2004. Disturbed cholesterol homeostasis in a peroxisome-deficient PEX2 knockout mouse model. *Molecular and cellular biology*. 24:1-13.
- Kovacs, W.J., K.N. Tape, J.E. Shackelford, X. Duan, T. Kasumov, J.K. Kelleher, H. Brunengraber, and S.K. Krisans. 2007. Localization of the pre-squalene segment of the isoprenoid biosynthetic pathway in mammalian peroxisomes. *Histochemistry and cell biology*. 127:273-290.
- Kovacs, W.J., K.N. Tape, J.E. Shackelford, T.M. Wikander, M.J. Richards, S.J. Fliesler, S.K. Krisans, and P.L. Faust. 2009. Peroxisome deficiency causes a complex phenotype because of hepatic SREBP/Insig dysregulation associated with endoplasmic reticulum stress. *The Journal of biological chemistry*. 284:7232-7245.
- Krisans, S.K., J. Ericsson, P.A. Edwards, and G.A. Keller. 1994. Farnesyl-diphosphate synthase is localized in peroxisomes. *The Journal of biological chemistry*. 269:14165-14169.
- Kunau, W.H. 2005. Peroxisome biogenesis: end of the debate. *Current biology : CB*. 15:R774-776.
- Kurian, M.A., S. Ryan, G.T. Besley, R.J. Wanders, and M.D. King. 2004. Straight-chain acyl-CoA oxidase deficiency presenting with dysmorphia, neurodevelopmental autistic-type regression and a selective pattern of leukodystrophy. *Journal of inherited metabolic disease*. 27:105-108.
- Lake, B.G., and T.J. Gray. 1985. Species differences in hepatic peroxisome proliferation. *Biochemical Society transactions*. 13:859-861.
- Lamhonwah, A.M., C.A. Ackerley, A. Tilups, V.D. Edwards, R.J. Wanders, and I. Tein. 2005. OCTN3 is a mammalian peroxisomal membrane carnitine transporter. *Biochem Biophys Res Commun*. 338:1966-1972.
- Lancaster, C.R. 2002. Succinate:quinone oxidoreductases: an overview. *Biochimica et biophysica acta*. 1553:1-6.
- Lazarow, P.B., and C. De Duve. 1976. A fatty acyl-CoA oxidizing system in rat liver peroxisomes; enhancement by clofibrate, a hypolipidemic drug. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 73:2043-2046.
- Lazarow, P.B., and Y. Fujiki. 1985. Biogenesis of peroxisomes. *Annual review of cell biology*. 1:489-530.
- Lee, Y.J., S.Y. Jeong, M. Karbowski, C.L. Smith, and R.J. Youle. 2004. Roles of the mammalian mitochondrial fission and fusion mediators Fis1, Drp1, and Opa1 in apoptosis. *Molecular biology of the cell*. 15:5001-5011.
- Leenders, F., V. Dolez, A. Begue, G. Moller, J.C. Gloeckner, Y. de Launoit, and J. Adamski. 1998. Structure of the gene for the human 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase type IV. *Mammalian genome : official journal of the International Mammalian Genome Society*. 9:1036-1041.
- Lehman, J.J., P.M. Barger, A. Kovacs, J.E. Saffitz, D.M. Medeiros, and D.P. Kelly. 2000. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator-1 promotes cardiac mitochondrial biogenesis. *The Journal of clinical investigation*. 106:847-856.
- Lenka, N., C. Vijayasarathy, J. Mullick, and N.G. Avadhani. 1998. Structural organization and transcription regulation of nuclear genes encoding the mammalian cytochrome c oxidase complex. *Progress in nucleic acid research and molecular biology*. 61:309-344.

- Lerin, C., J.T. Rodgers, D.E. Kalume, S.H. Kim, A. Pandey, and P. Puigserver. 2006. GCN5 acetyltransferase complex controls glucose metabolism through transcriptional repression of PGC-1 α . *Cell metabolism*. 3:429-438.
- Li, W., M.H. Bengtson, A. Ulbrich, A. Matsuda, V.A. Reddy, A. Orth, S.K. Chanda, S. Batalov, and C.A. Joazeiro. 2008. Genome-wide and functional annotation of human E3 ubiquitin ligases identifies MULAN, a mitochondrial E3 that regulates the organelle's dynamics and signaling. *PLoS one*. 3:e1487.
- Li, X., E. Baumgart, G.X. Dong, J.C. Morrell, G. Jimenez-Sanchez, D. Valle, K.D. Smith, and S.J. Gould. 2002. PEX11 α is required for peroxisome proliferation in response to 4-phenylbutyrate but is dispensable for peroxisome proliferator-activated receptor α -mediated peroxisome proliferation. *Molecular and cellular biology*. 22:8226-8240.
- Lim, J.H., J.I. Lee, Y.H. Suh, W. Kim, J.H. Song, and M.H. Jung. 2006. Mitochondrial dysfunction induces aberrant insulin signalling and glucose utilisation in murine C2C12 myotube cells. *Diabetologia*. 49:1924-1936.
- Lin, J., H. Wu, P.T. Tarr, C.Y. Zhang, Z. Wu, O. Boss, L.F. Michael, P. Puigserver, E. Isotani, E.N. Olson, B.B. Lowell, R. Bassel-Duby, and B.M. Spiegelman. 2002. Transcriptional co-activator PGC-1 α drives the formation of slow-twitch muscle fibres. *Nature*. 418:797-801.
- Livak, K.J., and T.D. Schmittgen. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻($\Delta\Delta C_T$) Method. *Methods*. 25:402-408.
- Lustig, Y., J.L. Ruas, J.L. Estall, J.C. Lo, S. Devarakonda, D. Laznik, J.H. Choi, H. Ono, J.V. Olsen, and B.M. Spiegelman. 2011. Separation of the gluconeogenic and mitochondrial functions of PGC-1 α through S6 kinase. *Genes & development*. 25:1232-1244.
- Malle, E., K. Oettl, W. Sattler, G. Hoefler, and G.M. Kostner. 1995. Cholesterol biosynthesis in dermal fibroblasts from patients with metabolic disorders of peroxisomal origin. *European journal of clinical investigation*. 25:59-67.
- Mandel, H., M. Getsis, M. Rosenblat, M. Berant, and M. Aviram. 1995. Reduced cellular cholesterol content in peroxisome-deficient fibroblasts is associated with impaired uptake of the patient's low density lipoprotein and with reduced cholesterol synthesis. *Journal of lipid research*. 36:1385-1391.
- Mannaerts, G.P., and L.J. Debeer. 1982. Mitochondrial and peroxisomal beta-oxidation of fatty acids in rat liver. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 386:30-39.
- Mannaerts, G.P., and P.P. van Veldhoven. 1996. Functions and organization of peroxisomal beta-oxidation. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 804:99-115.
- Marsin, A.S., L. Bertrand, M.H. Rider, J. Deprez, C. Beauloye, M.F. Vincent, G. Van den Berghe, D. Carling, and L. Hue. 2000. Phosphorylation and activation of heart PFK-2 by AMPK has a role in the stimulation of glycolysis during ischaemia. *Current biology : CB*. 10:1247-1255.
- Martens, K., E. Ver Loren van Themaat, M.F. van Batenburg, M. Heinaniemi, S. Huyghe, P. Van Hummelen, C. Carlberg, P.P. Van Veldhoven, A. Van Kampen, and M. Baes. 2008. Coordinate induction of PPAR α and SREBP2 in multifunctional protein 2 deficient mice. *Biochimica et biophysica acta*. 1781:694-702.
- Masters, B.S., L.L. Stohl, and D.A. Clayton. 1987. Yeast mitochondrial RNA polymerase is homologous to those encoded by bacteriophages T3 and T7. *Cell*. 51:89-99.
- Matsubara, Y., J.P. Kraus, T.L. Yang-Feng, U. Francke, L.E. Rosenberg, and K. Tanaka. 1986. Molecular cloning of cDNAs encoding rat and human medium-chain acyl-CoA dehydrogenase and assignment of the gene to human

chromosome 1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 83:6543-6547.

Matsushima, Y., C. Adan, R. Garesse, and L.S. Kaguni. 2005. Drosophila mitochondrial transcription factor B1 modulates mitochondrial translation but not transcription or DNA copy number in Schneider cells. *The Journal of biological chemistry*. 280:16815-16820.

May-Panloup, P., M.F. Chretien, Y. Malthiery, and P. Reynier. 2004. [Mitochondria and reproduction]. *Medecine/Sciences*. 20:779-783.

Mayatepek, E., W.D. Lehmann, J. Fauler, D. Tsikas, J.C. Frolich, R.B. Schutgens, R.J. Wanders, and D. Keppler. 1993. Impaired degradation of leukotrienes in patients with peroxisome deficiency disorders. *The Journal of clinical investigation*. 91:881-888.

McBride, H.M., M. Neuspiel, and S. Wasiak. 2006. Mitochondria: more than just a powerhouse. *Current biology : CB*. 16:R551-560.

McCulloch, V., B.L. Seidel-Rogol, and G.S. Shadel. 2002. A human mitochondrial transcription factor is related to RNA adenine methyltransferases and binds S-adenosylmethionine. *Molecular and cellular biology*. 22:1116-1125.

McCulloch, V., and G.S. Shadel. 2003. Human mitochondrial transcription factor B1 interacts with the C-terminal activation region of h-mtTFA and stimulates transcription independently of its RNA methyltransferase activity. *Molecular and cellular biology*. 23:5816-5824.

McGuinness, M.C., J.F. Lu, H.P. Zhang, G.X. Dong, A.K. Heinzer, P.A. Watkins, J. Powers, and K.D. Smith. 2003. Role of ALDP (ABCD1) and mitochondria in X-linked adrenoleukodystrophy. *Molecular and cellular biology*. 23:744-753.

McGuinness, M.C., J.M. Powers, W.B. Bias, B.J. Schmeckpeper, A.H. Segal, V.C. Gowda, S.L. Wesselingh, J. Berger, D.E. Griffin, and K.D. Smith. 1997. Human leukocyte antigens and cytokine expression in cerebral inflammatory demyelinating lesions of X-linked adrenoleukodystrophy and multiple sclerosis. *Journal of neuroimmunology*. 75:174-182.

Michael, L.F., Z. Wu, R.B. Cheatham, P. Puigserver, G. Adelmant, J.J. Lehman, D.P. Kelly, and B.M. Spiegelman. 2001. Restoration of insulin-sensitive glucose transporter (GLUT4) gene expression in muscle cells by the transcriptional coactivator PGC-1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 98:3820-3825.

Mihalik, S.J., S.J. Steinberg, Z. Pei, J. Park, D.G. Kim, A.K. Heinzer, G. Dacremont, R.J. Wanders, D.A. Cuebas, K.D. Smith, and P.A. Watkins. 2002. Participation of two members of the very long-chain acyl-CoA synthetase family in bile acid synthesis and recycling. *The Journal of biological chemistry*. 277:24771-24779.

Mills, S.E., D.W. Foster, and J.D. McGarry. 1983. Interaction of malonyl-CoA and related compounds with mitochondria from different rat tissues. Relationship between ligand binding and inhibition of carnitine palmitoyltransferase I. *The Biochemical journal*. 214:83-91.

Miyazawa, S., S. Furuta, T. Osumi, T. Hashimoto, and N. Ui. 1981. Properties of peroxisomal 3-ketoacyl-coA thiolase from rat liver. *Journal of biochemistry*. 90:511-519.

Miyazawa, S., H. Hayashi, M. Hijikata, N. Ishii, S. Furuta, H. Kagamiyama, T. Osumi, and T. Hashimoto. 1987. Complete nucleotide sequence of cDNA and predicted amino acid sequence of rat acyl-CoA oxidase. *The Journal of biological chemistry*. 262:8131-8137.

- Miyazawa, S., T. Osumi, and T. Hashimoto. 1980. The presence of a new 3-oxoacyl-CoA thiolase in rat liver peroxisomes. *European journal of biochemistry / FEBS*. 103:589-596.
- Moldovan, L., and N.I. Moldovan. 2004. Oxygen free radicals and redox biology of organelles. *Histochemistry and cell biology*. 122:395-412.
- Moller, G., F. Leenders, E.G. van Grunsven, V. Dolez, B. Qualmann, M.M. Kessels, M. Markus, A. Krazeisen, B. Husen, R.J. Wanders, Y. de Launoit, and J. Adamski. 1999. Characterization of the HSD17B4 gene: D-specific multifunctional protein 2/17beta-hydroxysteroid dehydrogenase IV. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*. 69:441-446.
- Monte, M.J., J.J. Marin, A. Antelo, and J. Vazquez-Tato. 2009. Bile acids: chemistry, physiology, and pathophysiology. *World journal of gastroenterology : WJG*. 15:804-816.
- Mooi, W.J., K.P. Dingemans, M.A. van den Bergh Weerman, A.C. Jobsis, H.S. Heymans, and P.G. Barth. 1983. Ultrastructure of the liver in the cerebrohepatorenal syndrome of Zellweger. *Ultrastructural pathology*. 5:135-144.
- Moore, S.A., E. Hurt, E. Yoder, H. Sprecher, and A.A. Spector. 1995. Docosahexaenoic acid synthesis in human skin fibroblasts involves peroxisomal retroconversion of tetracosahexaenoic acid. *Journal of lipid research*. 36:2433-2443.
- Morais, S., A. Knoll-Gellida, M. Andre, C. Barthe, and P.J. Babin. 2007. Conserved expression of alternative splicing variants of peroxisomal acyl-CoA oxidase 1 in vertebrates and developmental and nutritional regulation in fish. *Physiological genomics*. 28:239-252.
- Mori, T., T. Tsukamoto, H. Mori, Y. Tashiro, and Y. Fujiki. 1991. Molecular cloning and deduced amino acid sequence of nonspecific lipid transfer protein (sterol carrier protein 2) of rat liver: a higher molecular mass (60 kDa) protein contains the primary sequence of nonspecific lipid transfer protein as its C-terminal part. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 88:4338-4342.
- Muerhoff, A.S., K.J. Griffin, and E.F. Johnson. 1992. The peroxisome proliferator-activated receptor mediates the induction of CYP4A6, a cytochrome P450 fatty acid omega-hydroxylase, by clofibrilic acid. *The Journal of biological chemistry*. 267:19051-19053.
- Mukai, S., and Y. Fujiki. 2006. Molecular mechanisms of import of peroxisome-targeting signal type 2 (PTS2) proteins by PTS2 receptor Pex7p and PTS1 receptor Pex5pL. *The Journal of biological chemistry*. 281:37311-37320.
- Neuspiel, M., A.C. Schauss, E. Braschi, R. Zunino, P. Rippstein, R.A. Rachubinski, M.A. Andrade-Navarro, and H.M. McBride. 2008. Cargo-selected transport from the mitochondria to peroxisomes is mediated by vesicular carriers. *Current biology : CB*. 18:102-108.
- Novikoff, A.B., and S. Goldfischer. 1969. Visualization of peroxisomes (microbodies) and mitochondria with diaminobenzidine. *The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society*. 17:675-680.
- Oaxaca-Castillo, D., P. Andreoletti, A. Vluggens, S. Yu, P.P. van Veldhoven, J.K. Reddy, and M. Cherkaoui-Malki. 2007. Biochemical characterization of two functional human liver acyl-CoA oxidase isoforms 1a and 1b encoded by a single gene. *Biochemical and biophysical research communications*. 360:314-319.
- Okamoto, K., and J.M. Shaw. 2005. Mitochondrial morphology and dynamics in yeast and multicellular eukaryotes. *Annual review of genetics*. 39:503-536.

- Olichon, A., L.J. Emorine, E. Descoins, L. Pelloquin, L. Brichese, N. Gas, E. Guillou, C. Delettre, A. Valette, C.P. Hamel, B. Ducommun, G. Lenaers, and P. Belenguer. 2002. The human dynamin-related protein OPA1 is anchored to the mitochondrial inner membrane facing the inter-membrane space. *FEBS letters*. 523:171-176.
- Olivier, L.M., K.L. Chambliss, K.M. Gibson, and S.K. Krisans. 1999. Characterization of phosphomevalonate kinase: chromosomal localization, regulation, and subcellular targeting. *Journal of lipid research*. 40:672-679.
- Olivier, L.M., W. Kovacs, K. Masuda, G.A. Keller, and S.K. Krisans. 2000. Identification of peroxisomal targeting signals in cholesterol biosynthetic enzymes. AA-CoA thiolase, hmg-coa synthase, MPPD, and FPP synthase. *Journal of lipid research*. 41:1921-1935.
- Olson, B.L., M.B. Hock, S. Ekholm-Reed, J.A. Wohlschlegel, K.K. Dev, A. Kralli, and S.I. Reed. 2008. SCFCdc4 acts antagonistically to the PGC-1alpha transcriptional coactivator by targeting it for ubiquitin-mediated proteolysis. *Genes & development*. 22:252-264.
- Ongwijitwat, S., and M.T. Wong-Riley. 2005. Is nuclear respiratory factor 2 a master transcriptional coordinator for all ten nuclear-encoded cytochrome c oxidase subunits in neurons? *Gene*. 360:65-77.
- Osumi, T., T. Hashimoto, and N. Ui. 1980. Purification and properties of acyl-CoA oxidase from rat liver. *Journal of biochemistry*. 87:1735-1746.
- Osumi, T., N. Ishii, S. Miyazawa, and T. Hashimoto. 1987. Isolation and structural characterization of the rat acyl-CoA oxidase gene. *The Journal of biological chemistry*. 262:8138-8143.
- Pacot, C., M. Petit, F. Caira, M. Rollin, N. Behecti, S. Gregoire, M. Cherkaoui Malki, C. Cavatz, M. Moisant, C. Moreau, and et al. 1993. Response of genetically obese Zucker rats to ciprofibrate, a hypolipidemic agent, with peroxisome proliferation activity as compared to Zucker lean and Sprague-Dawley rats. *Biology of the cell / under the auspices of the European Cell Biology Organization*. 77:27-35.
- Paintlia, A.S., A.G. Gilg, M. Khan, A.K. Singh, E. Barbosa, and I. Singh. 2003. Correlation of very long chain fatty acid accumulation and inflammatory disease progression in childhood X-ALD: implications for potential therapies. *Neurobiology of disease*. 14:425-439.
- Parisi, M.A., and D.A. Clayton. 1991. Similarity of human mitochondrial transcription factor 1 to high mobility group proteins. *Science*. 252:965-969.
- Park, S.Y., and W. Lee. 2007. The depletion of cellular mitochondrial DNA causes insulin resistance through the alteration of insulin receptor substrate-1 in rat myocytes. *Diabetes research and clinical practice*. 77 Suppl 1:S165-171.
- Passi, S., M. Picardo, M. Nazzaro-Porro, A. Breathnach, A.M. Confaloni, and G. Serlupi-Crescenzi. 1984. Antimitochondrial effect of saturated medium chain length (C8-C13) dicarboxylic acids. *Biochemical pharmacology*. 33:103-108.
- Paton, V.G., J.E. Shackelford, and S.K. Krisans. 1997. Cloning and subcellular localization of hamster and rat isopentenyl diphosphate dimethylallyl diphosphate isomerase. A PTS1 motif targets the enzyme to peroxisomes. *The Journal of biological chemistry*. 272:18945-18950.
- Peeters, A., P. Fraisl, S. van den Berg, E. Ver Loren van Themaat, A. Van Kampen, M.H. Rider, H. Takemori, K.W. van Dijk, P.P. Van Veldhoven, P. Carmeliet, and M. Baes. 2011. Carbohydrate metabolism is perturbed in peroxisome-deficient hepatocytes due to mitochondrial dysfunction, AMP-activated protein kinase (AMPK) activation, and peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1alpha (PGC-1alpha) suppression. *The Journal of biological chemistry*. 286:42162-42179.

- Perez-Carreras, M., P. Del Hoyo, M.A. Martin, J.C. Rubio, A. Martin, G. Castellano, F. Colina, J. Arenas, and J.A. Solis-Herruzo. 2003. Defective hepatic mitochondrial respiratory chain in patients with nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology*. 38:999-1007.
- Pessayre, D., A. Mansouri, and B. Fromenty. 2002. Nonalcoholic steatosis and steatohepatitis. V. Mitochondrial dysfunction in steatohepatitis. *American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology*. 282:G193-199.
- Platta, H.W., F. El Magraoui, D. Schlee, S. Grunau, W. Girzalsky, and R. Erdmann. 2007. Ubiquitination of the peroxisomal import receptor Pex5p is required for its recycling. *The Journal of cell biology*. 177:197-204.
- Platta, H.W., and R. Erdmann. 2007. The peroxisomal protein import machinery. *FEBS letters*. 581:2811-2819.
- Poirier, Y., V.D. Antonenkov, T. Glumoff, and J.K. Hiltunen. 2006. Peroxisomal beta-oxidation--a metabolic pathway with multiple functions. *Biochimica et biophysica acta*. 1763:1413-1426.
- Poll-The, B.T., F. Roels, H. Ogier, J. Scotto, J. Vamecq, R.B. Schutgens, R.J. Wanders, C.W. van Roermund, M.J. van Wijland, A.W. Schram, and et al. 1988. A new peroxisomal disorder with enlarged peroxisomes and a specific deficiency of acyl-CoA oxidase (pseudo-neonatal adrenoleukodystrophy). *American journal of human genetics*. 42:422-434.
- Poulos, A., and P. Sharp. 1984. Plasma and skin fibroblast C26 fatty acids in infantile Refsum's disease. *Neurology*. 34:1606-1609.
- Powers, J.M., Y. Liu, A.B. Moser, and H.W. Moser. 1992. The inflammatory myelinopathy of adrenoleukodystrophy: cells, effector molecules, and pathogenetic implications. *Journal of neuropathology and experimental neurology*. 51:630-643.
- Powers, J.M., and H.H. Schaumburg. 1973. The adrenal cortex in adreno-leukodystrophy. *Archives of pathology*. 96:305-310.
- Powers, J.M., and H.H. Schaumburg. 1981. The testis in adreno-leukodystrophy. *The American journal of pathology*. 102:90-98.
- Powers, J.M., H.H. Schaumburg, A.B. Johnson, and C.S. Raine. 1980. A correlative study of the adrenal cortex in adreno-leukodystrophy--evidence for a fatal intoxication with very long chain saturated fatty acids. *Investigative & cell pathology*. 3:353-376.
- Puigserver, P., G. Adelmant, Z. Wu, M. Fan, J. Xu, B. O'Malley, and B.M. Spiegelman. 1999. Activation of PPARgamma coactivator-1 through transcription factor docking. *Science*. 286:1368-1371.
- Puigserver, P., J. Rhee, J. Donovan, C.J. Walkey, J.C. Yoon, F. Oriente, Y. Kitamura, J. Altomonte, H. Dong, D. Accili, and B.M. Spiegelman. 2003. Insulin-regulated hepatic gluconeogenesis through FOXO1-PGC-1alpha interaction. *Nature*. 423:550-555.
- Puigserver, P., J. Rhee, J. Lin, Z. Wu, J.C. Yoon, C.Y. Zhang, S. Krauss, V.K. Mootha, B.B. Lowell, and B.M. Spiegelman. 2001. Cytokine stimulation of energy expenditure through p38 MAP kinase activation of PPARgamma coactivator-1. *Molecular cell*. 8:971-982.
- Puigserver, P., and B.M. Spiegelman. 2003. Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator 1 alpha (PGC-1 alpha): transcriptional coactivator and metabolic regulator. *Endocrine reviews*. 24:78-90.
- Puigserver, P., Z. Wu, C.W. Park, R. Graves, M. Wright, and B.M. Spiegelman. 1998. A cold-inducible coactivator of nuclear receptors linked to adaptive thermogenesis. *Cell*. 92:829-839.

- Purdue, P.E., and P.B. Lazarow. 2001. Peroxisome biogenesis. *Annual review of cell and developmental biology*. 17:701-752.
- Qin, Y.M., A.M. Haapalainen, D. Conry, D.A. Cuebas, J.K. Hiltunen, and D.K. Novikov. 1997a. Recombinant 2-enoyl-CoA hydratase derived from rat peroxisomal multifunctional enzyme 2: role of the hydratase reaction in bile acid synthesis. *The Biochemical journal*. 328 (Pt 2):377-382.
- Qin, Y.M., M.H. Poutanen, H.M. Helander, A.P. Kvist, K.M. Siivari, W. Schmitz, E. Conzelmann, U. Hellman, and J.K. Hiltunen. 1997b. Peroxisomal multifunctional enzyme of beta-oxidation metabolizing D-3-hydroxyacyl-CoA esters in rat liver: molecular cloning, expression and characterization. *The Biochemical journal*. 321 (Pt 1):21-28.
- Rantanen, A., M. Gaspari, M. Falkenberg, C.M. Gustafsson, and N.G. Larsson. 2003. Characterization of the mouse genes for mitochondrial transcription factors B1 and B2. *Mammalian genome : official journal of the International Mammalian Genome Society*. 14:1-6.
- Reddy, J.K. 2004. Peroxisome proliferators and peroxisome proliferator-activated receptor alpha: biotic and xenobiotic sensing. *The American journal of pathology*. 164:2305-2321.
- Reddy, J.K., and T. Hashimoto. 2001a. Peroxisomal beta-oxidation and peroxisome proliferator-activated receptor alpha: an adaptive metabolic system. *Annual review of nutrition*. 21:193-230.
- Reddy, J.K., and T. Hashimoto. 2001b. Peroxisomal α -oxidation and peroxisome proliferator - Activated receptor α : An adaptive metabolic system. *Annual review of nutrition*. 21:193-230.
- Reddy, J.K., and G.P. Mannaerts. 1994. Peroxisomal lipid metabolism. *Annual review of nutrition*. 14:343-370.
- Reddy, J.K., M.K. Reddy, M.I. Usman, N.D. Lalwani, and M.S. Rao. 1986. Comparison of hepatic peroxisome proliferative effect and its implication for hepatocarcinogenicity of phthalate esters, di(2-ethylhexyl) phthalate, and di(2-ethylhexyl) adipate with a hypolipidemic drug. *Environmental health perspectives*. 65:317-327.
- Reinecke, C.J., D.P. Knoll, P.J. Pretorius, H.S. Steyn, and R.H. Simpson. 1985. The correlation between biochemical and histopathological findings in adrenoleukodystrophy. *Journal of the neurological sciences*. 70:21-38.
- Rhodin, J. 1954. Correlation of ultrastructural organization and function in normal and experimentally changed proximal tubule cells of the mouse kidney. Karolinska Institutet, Stockholm. 76.
- Richert, L., S. Price, C. Chesne, K. Maita, and N. Carmichael. 1996. Comparison of the induction of hepatic peroxisome proliferation by the herbicide oxadiazon in vivo in rats, mice, and dogs and in vitro in rat and human hepatocytes. *Toxicology and applied pharmacology*. 141:35-43.
- Rinaldo, P., D. Matern, and M.J. Bennett. 2002. Fatty acid oxidation disorders. *Annual review of physiology*. 64:477-502.
- Rodgers, J.T., W. Haas, S.P. Gygi, and P. Puigserver. 2010. Cdc2-like kinase 2 is an insulin-regulated suppressor of hepatic gluconeogenesis. *Cell metabolism*. 11:23-34.
- Rodgers, J.T., C. Lerin, Z. Gerhart-Hines, and P. Puigserver. 2008. Metabolic adaptations through the PGC-1 alpha and SIRT1 pathways. *FEBS letters*. 582:46-53.
- Rodgers, J.T., C. Lerin, W. Haas, S.P. Gygi, B.M. Spiegelman, and P. Puigserver. 2005. Nutrient control of glucose homeostasis through a complex of PGC-1alpha and SIRT1. *Nature*. 434:113-118.

- Rosewich, H., H.R. Waterham, R.J. Wanders, S. Ferdinandusse, M. Henneke, D. Hunneman, and J. Gartner. 2006. Pitfall in metabolic screening in a patient with fatal peroxisomal beta-oxidation defect. *Neuropediatrics*. 37:95-98.
- Rottensteiner, H., K. Stein, E. Sonnenhol, and R. Erdmann. 2003. Conserved function of pex11p and the novel pex25p and pex27p in peroxisome biogenesis. *Molecular biology of the cell*. 14:4316-4328.
- Rottensteiner, H., and F.L. Theodoulou. 2006. The ins and outs of peroxisomes: co-ordination of membrane transport and peroxisomal metabolism. *Biochimica et biophysica acta*. 1763:1527-1540.
- Rustin, P., D. Chretien, T. Bourgeron, J. LeBidois, D. Sidi, A. Rotig, and A. Munnich. 1993. Investigation of respiratory chain activity in human heart. *Biochemical medicine and metabolic biology*. 50:120-126.
- Rustin, P., and A. Rotig. 2002. Inborn errors of complex II--unusual human mitochondrial diseases. *Biochimica et biophysica acta*. 1553:117-122.
- Sanyal, A.J., C. Campbell-Sargent, F. Mirshahi, W.B. Rizzo, M.J. Contos, R.K. Sterling, V.A. Luketic, M.L. Shiffman, and J.N. Clore. 2001. Nonalcoholic steatohepatitis: association of insulin resistance and mitochondrial abnormalities. *Gastroenterology*. 120:1183-1192.
- Sato, N. 2007. Central role of mitochondria in metabolic regulation of liver pathophysiology. *Journal of gastroenterology and hepatology*. 22 Suppl 1:S1-6.
- Sato, M., and T. Kuroiwa. 1991. Organization of multiple nucleoids and DNA molecules in mitochondria of a human cell. *Experimental cell research*. 196:137-140.
- Savasta, S., G.P. Comi, M.P. Perini, A. Lupi, S. Strazzer, F. Rognoni, and R. Rossoni. 2001. Leigh disease: clinical, neuroradiologic, and biochemical study of three new cases with cytochrome c oxidase deficiency. *Journal of child neurology*. 16:608-613.
- Sazanov, L.A. 2007. Respiratory complex I: mechanistic and structural insights provided by the crystal structure of the hydrophilic domain. *Biochemistry*. 46:2275-2288.
- Scarpulla, R.C. 2008a. Nuclear control of respiratory chain expression by nuclear respiratory factors and PGC-1-related coactivator. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 1147:321-334.
- Scarpulla, R.C. 2008b. Transcriptional paradigms in mammalian mitochondrial biogenesis and function. *Physiological reviews*. 88:611-638.
- Scarpulla, R.C. 2011. Metabolic control of mitochondrial biogenesis through the PGC-1 family regulatory network. *Biochimica et biophysica acta*. 1813:1269-1278.
- Schaffer, J.E. 2002. Fatty acid transport: the roads taken. *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism*. 282:E239-246.
- Schagger, H., U. Brandt, S. Gencic, and G. von Jagow. 1995. Ubiquinol-cytochrome-c reductase from human and bovine mitochondria. *Methods in enzymology*. 260:82-96.
- Schattenberg, J.M., and D. Schuppan. 2011. Nonalcoholic steatohepatitis: the therapeutic challenge of a global epidemic. *Current opinion in lipidology*. 22:479-488.
- Schliebs, W., and W.H. Kunau. 2006. PTS2 co-receptors: diverse proteins with common features. *Biochimica et biophysica acta*. 1763:1605-1612.

- Schon, E.A., S. Santra, F. Pallotti, and M.E. Girvin. 2001. Pathogenesis of primary defects in mitochondrial ATP synthesis. *Seminars in cell & developmental biology*. 12:441-448.
- Schrader, M. 2006. Shared components of mitochondrial and peroxisomal division. *Biochimica et biophysica acta*. 1763:531-541.
- Schrader, M., and H.D. Fahimi. 2006. Peroxisomes and oxidative stress. *Biochimica et biophysica acta*. 1763:1755-1766.
- Schrader, M., and H.D. Fahimi. 2008. The peroxisome: still a mysterious organelle. *Histochemistry and cell biology*. 129:421-440.
- Schrader, M., S.J. King, T.A. Stroh, and T.A. Schroer. 2000. Real time imaging reveals a peroxisomal reticulum in living cells. *Journal of cell science*. 113 (Pt 20):3663-3671.
- Schrader, M., B.E. Reuber, J.C. Morrell, G. Jimenez-Sanchez, C. Obie, T.A. Stroh, D. Valle, T.A. Schroer, and S.J. Gould. 1998. Expression of PEX11beta mediates peroxisome proliferation in the absence of extracellular stimuli. *The Journal of biological chemistry*. 273:29607-29614.
- Schrader, M., M. Thiemann, and H.D. Fahimi. 2003. Peroxisomal motility and interaction with microtubules. *Microscopy research and technique*. 61:171-178.
- Schreiber, S.N., D. Knutti, K. Brogli, T. Uhlmann, and A. Kralli. 2003. The transcriptional coactivator PGC-1 regulates the expression and activity of the orphan nuclear receptor estrogen-related receptor alpha (ERRalpha). *The Journal of biological chemistry*. 278:9013-9018.
- Seedorf, U., M. Raabe, P. Ellinghaus, F. Kannenberg, M. Fobker, T. Engel, S. Denis, F. Wouters, K.W. Wirtz, R.J. Wanders, N. Maeda, and G. Assmann. 1998. Defective peroxisomal catabolism of branched fatty acyl coenzyme A in mice lacking the sterol carrier protein-2/sterol carrier protein-x gene function. *Genes & development*. 12:1189-1201.
- Seelan, R.S., and L.I. Grossman. 1997. Structural organization and promoter analysis of the bovine cytochrome c oxidase subunit VIIc gene. A functional role for YY1. *The Journal of biological chemistry*. 272:10175-10181.
- Simple, R.K., V.C. Crowley, C.P. Sewter, M. Laudes, C. Christodoulides, R.V. Considine, A. Vidal-Puig, and S. O'Rahilly. 2004. Expression of the thermogenic nuclear hormone receptor coactivator PGC-1alpha is reduced in the adipose tissue of morbidly obese subjects. *International journal of obesity and related metabolic disorders : journal of the International Association for the Study of Obesity*. 28:176-179.
- Setchell, K.D., J.E. Heubi, K.E. Bove, N.C. O'Connell, T. Brewsaugh, S.J. Steinberg, A. Moser, and R.H. Squires, Jr. 2003. Liver disease caused by failure to racemize trihydroxycholestanic acid: gene mutation and effect of bile acid therapy. *Gastroenterology*. 124:217-232.
- Setoyama, C., H. Tamaoki, Y. Nishina, K. Shiga, and R. Miura. 1995. Functional expression of two forms of rat acyl-CoA oxidase and their substrate specificities. *Biochemical and biophysical research communications*. 217:482-487.
- Shadel, G.S., and D.A. Clayton. 1997. Mitochondrial DNA maintenance in vertebrates. *Annu Rev Biochem*. 66:409-435.
- Shnitka, T.K. 1966. Comparative ultrastructure of hepatic microbodies in some mammals and birds in relation to species differences in uricase activity. *Journal of ultrastructure research*. 16:598-625.

- Singh, A.K., G.S. Dhaunsi, M.P. Gupta, J.K. Orak, K. Asayama, and I. Singh. 1994. Demonstration of glutathione peroxidase in rat liver peroxisomes and its intraorganellar distribution. *Archives of biochemistry and biophysics*. 315:331-338.
- Smith, B.T., T.K. Sengupta, and I. Singh. 2000. Intraperoxisomal localization of very-long-chain fatty acyl-CoA synthetase: implication in X-adrenoleukodystrophy. *Experimental cell research*. 254:309-320.
- Sprecher, H. 2000. Metabolism of highly unsaturated n-3 and n-6 fatty acids. *Biochimica et biophysica acta*. 1486:219-231.
- Stahl, A., R.E. Gimeno, L.A. Tartaglia, and H.F. Lodish. 2001. Fatty acid transport proteins: a current view of a growing family. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM*. 12:266-273.
- Stamellos, K.D., J.E. Shackelford, R.D. Tanaka, and S.K. Krisans. 1992. Mevalonate kinase is localized in rat liver peroxisomes. *The Journal of biological chemistry*. 267:5560-5568.
- Steinberg, S.J., G. Dodt, G.V. Raymond, N.E. Braverman, A.B. Moser, and H.W. Moser. 2006. Peroxisome biogenesis disorders. *Biochimica et biophysica acta*. 1763:1733-1748.
- Stolz, D.B., R. Zamora, Y. Vodovotz, P.A. Loughran, T.R. Billiar, Y.M. Kim, R.L. Simmons, and S.C. Watkins. 2002. Peroxisomal localization of inducible nitric oxide synthase in hepatocytes. *Hepatology*. 36:81-93.
- Subramani, S., A. Koller, and W.B. Snyder. 2000. Import of peroxisomal matrix and membrane proteins. *Annu Rev Biochem*. 69:399-418.
- Suzuki, Y., M. Iai, A. Kamei, Y. Tanabe, S. Chida, S. Yamaguchi, Z. Zhang, Y. Takemoto, N. Shimozawa, and N. Kondo. 2002. Peroxisomal acyl CoA oxidase deficiency. *The Journal of pediatrics*. 140:128-130.
- Suzuki, Y., N. Shimozawa, S. Yajima, S. Tomatsu, N. Kondo, Y. Nakada, S. Akaboshi, M. Iai, Y. Tanabe, T. Hashimoto, and 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. *American journal of human genetics*. 54:36-43.
- Tanaka, A., K. Okumoto, and Y. Fujiki. 2003. cDNA cloning and characterization of the third isoform of human peroxin Pex11p. *Biochemical and biophysical research communications*. 300:819-823.
- Thompson, S.L., and S.K. Krisans. 1990. Rat liver peroxisomes catalyze the initial step in cholesterol synthesis. The condensation of acetyl-CoA units into acetoacetyl-CoA. *The Journal of biological chemistry*. 265:5731-5735.
- Thoms, S., and R. Erdmann. 2005. Dynamin-related proteins and Pex11 proteins in peroxisome division and proliferation. *The FEBS journal*. 272:5169-5181.
- Thoms, S., S. Gronborg, and J. Gartner. 2009. Organelle interplay in peroxisomal disorders. *Trends in molecular medicine*. 15:293-302.
- Tiraby, C., G. Tavernier, C. Lefort, D. Larrouy, F. Bouillaud, D. Ricquier, and D. Langin. 2003. Acquisition of brown fat cell features by human white adipocytes. *The Journal of biological chemistry*. 278:33370-33376.
- Tiranti, V., A. Savoia, F. Forti, M.F. D'Apolito, M. Centra, M. Rocchi, and M. Zeviani. 1997. Identification of the gene encoding the human mitochondrial RNA polymerase (h-mtRPOL) by cyberscreening of the Expressed Sequence Tags database. *Human molecular genetics*. 6:615-625.
- Titorenko, V.I., and R.T. Mullen. 2006. Peroxisome biogenesis: the peroxisomal endomembrane system and the role of the ER. *The Journal of cell biology*. 174:11-17.

- Titorenko, V.I., and R.A. Rachubinski. 2001. Dynamics of peroxisome assembly and function. *Trends in cell biology*. 11:22-29.
- Tong, L. 2005. Acetyl-coenzyme A carboxylase: crucial metabolic enzyme and attractive target for drug discovery. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*. 62:1784-1803.
- Tonsgard, J.H., and G.S. Getz. 1985. Effect of Reye's syndrome serum on isolated chinchilla liver mitochondria. *The Journal of clinical investigation*. 76:816-825.
- Vamecq, J., E. de Hoffmann, and F. Van Hoof. 1985. The microsomal dicarboxyl-CoA synthetase. *The Biochemical journal*. 230:683-693.
- Vamecq, J., and J.P. Draye. 1989. Pathophysiology of peroxisomal beta-oxidation. *Essays in biochemistry*. 24:115-225.
- Vamecq, J., J.P. Draye, F. Van Hoof, J.P. Misson, P. Evrard, G. Verellen, H.J. Eyssen, J. Van Eldere, R.B. Schutgens, R.J. Wanders, and et al. 1986. Multiple peroxisomal enzymatic deficiency disorders. A comparative biochemical and morphologic study of Zellweger cerebrohepatorenal syndrome and neonatal adrenoleukodystrophy. *The American journal of pathology*. 125:524-535.
- van der Meer, D.L., T. Degenhardt, S. Vaisanen, P.J. de Groot, M. Heinaniemi, S.C. de Vries, M. Muller, C. Carlberg, and S. Kersten. 2010. Profiling of promoter occupancy by PPARalpha in human hepatoma cells via ChIP-chip analysis. *Nucleic acids research*. 38:2839-2850.
- van der Zand, A., I. Braakman, H.J. Geuze, and H.F. Tabak. 2006. The return of the peroxisome. *Journal of cell science*. 119:989-994.
- van Grunsven, E.G., E. van Berkel, L. Ijlst, P. Vreken, J.B. de Klerk, J. Adamski, H. Lemonde, P.T. Clayton, D.A. Cuebas, and R.J. Wanders. 1998. Peroxisomal D-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase deficiency: resolution of the enzyme defect and its molecular basis in bifunctional protein deficiency. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 95:2128-2133.
- van Heusden, G.P., J.R. van Beckhoven, R. Thieringer, C.R. Raetz, and K.W. Wirtz. 1992. Increased cholesterol synthesis in Chinese hamster ovary cells deficient in peroxisomes. *Biochimica et biophysica acta*. 1126:81-87.
- Van Veldhoven, P.P. 2010. Biochemistry and genetics of inherited disorders of peroxisomal fatty acid metabolism. *Journal of lipid research*. 51:2863-2895.
- Van Veldhoven, P.P., C. Brees, and G.P. Mannaerts. 1991. D-aspartate oxidase, a peroxisomal enzyme in liver of rat and man. *Biochimica et biophysica acta*. 1073:203-208.
- Van Veldhoven, P.P., and G.P. Mannaerts. 1999. Role and organization of peroxisomal beta-oxidation. *Advances in experimental medicine and biology*. 466:261-272.
- Van Veldhoven, P.P., G. Vanhove, S. Asselberghs, H.J. Eyssen, and G.P. Mannaerts. 1992. Substrate specificities of rat liver peroxisomal acyl-CoA oxidases: palmitoyl-CoA oxidase (inducible acyl-CoA oxidase), pristanoyl-CoA oxidase (non-inducible acyl-CoA oxidase), and trihydroxycoprostanoyl-CoA oxidase. *The Journal of biological chemistry*. 267:20065-20074.
- Vanhorebeek, I., M. Baes, and P.E. Declercq. 2001. Isoprenoid biosynthesis is not compromised in a Zellweger syndrome mouse model. *Biochimica et biophysica acta*. 1532:28-36.
- Vanhove, G.F., P.P. Van Veldhoven, M. Fransen, S. Denis, H.J. Eyssen, R.J. Wanders, and G.P. Mannaerts. 1993. The CoA esters of 2-methyl-branched chain fatty acids and of the bile acid intermediates di- and

trihydroxycoprostanic acids are oxidized by one single peroxisomal branched chain acyl-CoA oxidase in human liver and kidney. *The Journal of biological chemistry*. 268:10335-10344.

Varanasi, U., R. Chu, S. Chu, R. Espinosa, M.M. LeBeau, and J.K. Reddy. 1994. Isolation of the human peroxisomal acyl-CoA oxidase gene: organization, promoter analysis, and chromosomal localization. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 91:3107-3111.

Varanasi, U., R. Chu, Q. Huang, R. Castellon, A.V. Yeldandi, and J.K. Reddy. 1996. Identification of a peroxisome proliferator-responsive element upstream of the human peroxisomal fatty acyl coenzyme A oxidase gene. *The Journal of biological chemistry*. 271:2147-2155.

Vega, R.B., J.M. Huss, and D.P. Kelly. 2000. The coactivator PGC-1 cooperates with peroxisome proliferator-activated receptor alpha in transcriptional control of nuclear genes encoding mitochondrial fatty acid oxidation enzymes. *Molecular and cellular biology*. 20:1868-1876.

Verhoeven, N.M., and C. Jakobs. 2001. Human metabolism of phytanic acid and pristanic acid. *Progress in lipid research*. 40:453-466.

Virbasius, C.A., J.V. Virbasius, and R.C. Scarpulla. 1993a. NRF-1, an activator involved in nuclear-mitochondrial interactions, utilizes a new DNA-binding domain conserved in a family of developmental regulators. *Genes & development*. 7:2431-2445.

Virbasius, J.V., and R.C. Scarpulla. 1991. Transcriptional activation through ETS domain binding sites in the cytochrome c oxidase subunit IV gene. *Molecular and cellular biology*. 11:5631-5638.

Virbasius, J.V., and R.C. Scarpulla. 1994. Activation of the human mitochondrial transcription factor A gene by nuclear respiratory factors: a potential regulatory link between nuclear and mitochondrial gene expression in organelle biogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 91:1309-1313.

Virbasius, J.V., C.A. Virbasius, and R.C. Scarpulla. 1993b. Identity of GABP with NRF-2, a multisubunit activator of cytochrome oxidase expression, reveals a cellular role for an ETS domain activator of viral promoters. *Genes & development*. 7:380-392.

Vizeacoumar, F.J., J.C. Torres-Guzman, Y.Y. Tam, J.D. Aitchison, and R.A. Rachubinski. 2003. YHR150w and YDR479c encode peroxisomal integral membrane proteins involved in the regulation of peroxisome number, size, and distribution in *Saccharomyces cerevisiae*. *The Journal of cell biology*. 161:321-332.

Vluggens, A., P. Andreoletti, N. Viswakarma, Y. Jia, K. Matsumoto, W. Kulik, M. Khan, J. Huang, D. Guo, S. Yu, J. Sarkar, I. Singh, M.S. Rao, R.J. Wanders, J.K. Reddy, and M. Cherkaoui-Malki. 2010. Reversal of mouse Acyl-CoA oxidase 1 (ACOX1) null phenotype by human ACOX1b isoform [corrected]. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology*. 90:696-708.

Waechter, F., P. Bentley, F. Bieri, W. Staubli, A. Volkl, and H.D. Fahimi. 1983. Epoxide hydrolase activity in isolated peroxisomes of mouse liver. *FEBS letters*. 158:225-228.

Walker, J.E. 1992. The NADH:ubiquinone oxidoreductase (complex I) of respiratory chains. *Quarterly reviews of biophysics*. 25:253-324.

Wanders, R.J. 2000. Peroxisomes, lipid metabolism, and human disease. *Cell biochemistry and biophysics*. 32 Spring:89-106.

Wanders, R.J. 2004a. Metabolic and molecular basis of peroxisomal disorders: a review. *American journal of medical genetics. Part A*. 126A:355-375.

- Wanders, R.J. 2004b. Peroxisomes, lipid metabolism, and peroxisomal disorders. *Molecular genetics and metabolism*. 83:16-27.
- Wanders, R.J., G.A. Jansen, and O.H. Skjeldal. 2001a. Refsum disease, peroxisomes and phytanic acid oxidation: a review. *Journal of neuropathology and experimental neurology*. 60:1021-1031.
- Wanders, R.J., J. Komen, and S. Ferdinandusse. 2011. Phytanic acid metabolism in health and disease. *Biochimica et biophysica acta*. 1811:498-507.
- Wanders, R.J., and J.C. Komen. 2007. Peroxisomes, Refsum's disease and the alpha- and omega-oxidation of phytanic acid. *Biochemical Society transactions*. 35:865-869.
- Wanders, R.J., and G.J. Romeijn. 1996. Cholesterol biosynthesis in Zellweger syndrome: normal activity of mevalonate kinase, mevalonate-5'-pyrophosphate decarboxylase and IPP-isomerase in patients' fibroblasts but deficient mevalonate kinase activity in liver. *Journal of inherited metabolic disease*. 19:193-196.
- Wanders, R.J., and J.M. Tager. 1998. Lipid metabolism in peroxisomes in relation to human disease. *Molecular aspects of medicine*. 19:69-154.
- Wanders, R.J., P. Vreken, S. Ferdinandusse, G.A. Jansen, H.R. Waterham, C.W. van Roermund, and E.G. Van Grunsven. 2001b. Peroxisomal fatty acid alpha- and beta-oxidation in humans: enzymology, peroxisomal metabolite transporters and peroxisomal diseases. *Biochemical Society transactions*. 29:250-267.
- Wanders, R.J., and H.R. Waterham. 2006a. Biochemistry of mammalian peroxisomes revisited. *Annu Rev Biochem*. 75:295-332.
- Wanders, R.J., and H.R. Waterham. 2006b. Peroxisomal disorders: the single peroxisomal enzyme deficiencies. *Biochimica et biophysica acta*. 1763:1707-1720.
- Wang, H., M.T. Le Dall, Y. Wache, C. Laroche, J.M. Belin, and J.M. Nicaud. 1999. Cloning, sequencing, and characterization of five genes coding for acyl-CoA oxidase isozymes in the yeast *Yarrowia lipolytica*. *Cell biochemistry and biophysics*. 31:165-174.
- Watkins, P.A. 1997. Fatty acid activation. *Progress in lipid research*. 36:55-83.
- Worgall, T.S., S.L. Sturley, T. Seo, T.F. Osborne, and R.J. Deckelbaum. 1998. Polyunsaturated fatty acids decrease expression of promoters with sterol regulatory elements by decreasing levels of mature sterol regulatory element-binding protein. *The Journal of biological chemistry*. 273:25537-25540.
- Wu, X., W. Huang, P.D. Prasad, P. Seth, D.P. Rajan, F.H. Leibach, J. Chen, S.J. Conway, and V. Ganapathy. 1999a. Functional characteristics and tissue distribution pattern of organic cation transporter 2 (OCTN2), an organic cation/carnitine transporter. *J Pharmacol Exp Ther*. 290:1482-1492.
- Wu, Z., P. Puigserver, U. Andersson, C. Zhang, G. Adelmant, V. Mootha, A. Troy, S. Cinti, B. Lowell, R.C. Scarpulla, and B.M. Spiegelman. 1999b. Mechanisms controlling mitochondrial biogenesis and respiration through the thermogenic coactivator PGC-1. *Cell*. 98:115-124.
- Yabe, D., M.S. Brown, and J.L. Goldstein. 2002. Insig-2, a second endoplasmic reticulum protein that binds SCAP and blocks export of sterol regulatory element-binding proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 99:12753-12758.
- Yagi, T., and A. Matsuno-Yagi. 2003. The proton-translocating NADH-quinone oxidoreductase in the respiratory chain: the secret unlocked. *Biochemistry*. 42:2266-2274.

Yamamoto, H., K. Schoonjans, and J. Auwerx. 2007. Sirtuin functions in health and disease. *Mol Endocrinol.* 21:1745-1755.

Yamashita, H., S. Avraham, S. Jiang, R. London, P.P. Van Veldhoven, S. Subramani, R.A. Rogers, and H. Avraham. 1999. Characterization of human and murine PMP20 peroxisomal proteins that exhibit antioxidant activity in vitro. *The Journal of biological chemistry.* 274:29897-29904.

Yoon, J.C., P. Puigserver, G. Chen, J. Donovan, Z. Wu, J. Rhee, G. Adelmant, J. Stafford, C.R. Kahn, D.K. Granner, C.B. Newgard, and B.M. Spiegelman. 2001. Control of hepatic gluconeogenesis through the transcriptional coactivator PGC-1. *Nature.* 413:131-138.

Yoon, J.C., G. Xu, J.T. Deeney, S.N. Yang, J. Rhee, P. Puigserver, A.R. Levens, R. Yang, C.Y. Zhang, B.B. Lowell, P.O. Berggren, C.B. Newgard, S. Bonner-Weir, G. Weir, and B.M. Spiegelman. 2003. Suppression of beta cell energy metabolism and insulin release by PGC-1alpha. *Developmental cell.* 5:73-83.

Zeviani, M., P. Amati, N. Bresolin, C. Antozzi, G. Piccolo, A. Toscano, and S. DiDonato. 1991. Rapid detection of the A---G(8344) mutation of mtDNA in Italian families with myoclonus epilepsy and ragged-red fibers (MERRF). *American journal of human genetics.* 48:203-211.

Références sites web:

- <http://www.cocnet.org/acides-gras.php>
- [http://www.asl-lipides.com/doc site/ASL%20surpoids%20pr%20E9sentation%20journ%20E9es%20NUTRAVITA.pdf](http://www.asl-lipides.com/doc_site/ASL%20surpoids%20pr%20E9sentation%20journ%20E9es%20NUTRAVITA.pdf)
- <http://www.bioinformatics.ucla.edu/ASAP/>
- [http://tel.archives-ouvertes.fr/docs/00/60/95/14/PDF/TH2009 Li - Bo.pdf](http://tel.archives-ouvertes.fr/docs/00/60/95/14/PDF/TH2009_Li - Bo.pdf)



Annexes

Annexe 1. Données supplémentaires (Article)

gene name	accession	description	Fold induction	Log10(X)
IL8	MM_000584	interleukin 8	16.48938708	1.217204513
TNFSF9	MM_003811	tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 9	12.34906074	1.091633927
CXCL2	MM_57731	chemokine (C-X-C motif) ligand 2	7.871263896	0.896044473
IL13RA2	MM_000640	interleukin 13 receptor, alpha 2	7.144842979	0.853992689
IL6	MM_000600	interleukin 6 (interferon, beta 2)	6.527928968	0.81477542
TNFRSF10A	W65310	tumor necrosis factor receptor superfamily, member 10a	4.967812705	0.696165214
CXCL1	MM_001511	chemokine (C-X-C motif) ligand 1 (melanoma growth stimulating activity, alpha)	4.671197949	0.669428272
CCL26	AF096296	chemokine (C-C motif) ligand 26	4.327835255	0.63627072
TNFAIP8	BC005352	tumor necrosis factor, alpha-induced protein 8	4.033171315	0.60564667
TNFAIP3	MM_006290	tumor necrosis factor, alpha-induced protein 3	3.438988125	0.536430676
IFI30	AK123477; BG314628	interferon, gamma-inducible protein 30	3.149808397	0.498284136
IFKBZ	BE646573	nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells, inhibitor, zeta	3.088078918	0.48968839
CCL8	AI400658; Y16645	chemokine (C-C motif) ligand 8	2.929051146	0.466726955
TNFRSF10C	MM_003841	tumor necrosis factor receptor superfamily, member 10c, decoy without an intracellular domain	2.725786532	0.435491841
IFI6	MM_022873	interferon, alpha-inducible protein 6	2.634510974	0.420700012
IFKBE	MM_004556	nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells, inhibitor, epsilon	2.627575237	0.41955516
IL6ST	MM_002184	nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells, receptor	2.532568908	0.403561271
IL12A	BC035571	interleukin 12A (natural killer cell stimulatory factor 1, cytotoxic lymphocyte maturation factor 1, p35)	2.478396894	0.394170856
IFKBA	AI078167	nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells, inhibitor, alpha	2.384004216	0.377307019
IFI30	MM_006332	interferon, gamma-inducible protein 30	2.298065438	0.361362391
IFI11	MM_001548	interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 1	2.25036854	0.352253648
SOC52	MM_003877	suppressor of cytokine signaling 2	2.20917522	0.344230163
IFI27	MM_005532	interferon, alpha-inducible protein 27	2.122698986	0.326888412
TNFRSF12A	MM_016639	tumor necrosis factor receptor superfamily, member 12a	2.072500516	0.316494647
IFI13	AI075407	interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 3	2.061609665	0.314206442
TOLLIP	MM_019009	toll interacting protein	2.035417825	0.308665373
CXCL3	MM_002090; BF032655	chemokine (C-X-C motif) ligand 3	1.980541167	0.296783874
TNFRSF10D	AI738556	tumor necrosis factor receptor superfamily, member 10d, decoy with truncated death domain	1.923087369	0.283999015
IL17RB	MM_018725	interleukin 17 receptor B	1.922783174	0.283930313
IFI12	AA131041	interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 2	1.867989872	0.271374517
TNFAIP6	MM_007115	tumor necrosis factor, alpha-induced protein 6	1.787827683	0.252325658
IL32	MM_004221	interleukin 32	1.757148824	0.244808546
TNFSF7	MM_001252	tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 7	1.754485543	0.244149794
TNFRSF14	BC002794	tumor necrosis factor receptor superfamily, member 14 (herpesvirus entry mediator)	1.735240751	0.239359738
CCR1	MM_178445	chemokine (C-C motif) receptor-like 1	1.72842858	0.237651439
IL1RAP	MM_002182	interleukin 1 receptor accessory protein	1.653404714	0.218379172
IL15	MM_000585	interleukin 15	1.615493554	0.208305229
IRAK3	MM_007199	interleukin-1 receptor-associated kinase 3	1.596834276	0.203259846
CXCL3	MM_002090	chemokine (C-X-C motif) ligand 3	1.560666195	0.193330023
SOC55	MM_014011	suppressor of cytokine signaling 5	1.557168275	0.192335547
IFI44L	MM_006820	interferon-induced protein 44-like	1.534849926	0.186065918
IL24	AI084226	interleukin 24	1.533335899	0.185637304
TRAF6	MM_004620	TNF receptor-associated factor 6	1.51523953	0.180481292
IRAK2	AI246590	interleukin-1 receptor-associated kinase 2	1.485500828	0.171872898
IL10RB	BF526978	interleukin 10 receptor, beta	1.421086229	0.152620431
IL4R	MM_000418	interleukin 4 receptor	1.420190633	0.152346644
CCL18	Y13710	chemokine (C-C motif) ligand 18 (pulmonary and activation-regulated)	1.402015746	0.146752891
IFNA5	MM_002169	interferon, alpha 5	1.401248895	0.146515283
CCR1	MM_178445	chemokine (C-C motif) receptor-like 1	1.397827956	0.145453722

gene name	accession	description	Fold Induction	Log10(X)
CCRL1	MM_178445	chemokine (C-C motif) receptor-like 1	1.397827956	0.145453722
CCL3	MM_002983	chemokine (C-C motif) ligand 3	1.37571766	0.138529312
IL6ST	AW242916	interleukin 6 signal transducer (gp130, oncostatin M receptor)	1.369461408	0.136549798
TMFSEF11A	AW026379	tumor necrosis factor receptor superfamily, member 11a, MFRB activator	1.360421395	0.133673453
IFB35	BC001356	interferon-induced protein 35	1.359465508	0.133368193
SOC54	BF446961	suppressor of cytokine signaling 4	1.355479964	0.132093102
CCR8	MM_005201	chemokine (C-C motif) receptor 8	1.344655467	0.128611022
CXCL6	MM_002993	chemokine (C-X-C motif) ligand 6 (granulocyte chemotactic protein 2)	1.336266661	0.125893117
TMFSEF18	AF241229	tumor necrosis factor receptor superfamily, member 18	1.328930905	0.123502401
IRAK1	MM_001569	interleukin-1 receptor-associated kinase 1	1.317820382	0.11985622
CXCL10	MM_001565	chemokine (C-X-C motif) ligand 10	1.297674118	0.113165643
IL12RB1	AI637915	interleukin 12 receptor, beta 1	1.277471332	0.106351163
CCL2	S69738	chemokine (C-C motif) ligand 2	1.2750737	0.105535288
IL1RL2	AF284434	interleukin 1 receptor-like 2	1.271914446	0.1044579
TMFSEF25	MM_003790	tumor necrosis factor receptor superfamily, member 25	1.270609735	0.104012179
TMFSEF13C	AF373846	tumor necrosis factor receptor superfamily, member 13C	1.270581668	0.104002585
IL9	BG398985	interleukin 9	1.267852671	0.10306879
IL27	BC062422	interleukin 27	1.263703594	0.101645221
TMFSEF13	AF114012	tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 13	1.256492851	0.099160022
TMFAIP1	MM_021137	tumor necrosis factor, alpha-induced protein 1 (endothelial)	1.255077172	0.098670431
IL17RD	AU148326	interleukin 17 receptor D	1.254747268	0.098556259
TRAF2	MM_021138	TNF receptor-associated factor 2	1.248639799	0.096437174
IL1F7	AF200496	interleukin 1 family, member 7 (zeta)	1.247335213	0.095983183
CCR10	MM_016602	chemokine (C-C motif) receptor 10	1.239838032	0.093364954
IL1F10	MM_032556	interleukin 1 family, member 10 (theta)	1.231391171	0.090396035
TMFSEF10B	AF016266	tumor necrosis factor receptor superfamily, member 10b	1.229592418	0.089761177
IL18	MM_001562	interleukin 18 (interferon-gamma-inducing factor)	1.221847816	0.087017117
SOC51	AB005043	suppressor of cytokine signaling 1	1.216848271	0.085236429
IFI44	MM_006417	interferon-induced protein 44	1.213922713	0.084191037
TRADD	L41690	TMFSEF1A-associated via death domain	1.211748717	0.083412569
IFNA1	MM_024013	interferon, alpha 1	1.206578157	0.081555459
TMFAIP8L1	BF338045	tumor necrosis factor, alpha-induced protein 8-like 1	1.205364138	0.081118266
CCL20	BC020698	chemokine (C-C motif) ligand 20	1.203320101	0.080381171
CCL4	MM_002984	chemokine (C-C motif) ligand 4	1.200833945	0.079482956
IFNB1	M28622	interferon, beta 1, fibroblast	1.194252727	0.077097878
CXCL11	BC012532	chemokine (C-X-C motif) ligand 11	1.19026187	0.075642521
IL1RAPL2	AI272208	interleukin 1 receptor accessory protein-like 2	1.189139935	0.075232751
IL25	MM_022789	interleukin 25	1.184618157	0.073578855
IFKBIB	AA044140	nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells, inhibitor, beta	1.183555236	0.073188531
IFNA8	MM_002170	interferon, alpha 8	1.182555511	0.072821536
IL17RE	MM_153482	interleukin 17 receptor E	1.180453468	0.072048873
TRAP1	AW468509	TNF receptor-associated protein 1	1.179492176	0.071695065
ISG20L1	MM_022767	interferon-stimulated exonuclease gene 20kDa-like 1	1.175806784	0.070335962
CCR5	MM_000579	chemokine (C-C motif) receptor 5	1.174435429	0.069829144
IFIH1	BC046208	interferon induced with helicase C domain 1	1.173586281	0.069515024
TMFSEF15	MM_005118	tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 15	1.171511211	0.068746449
TMIP3	MM_024873	TMFAIP3 interacting protein 3	1.166383048	0.066841199
IFKB2	BC002844	nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells 2 (p49/p100)	1.165137132	0.066377043
IL8RB	MM_001557	interleukin 8 receptor, beta	1.164333106	0.066076649
CCR3	MM_001837	chemokine (C-C motif) receptor 3	1.163375605	0.065719953

gene name	accession	description	Fold Induction	Log10(X)
CCR3	NM_001837	chemokine (C-C motif) receptor 3	1.163375605	0.065719953
IL3RA	NM_002183	interleukin 3 receptor, alpha (low affinity)	1.146593589	0.059409509
IL19	NM_013371, DB063907	interleukin 19	1.144034022	0.05843894
TNFRSF17	Z29575	tumor necrosis factor receptor superfamily, member 17	1.134047051	0.054631074
IFIH1	NM_022168	interferon induced with helicase C domain 1	1.130966147	0.053449606
IL1F5	AF186094	interleukin 1 family, member 5 (delta)	1.125986808	0.051533302
SOC57	A1968839	suppressor of cytokine signaling 7	1.123616386	0.050618064
IRAK1BP1	A1561173	interleukin-1 receptor-associated kinase 1 binding protein 1	1.118020026	0.048449583
TNFRSF4	BC040257	tumor necrosis factor receptor superfamily, member 4	1.115500855	0.047469908
CCBP2	A1088640	chemokine binding protein 2	1.11538427	0.047424516
IFRD2	BC001327	interferon-related developmental regulator 2	1.110425365	0.045489374
CCL28	AF110384	chemokine (C-C motif) ligand 28	1.109057723	0.04495415
IL4R	AA767714	interleukin 4 receptor	1.102548623	0.042397751
ISGF3G	NM_006084	interferon-stimulated transcription factor 3, gamma 48kDa	1.101734354	0.042076892
IL23R	NM_144701	interleukin 23 receptor	1.101571178	0.042012564
CCL19	U88321	chemokine (C-C motif) ligand 19	1.09784786	0.04054216
TRAF3	A1721219	TNF receptor-associated factor 3	1.091361764	0.037968734
CCL14	NM_004166	chemokine (C-C motif) ligand 14	1.09062602	0.037675855
CCL7	CD521885	chemokine (C-C motif) ligand 7	1.090373648	0.037575347
TNIP1	NM_006058	TNFAIP3 interacting protein 1	1.088257797	0.036731787
XCR1	NM_005283	chemokine (C motif) receptor 1	1.085431573	0.03560245
CXCL5	AK026546	chemokine (C-X-C motif) ligand 5	1.08501673	0.035436435
IFR2BP1	BC038222	interferon regulatory factor 2 binding protein 1	1.080579604	0.033656766
IL29	AY129150	interleukin 29 (interferon, lambda 1)	1.078180815	0.0326916
IL1R2	NM_004633	interleukin 1 receptor, type II	1.077063296	0.032241226
CXCL11	AF030514	chemokine (C-X-C motif) ligand 11	1.075836249	0.031746173
CKLF	A1825627	chemokine-like factor	1.072421376	0.030365462
CCL16	BC096352	chemokine (C-C motif) ligand 16	1.071092836	0.029827114
TRAF3	NM_003300	TNF receptor-associated factor 3	1.06336582	0.026682696
IRF8	A1073984	interferon regulatory factor 8	1.060331097	0.025441498
IL6R	NM_000565	interleukin 6 receptor	1.059402764	0.025066102
IL28B	NM_172139	interleukin 28B (interferon, lambda 3)	1.058507593	0.024693978
TRAF1	AA922208	TNF receptor-associated factor 1	1.057284598	0.024191906
IFRD2	BC028000, Y12395	interferon-related developmental regulator 2	1.05683717	0.024008079
IL8RA	NM_000634	interleukin 8 receptor, alpha	1.056453197	0.023850262
IL1B	M15330	interleukin 1, beta	1.052243037	0.022116061
XCL1	U23772	chemokine (C motif) ligand 1	1.051829193	0.02194522
IL16	BC040272	interleukin 16 (lymphocyte chemoattractant factor)	1.048085481	0.020396705
CXCL16	AF275260	chemokine (C-X-C motif) ligand 16	1.046856069	0.019886975
CCL11	A1357416, NM_002986	chemokine (C-X-C motif) ligand 11	1.043449888	0.018471597
IL22	BC070261	interleukin 22	1.038740288	0.016494433
IFRD1	AA747426	interferon-related developmental regulator 1	1.03779202	0.016110327
IFMK	AF146759	interferon, kappa	1.035606094	0.015194597
IFNA17	M38289	interferon, alpha 17	1.033276323	0.014216478
CX3CR1	U20350	chemokine (C-X3-C motif) receptor 1	1.030913832	0.01322367
IL7	NM_000880	interleukin 7	1.029137228	0.012473289
IL1F8	AF200494	interleukin 1 family, member 8 (eta)	1.027666643	0.011852226
IL1F9	A1359111	interleukin 1 family, member 9	1.026091478	0.011186081
IL18RAP	NM_003853	interleukin 18 receptor accessory protein	1.023414241	0.010051456
CCL13	NM_005408	chemokine (C-C motif) ligand 13	1.02254421	0.009682094

gene name	accession	description	Fold induction	Log ₁₀ (X)
CCL13	MM_005408	chemokine (C-C motif) ligand 13	1.02254421	0.009682094
IL3	MM_000588	interleukin 3 (colony-stimulating factor, multiple)	1.022058407	0.009475715
IL12RB2	MM_001559	interleukin 12 receptor, beta 2	1.019933075	0.008571675
IL6ST	AL049265	interleukin 6 signal transducer (gp130, oncostatin M receptor)	1.019434382	0.008359277
IL10	BC022315	interleukin 10	1.015683006	0.006758186
IL26	AJ251549	interleukin 26	1.009310696	0.004024876
CXCL9	MM_002416	chemokine (C-X-C motif) ligand 9	1.008182797	0.003539283
IL12B	MM_002187	interleukin 12B (natural killer cell stimulatory factor 2, cytotoxic lymphocyte maturation factor 2, p40)	1.004759183	0.002061984
IL17F	AF332389	interleukin 17F	0.999403343	-0.000259202
IL20	AV358320	interleukin 20	0.997419124	-0.001122309
IL1RL1	AL117622	interleukin 1 receptor-like 1	0.995499058	-0.001959146
CCL5	MM_002985	chemokine (C-C motif) ligand 5	-1.005955516	-0.002578776
CCL21	MM_002989	chemokine (C-C motif) ligand 21	-1.006469351	-0.002800554
CCR9	AF145439	chemokine (C-C motif) receptor 9	-1.007743203	-0.003349878
TNF	MM_000594	tumor necrosis factor (TNF superfamily, member 2)	-1.009388767	-0.004058467
IL1F6	DA669265	interleukin 1 family, member 6 (epsilon)	-1.009480835	-0.004098078
CXCR3	MM_001504	chemokine (C-X-C motif) receptor 3	-1.011237603	-0.00485321
TNFSF14	AF064090	tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 14	-1.012354319	-0.00553254
IL22RA1	MM_021258	interleukin 22 receptor, alpha 1	-1.014567067	-0.006280761
CCR4	BC071751	chemokine (C-C motif) receptor 4	-1.015964368	-0.006878477
TRAP1	MM_016292	TNF receptor-associated protein 1	-1.01742363	-0.00750182
CXCR6	MM_006564	chemokine (C-X-C motif) receptor 6	-1.018817952	-0.008096589
IL27RA	MM_004843	chemokine (C-X-C motif) receptor, alpha	-1.019052419	-0.008196524
TNFSF7	MM_001242	tumor necrosis factor receptor superfamily, member 7	-1.026383189	-0.011308896
CCL25	CR603063	chemokine (C-C motif) ligand 25	-1.031143321	-0.013319029
IFNAR1	AA811138	interferon (alpha, beta and omega) receptor 1	-1.032695231	-0.013972172
IRF5	BF223643	interferon regulatory factor 5	-1.033708142	-0.014397937
TNFSF9	MM_001561	tumor necrosis factor receptor superfamily, member 9	-1.037894466	-0.016153197
IRAK4	MM_016123	interleukin-1 receptor-associated kinase 4	-1.038999747	-0.016615442
IRF1	MM_002198	interferon regulatory factor 1	-1.040911886	-0.017413968
TNFSF13B	MM_012452	tumor necrosis factor receptor superfamily, member 13B	-1.041061868	-0.017476539
ILF2	MM_004515	interleukin enhancer binding factor 2, 45kDa	-1.0456122	-0.019370642
TNFSF17	MM_001192	tumor necrosis factor receptor superfamily, member 17	-1.055422056	-0.023426166
TNFSF19L	AW571669	tumor necrosis factor receptor superfamily, member 19-like	-1.058746395	-0.024791945
NFKB1	MM55643	nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells 1 (p105)	-1.065459345	-0.027536883
IL24	MM_006850	interleukin 24	-1.068165901	-0.02863871
IL2RB	MM_000878	interleukin 2 receptor, beta	-1.070337888	-0.029520899
IL5	BC069137	interleukin 5 (colony-stimulating factor, eosinophil)	-1.075408466	-0.031573451
IL2RA	X01057	interleukin 2 receptor, alpha	-1.078187354	-0.032694234
IL18BP	A1521549	interleukin 18 binding protein	-1.081416159	-0.033992855
CCR7	MM_001838	chemokine (C-C motif) receptor 7	-1.081519699	-0.034034434
ISG20	U88964	interferon stimulated exonuclease gene 20kDa	-1.083553477	-0.03485035
NFKB1L2	AB209126	nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor-like 2	-1.086605638	-0.036071954
CCL23	MM_005064	chemokine (C-C motif) ligand 23	-1.08661637	-0.036076243
IL11	MM_000641	interleukin 11	-1.093680012	-0.038890275
IRF2	MM_002199	interferon regulatory factor 2	-1.100180572	-0.041463971
ILF3	MM_004516	interleukin enhancer binding factor 3, 90kDa	-1.104804494	-0.043285432
TNIP2	AA522816	TNFAIP3 interacting protein 2	-1.11039374	-0.045477005
TNFSF8	A1936516	tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 8	-1.111633597	-0.045961664
CCL22	U83171	chemokine (C-C motif) ligand 22	-1.115650487	-0.04752816

gene name	accession	description	Fold Induction	Log10(X)
CCl22	U83171	chemokine (C-C motif) ligand 22	-1.115650487	-0.04752816
IL17B	NM_014443	interleukin 17B	-1.119752115	-0.049121891
CX3CL1	U84487	chemokine (C-X3-C motif) ligand 1	-1.120063007	-0.049242454
IFNW1	NM_002177	interferon, omega 1	-1.120343138	-0.049351058
IL2RA2	NM_052962	interleukin 22 receptor, alpha 2	-1.122387192	-0.050142702
IL5RA	NM_000564	interleukin 5 receptor, alpha	-1.122395202	-0.050145801
IL10RB	BC001903	interleukin 10 receptor, beta	-1.126101831	-0.051577665
IL4	NM_000589	interleukin 4	-1.126723924	-0.051817516
IL28RA	AW340139	interleukin 28 receptor, alpha (interferon, lambda receptor)	-1.132516045	-0.054044363
IFNA2	NM_000605	interferon, alpha 2	-1.133351163	-0.054364495
IRF7	NM_004030	interferon regulatory factor 7	-1.136013218	-0.055383385
IL17RC	AI560217	interleukin 17 receptor C	-1.138834975	-0.056460796
TNFSF5IP1	NM_020232	tumor necrosis factor superfamily, member 5-induced protein 1	-1.141469057	-0.057464143
IFNA7	NM_021057	interferon, alpha 7	-1.141541956	-0.057491878
TNFRSF8	NM_001243	tumor necrosis factor receptor superfamily, member 8	-1.142565032	-0.057880929
IL2RG	NM_000206	interleukin 2 receptor, gamma (severe combined immunodeficiency)	-1.14693746	-0.059539738
IFNA16	NM_002173	interferon, alpha 16	-1.147447372	-0.059732776
TNFSF11	AF053742	tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 11	-1.147680713	-0.059821083
IL23A	NM_016584	interleukin 23, alpha subunit p19	-1.152459733	-0.06162576
IRAK2	NM_001570	interleukin-1 receptor-associated kinase 2	-1.155747681	-0.062863031
IL13RA1	NM_001560	interleukin 13 receptor, alpha 1	-1.158236397	-0.063797208
TRAF7	AI136921	TNF receptor-associated factor 7	-1.16089932	-0.064794557
IFNA6	BC069471	interferon, alpha 6	-1.161895623	-0.065167116
IL17C	NM_013278	interleukin 17C	-1.164578751	-0.066168862
ILTRAP1	NM_014271	interleukin 1 receptor accessory protein-like 1	-1.166317912	-0.066816946
CMKOR1	BE52368	chemokine orphan receptor 1	-1.174706967	-0.06929544
IR2BP2	BF968057	interferon regulatory factor 2 binding protein 2	-1.186884823	-0.074408576
IL2	NM_000586	interleukin 2	-1.190283372	-0.075650367
IFNGR1	AI458949	interferon gamma receptor 1	-1.191230146	-0.075995675
IL10RA	NM_001558	interleukin 10 receptor, alpha	-1.200068324	-0.079705972
CCL1	DA620119	chemokine (C-C motif) ligand 1	-1.204705818	-0.080881008
IFNGR1	AK127636, AF116669	interferon gamma receptor 1	-1.204705818	-0.080881008
TNFAIP8L2	AF271774	tumor necrosis factor, alpha-induced protein 8-like 2	-1.252589597	-0.0978088
SOC56	NM_004232	suppressor of cytokine signaling 6	-1.258697629	-0.099921414
CMKLR1	U79526	chemokine-like receptor 1	-1.25930513	-0.100130973
IL17A	U32659	interleukin 17A	-1.264009582	-0.101750366
IFNGR1	NM_000416	interferon gamma receptor 1	-1.268091074	-0.103150446
IFMAR2	AI653318	interferon (alpha, beta and omega) receptor 2	-1.274852207	-0.10545984
IL18R1	NM_003855	interleukin 18 receptor 1	-1.275447478	-0.105662579
CCR2L	AF015524	chemokine (C-C motif) receptor-like 2	-1.294240859	-0.112015106
IFNGR2	NM_005534	interferon gamma receptor 2 (interferon gamma transducer 1)	-1.297615451	-0.113146008
CXCL13	NM_006419	chemokine (C-X-C motif) ligand 13 (B-cell chemoattractant)	-1.300754222	-0.114195244
IL8	X77737	interleukin 8	-1.310166173	-0.117326382
IL1R1	NM_000877	interleukin 1 receptor, type I	-1.35119275	-0.130717306
CCR2	NM_000647	chemokine (C-C motif) receptor 2	-1.388503922	-0.142547111
CCR6	NM_004367	chemokine (C-C motif) receptor 6	-1.391862272	-0.143596263
IRF4	NM_002460	interferon regulatory factor 4	-1.402897261	-0.147025867
IL17RD	BC038369	interleukin 17 receptor D	-1.40657401	-0.148162588
TRAF5	NM_004619	TNF receptor-associated factor 5	-1.430479817	-0.155481735

gene name	accession	description	Fold Induction	Log10(X)
TNFAIP2	NM_006291	tumor necrosis factor, alpha-induced protein 2	-1.487137563	-0.172351143
CCL24	BP338501	chemokine (C-C motif) ligand 24	-1.524836009	-0.183223139
IRF2BP2	BG485163	interferon regulatory factor 2 binding protein 2	-1.530512156	-0.184836783
CCR1	AI421071	chemokine (C-C motif) receptor 1	-1.553104332	-0.191200631
TNFSF10	NM_003810	tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 10	-1.587864237	-0.200813367
TNFRSF1B	NM_001066	tumor necrosis factor receptor superfamily, member 1B	-1.59480459	-0.202707477
IL7R	NM_002185	interleukin 7 receptor	-1.610635502	-0.206997268
TNFRSF1A	NM_001065	tumor necrosis factor receptor superfamily, member 1A	-1.631104979	-0.212481913
IFI16	NM_005531	interferon, gamma-inducible protein 16	-1.654756634	-0.218734131
CKLF	BG533580	chemokine-like factor	-1.722154427	-0.236072092
IFITM3	BF338947	interferon induced transmembrane protein 3 (1-8U)	-1.802202563	-0.255803603
TNFSF4	NM_003326	tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 4 (tax-transcriptionally activated glycoprotein 1, 34kDa)	-1.829559083	-0.262346439
IRF3	NM_001571	interferon regulatory factor 3	-1.829578457	-0.262351038
SOC3	AI244908	suppressor of cytokine signaling 3	-1.992556807	-0.299410712
ISG20L2	NM_030980	interferon stimulated exonuclease gene 20kDa-like 2	-2.045312544	-0.310759682
IL20RA	NM_014432, CK902586	interleukin 20 receptor, alpha	-2.081835488	-0.318446408
IRAK1BP1	BG545769	interleukin-1 receptor-associated kinase 1 binding protein 1	-2.491784925	-0.396510554
IFITM2	NM_006435	interferon induced transmembrane protein 2 (1-80)	-2.833410938	-0.452309566
CMKOR1	AI817041	chemokine orphan receptor 1	-2.957597449	-0.470939063
IL15RA	NM_002189	interleukin 15 receptor, alpha	-3.137517142	-0.496586107
IFITM1	AA749101	interferon induced transmembrane protein 1 (9-27)	-3.188399248	-0.503572698
TNFRSF11B	BF433902	tumor necrosis factor receptor superfamily, member 11b (osteoprotegerin)	-3.305558109	-0.519244796
IL11RA	NM_004512	interleukin 11 receptor, alpha	-4.275218527	-0.630958319
TNFRSF19	BF432648	tumor necrosis factor receptor superfamily, member 19	-5.667705384	-0.753407267
CXCL14	NM_004887	chemokine (C-X-C motif) ligand 14	-8.124872066	-0.909816531
IL17D	BF856748	interleukin 17D	-15.03550325	-1.177117969
CXCL12	NM_000609	chemokine (C-X-C motif) ligand 12 (stromal cell-derived factor 1)	-43.38082224	-1.637297779

Annexe 2. Communications-Publications-Collaborations

A. Communications orales et affichées:

EL HAJJ H, ANDREOLETTI P, KERSTEN S, WATERHAM HR, WANDERS RJ, CHERKAOUI-MALKI M. The inflammatory response in Acyl-CoA oxidase 1 deficiency, a pseudo-neonatal adrenoleukodystrophy. *The 2nd European Leukodystrophy Association (ELA) Foundation Research Congress, Luxembourg, Luxembourg, 26-27 Juin, 2009.* (Poster)

EL HAJJ H, ANDREOLETTI P, CHERKAOUI-MALKI M. Characterization of acyl-CoA oxidase 1 deficient fibroblasts. *The “Association pour l'étude des peroxysomes et des PPARs” (AEP BIO) Congress, Paris, France, 4 Juin, 2010.* (Poster)

EL HAJJ H, ANDREOLETTI P, KERSTEN S, CHERKAOUI-MALKI M. Impact of Acyl-CoA oxidase 1 deficiency on mitochondrial biogenesis and on cholesterol synthesis pathway in pseudo-neonatal adrenoleukodystrophy fibroblasts. *The “2nd Open European Peroxisome Meeting” (OEPM) Congress, Lunteren, The Netherlands, 26-27 Octobre, 2010.* (Poster et présentation orale)

EL HAJJ H, ANDREOLETTI P, KERSTEN S, CHERKAOUI-MALKI M. Impact of Acyl-CoA oxidase 1 deficiency on mitochondrial biogenesis and on cholesterol synthesis pathway in pseudo-neonatal adrenoleukodystrophy fibroblasts. *The “37th Young Researchers Forum of the French Society of Biochemistry and Molecular Biology”, Strasbourg, France, 14-17 Décembre, 2010.* (Poster et présentation orale)

B. Publications :

EL HAJJ H.I, VLUGGENS A, ANDREOLETTI P, RAGOT K, MANDARD S, KERSTEN S, WATERHAM HR, LIZARD G, WANDERS RJA, REDDY JK, CHERKAOUI-MALKI M. The inflammatory response in acyl-CoA oxidase 1 deficiency, a pseudo-neonatal adrenoleukodystrophy. *Endocrinology, 2012.*

CHERKAOUI-MALKI M, **EL HAJJ H**, VAMECQ J, ANDREOLETTI P. Hepatic steatosis and peroxisomal fatty acid beta-oxidation (review). *Current Drug Metabolism, 2012, sous presse.*

C. Travaux en préparation :

EL HAJJ H.I, ANDREOLETTI P, WANDERS RJ, CHERKAOUI-MALKI M. Induced cholesterologenesis in ACOX1 deficient fibroblasts.

EL HAJJ H.I, VLUGGENS A, ANDREOLETTI P, REDDY JK, WANDERS RJ, CHERKAOUI-MALKI M. Alteration of mitochondrial functions in case of acyl-CoA oxidase 1 deficiency.

D. Collaborations:

BAARINE M, RAGOT K, GENIN EC, **EL HAJJ H**, TROMPIER D, ANDREOLETTI P, GHANDOUR S, MENETRIER F, CHERKAOUI-MALKI M, SAVARY S, LIZARD G. Peroxisomal and mitochondrial status of two murine oligodendrocytes cell lines (158N, 158JP): potential models for the study of peroxisomal disorders associated with dysmyelination processes. *Journal of Neurochemistry*, 2009; **111(1):119-31**.

Travail en cours:

ZARROUK A, VEJUX A, NURY T, **EL HAJJ H.I**, CHERKAOUI-MALKI M, RIEDINGER JM, HAMMAMI M, LIZARD G. Fatty Acids (C22:0, C24:0, and C26:0) – Induced mitochondrial dysfunctions associated with neurodegenerescence on human neuronal cells (SK-NB-E.)