



HAL
open science

Etude structure/fonction du demi-transporteur ABCD2 dans le contexte de l'Adrénoleucodystrophie liée à l'X

Flore Geillon

► To cite this version:

Flore Geillon. Etude structure/fonction du demi-transporteur ABCD2 dans le contexte de l'Adrénoleucodystrophie liée à l'X. Biologie cellulaire. Université de Bourgogne, 2013. Français. NNT : 2013DIJOS067 . tel-01089861

HAL Id: tel-01089861

<https://theses.hal.science/tel-01089861>

Submitted on 3 Dec 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.

UNIVERSITE DE BOURGOGNE
Ecole Doctorale "Environnements-Santé"

THESE

Pour obtenir le grade de
Docteur de l'Université de Bourgogne
Discipline : Sciences de la vie

Par :
Flore Geillon

Date de soutenance : vendredi 30 août 2013

Etude structure/fonction du demi-transporteur ABCD2 dans le contexte de l'Adrénoleucodystrophie liée à l'X

Directeur de thèse
Stéphane Savary

Co-encadrante de thèse
Doriane Trompier

Jury :

M. Jean-Michel Jault (DR-CNRS)

M. Paul Van Veldhoven (Professeur)

M. Attilio Di Pietro (DR-CNRS)

M. Yannick Hamon (CR-INSERM)

M. Stéphane Savary (Professeur)

Mme Doriane Trompier (MCU)

Rapporteur

Rapporteur

Examineur

Examineur

Directeur de thèse

Co-encadrante

Remerciements

Je tiens à remercier très sincèrement,

Messieurs Attilio Di Pietro, Jean-Michel Jault, Paul Van Veldhoven et Yannick Hammon, d'avoir accepté d'évaluer ce travail de thèse,

Monsieur Gérard Lizard, pour m'avoir permis de travailler dans les meilleures conditions au sein de son laboratoire,

Stéphane et Doriane, pour m'avoir accueillie au sein de l'équipe et pour m'avoir soutenue tout au long de ces 4 ans de thèse. Merci Stéphane pour tes conseils toujours avisés lorsque les résultats n'étaient pas au rendez-vous et pour ton optimisme à toute épreuve. Doriane, je tiens à te remercier pour ta disponibilité, ta patience et ta science des transporteurs ABC. J'ai beaucoup apprécié nos échanges, scientifiques ou non, et j'en garderai un très bon souvenir. Merci également pour tes conseils en matière d'enseignement et ta pédagogie. Enfin, je vous remercie tous les deux de votre réelle implication dans la préparation de ce manuscrit.

Catherine, pour ta gentillesse, ton soutien et nos "réunions" en plein air, à élaborer de grands projets d'avenir... Je tiens aussi à te remercier pour ton implication au sein du laboratoire et ton sens de l'organisation que j'apprécie beaucoup.

Valérie et Pierre, pour vos conseils de qualité en biologie moléculaire et en biochimie,

Les membres du département GB de l'IUT de Dijon, et en particulier Nathalie Bertrand pour votre soutien durant mon année d'ATER,

Les collègues de paillasse qui volent dorénavant de leurs propres ailes : Soëli, Emmanuelle, Julie, Kévin, Emeric, Mohamad, Mohamed, Didier, Virginie, Ségolène, Fred et j'en oublie sûrement...

Les "anciens" qui sont toujours là, Thomas, Allan le pro de l'info, Hammam, mon binôme d'ATER, le pro des TP et du hounous... et la relève, Margaux, Amira, Mounira, Amina, Imen, Youssef...

Tous les membres du Labo BioPeroXIL, pour la bonne ambiance qu'ils apportent tous les jours au laboratoire. Je garderai un super souvenir des repas de laboratoire qui sont toujours l'occasion de faire la fête !

Nathalie pour ton aide précieuse sur ce fichu logiciel Word, pour toujours réussir à nous dépatouiller de situations impossibles, et merci de voler au secours de mes pulls...

Ma famille et mes amis (non les filles, je ne vous oublie pas...),

Ma sœur, Emma, pour ton dynamisme et ta joie de vivre. Merci sœurette de me supporter depuis 24 ans !

Jacques, merci d'être là et de partager avec moi depuis déjà 4 ans, mes meilleurs moments, comme mes moins bons.

Et enfin, je tiens à remercier profondément mes parents, dont le soutien immuable et inconditionnel m'est essentiel. Je vous remercie d'avoir toujours cru en moi. Vous êtes vraiment de super parents.

Sommaire

| | |
|--|----|
| Abréviations | 8 |
| Liste des figures | 10 |
| Liste des tableaux | 13 |
| Avant-propos | 14 |
| | |
| INTRODUCTION..... | 16 |
| CHAPITRE 1 : LE PEROXYSOME | 17 |
| I. Généralités | 18 |
| II. Biogenèse des peroxysomes | 18 |
| II.1. Origine des peroxysomes..... | 18 |
| II.2. Synthèse et importation des protéines membranaires..... | 20 |
| II.3. Synthèse et importation des protéines de la matrice..... | 20 |
| III. Fonctions remplies par le peroxysome | 22 |
| III.1. L'oxydation des acides gras | 22 |
| III.1.1. La β -oxydation | 22 |
| III.1.2. L' α -oxydation..... | 26 |
| III.1.3. La dégradation des acides gras dicarboxyliques | 27 |
| III.2. La synthèse de lipides | 29 |
| III.2.1. Synthèse d'acides gras polyinsaturés | 29 |
| III.2.2. Synthèse des éthers-glycérophospholipides | 30 |
| III.2.3. Synthèse des acides biliaires primaires | 30 |
| III.3. Le métabolisme de l'oxygène | 31 |
| III.4. La détoxification du glyoxylate..... | 32 |
| IV. Pathologies associées au peroxysome | 32 |
| IV.1. Les troubles de la biogenèse des peroxysomes | 33 |
| IV.2. Les déficiences en une enzyme peroxysomale | 33 |
| IV.3. Les autres maladies peroxysomales | 33 |
| | |
| CHAPITRE 2 : L'ADRENOLEUCODYSTROPHIE LIEE AU CHROMOSOME X..... | 35 |
| I. Généralités | 36 |
| II. Description clinique..... | 36 |
| II.1. L'adrénomyélongeopathie..... | 36 |
| II.2. L'adrénoleucodystrophie cérébrale | 37 |
| II.3. Insuffisance surrénale ou maladie d'Addison | 38 |
| III. Physiopathogénèse | 39 |
| III.1. Aspect biochimique et métabolique de l'X-ALD | 39 |
| III.1.1. L'accumulation des AGTLC dans les tissus et les lipides | 39 |
| III.1.2. Causes de l'accumulation des AGTLC | 39 |
| III.1.3. Corrélations entre accumulation d'AGTLC et phénotype..... | 40 |
| III.1.4. Conséquences de l'accumulation des AGTLC..... | 40 |

| | |
|--|----|
| III.2. La souris déficiente en <i>Abcd1</i> | 42 |
| III.3. Lien entre AGTLC - Stress oxydatif et Inflammation | 42 |
| IV. Gènes modificateurs et influence de l'environnement..... | 45 |
| V. Diagnostic de l'X-ALD | 47 |
| V.1. Diagnostic clinique..... | 47 |
| V.2. Diagnostic biochimique..... | 47 |
| V.3. Diagnostic moléculaire..... | 47 |
| VI. Thérapies de l'X-ALD | 48 |
| VI.1. Thérapie Nutritionnelle : l'Huile de Lorenzo. | 48 |
| VI.2. Greffe de moelle osseuse et thérapie génique..... | 49 |
| VI.3. Piste thérapeutique | 50 |
| | |
| CHAPITRE 3 : LES TRANSPORTEURS ABCD PEROXYSOMAUX | 51 |
| I. Généralités sur les transporteurs ABC..... | 52 |
| II. Structure des transporteurs ABC | 53 |
| III. La fonction de transport des transporteurs ABC..... | 55 |
| III.1. Le cycle catalytique..... | 55 |
| III.2. Les transporteurs ABC participant au transport de lipides | 57 |
| III.3. Le mécanisme de transport des lipides..... | 58 |
| III.4. La collaboration entre protéines dans le transport de substrat impliquant un transporteur ABC | 59 |
| IV. Regard sur les transporteurs ABCD peroxysomaux | 62 |
| V. La redondance fonctionnelle entre les transporteurs ABCD peroxysomaux, a la base d'une piste Thérapeutique de l'X-ALD | 63 |
| V.1. Les transporteurs ABCD peroxysomaux et la redondance fonctionnelle | 63 |
| V.2. Les traitements visant à induire l'expression d' <i>ABCD2</i> et/ou <i>ABCD3</i> | 66 |
| V.2.1. Les agents hypolipémiants | 67 |
| V.2.2. Les agents proliférateurs de peroxysome | 67 |
| V.2.3. Les hormones stéroïdiennes | 68 |
| V.2.4. Les AG polyinsaturés | 68 |
| V.2.5. L'hormone thyroïdienne T3 (Triiodothyronine) | 68 |
| VI. L'oligomérisation des transporteurs ABC | 69 |
| VI.1. Les domaines et motifs impliqués..... | 69 |
| VI.1.1. Les domaines et motifs PDZ..... | 69 |
| VI.1.2. Le motif GXXXG | 70 |
| VI.2. La dimérisation des demi-transporteurs..... | 72 |
| VI.2.1. Homodimérisation stricte | 72 |
| VI.2.2. Hétérodimérisation stricte | 73 |
| VI.2.3. Dimérisation alternative | 74 |
| VI.3. L'oligomérisation des demi-transporteurs et des transporteurs entiers | 75 |
| | |
| OBJECTIFS | 77 |
| | |
| RESULTATS | 81 |

| | |
|--|-----|
| CHAPITRE 1 : LES OUTILS | 82 |
| I. Les modèles cellulaires | 83 |
| II. Les anticorps..... | 88 |
| II.1. Anticorps polyclonal de lapin dirigé contre ABCD1 | 89 |
| II.2. Anticorps polyclonal de lapin dirigé contre ABCD2 | 91 |
| II.3. Anticorps polyclonal de lapin dirigé contre ABCD3 | 97 |
| CHAPITRE 2 : CARACTERISATION FONCTIONNELLE D'ABCD2..... | 101 |
| CHAPITRE 3 : LIEN ENTRE AGENCEMENT DIMERIQUE ET FONCTION DES TRANSPORTEURS ABCD PEROXYSOMAUX..... | 113 |
| I. Analyse structure/fonction dans des fibroblastes cutanés issus d'un patient atteint d'X-ALD, via l'utilisation de transporteurs entiers chimériques..... | 116 |
| I.1. Création des plasmides codant des transporteurs ABCD entiers chimériques | 116 |
| I.2. Mise au point des conditions de transfection des fibroblastes cutanés issus d'un patient atteint d'X-ALD | 118 |
| I.3. Analyse de la β -oxydation peroxysomale des AGTLC | 120 |
| I.3.1. Présence des protéines chimériques..... | 121 |
| I.3.2. Localisation peroxysomale des protéines chimériques..... | 122 |
| I.3.3. Fonctionnalité des protéines chimériques..... | 124 |
| I.4. Analyse des AGTLC dans les phospholipides par GC/MS-NICI..... | 126 |
| II. Analyse structure/fonction dans un modèle de levures mutantes, via l'utilisation de transporteurs entiers chimériques..... | 129 |
| II.1. Création des transporteurs ABCD entiers chimériques..... | 130 |
| II.2. Analyse de la β -oxydation peroxysomale des AGTLC | 133 |
| III. Discussion | 135 |
| III.1. Etude dans des fibroblastes cutanés issus d'un patient atteint d'X-ALD | 135 |
| III.2. Etude dans un modèle de levure déficiente en Pxa1 et Pxa2 | 137 |
| CHAPITRE 4 : STATUT OLIGOMERIQUE DES TRANSPORTEURS ABCD PEROXYSOMAUX..... | 139 |
| I. Interaction entre les transporteurs ABCD peroxysomaux | 140 |
| I.1. Proximité des transporteurs ABCDs au sein de la membrane peroxysomale : étude par « Duolink in situ Proximity Ligation Assay »..... | 140 |
| I.1.1. Validation des anticorps primaires..... | 141 |
| I.1.2. « Duolink <i>in situ</i> Proximity Ligation Assay » | 142 |
| I.2. Interaction entre les transporteurs ABC peroxysomaux : étude <i>in vitro</i> par co- immunoprécipitation | 144 |
| I.2.1. Analyse des protéines co-immunoprécipitées avec ABCD2-EGFP | 144 |
| I.2.2. Analyse des protéines co-immunoprécipitées avec ABCD3 | 146 |
| I.2.3. Analyse des protéines co-immunoprécipitées avec ABCD1 | 148 |
| II. Oligomérisation des transporteurs ABCD peroxysomaux | 151 |
| II.1. Etude du statut oligomérique des transporteurs ABCD peroxysomaux par sédimentation sur gradient de sucrose..... | 151 |

| | |
|---|---------|
| II.1.1. Test de solubilisation des protéines | 152 |
| II.1.2. Linéarité et étalonnage des gradients de sucrose | 152 |
| II.1.3. Modification du statut oligomérique des transporteurs ABCD peroxysomaux en fonction des conditions de lyse | 154 |
| II.1.4. Estimation de la taille des complexes protéiques contenant ABCD1, ABCD2-EGFP et ABCD3 | 156 |
| II.2. Etude du statut oligomérique des transporteurs ABCD peroxysomaux par gel d'électrophorèse en conditions natives | 157 |
| II.2.1. Préparation de fractions enrichies en protéines membranaires et en peroxysomes | 158 |
| II.2.2. Electrophorèse en conditions natives | 161 |
| III. Discussion | 165 |
| III.1. Interaction entre les transporteurs ABCD peroxysomaux..... | 165 |
| III.2. Oligomérisation des transporteurs ABCD peroxysomaux | 166 |
| DISCUSSION GENERALE ET CONCLUSION..... | 168 |
| BIBLIOGRAPHIE | 180 |
| ANNEXES | 194 |
| Matériel et Méthodes..... | 195 |
| Revue MEDECINE/SCIENCES | 216 |
| Liste des publications et des communications orales..... | 225 |
| Liste des posters | 226 |

Abréviations

| | |
|-------|---|
| AA | Acide Arachidonique |
| ABC | « ATP-Binding Cassette » |
| ACAA1 | « Acetyl-Coenzyme A Acyltransferase » |
| ACLY | « ATP Citrate Lyase » |
| ACOT | Acyl-CoA Thioestérase |
| ACOX | Acyl-CoA OXYdase |
| ACSL | « Acyl-CoA Synthetase Long Chain » |
| ACSVL | « Acyl-CoA Synthetase Very Long Chain » |
| ADN | Acide DésoxyriboNucléique |
| ADNc | ADN complémentaire |
| ADP | Adénosine DiPhosphate |
| AG | Acide Gras |
| AGLC | Acide Gras à Longue Chaîne |
| AGPS | « AlkylGlycerone Phosphate Synthase » |
| AGT | Alanine:Glyoxylate aminoTransférase |
| AGTLC | Acide Gras à Très Longue Chaîne |
| ALDP | « AdrenoLeukoDystrophy Protein » |
| ALDRP | « AdrenoLeukoDystrophy-Related Protein » |
| AMACR | « α -MethylAcyl-CoA Racemase » |
| AMN | AdrénomyéloNeuropathie |
| ARNm | Acide RiboNucléique messenger |
| ATP | Adénosine TriPhosphate |
| BAAT | « Bile Acid-CoA : Amino acid N-acyl Transferase » |
| BRET | « Bioluminescence Resonance Energy Transfer » |
| CA | Acide Cholique |
| CALD | AdrénoleucoDystrophie Cérébrale |
| CDCA | Acide ChénoDésoxyCholique |
| CFTR | « Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator » |
| CMH | Complexe Majeur d'Histocompatibilité |
| CoA | Coenzyme A |
| CRAT | Carnitine Acétyl-Transférase |
| CROT | Carnitine Octanoyl-Transférase |
| DBP | « D-Bifunctional Protein » |
| DDM | DoDécyl Maltoside |
| DHA | Acide DocosaHexanoïque |
| DHAP | DiHydroxyAcétone Phosphate |
| DHCA | Acide DiHydroxyCholestanoïque |
| DHEA | Déhydroépiandrostérone |
| DLP | « Dynamain-Like Protein » |
| EGFP | « Enhanced Green Fluorescent Protein » |
| ELOVL | « ELongation of Very Long chain fatty acid » |
| ERO | Espèce Réactive de l'Oxygène |
| FASN | « Fatty Acid SyNthase » |
| FATP | « Fatty Acid Transport Protein » |

| | |
|----------------|---|
| FRET | « Förster Resonance Energy Transfer » |
| GFP | « Green Fluorescent Protein » |
| GNPAT | « GlyceroNePhosphate O-Acyl Transferase » |
| GP | GlycéroPhospholipides |
| GST | Glutathion-S-Transférase |
| IgG | Immunoglobuline G |
| IL | InterLeukine |
| IRM | Imagerie par Résonance Magnétique |
| KLH | « Keyhole Limpet Hemocyanin » |
| LB | « Luria Broth » |
| lysoPC | LysophosPhatidylCholine |
| MDR | « Multi Drug Resistance » |
| MFP | « MultiFunctional Protein » |
| mPTS | « membrane Peroxisomal Targeting Signal » |
| NAD | Nicotinamide Adénine Dinucléotide |
| NBD | « Nucleotide Binding Domain » |
| OMIM | « Online Mendelian Inheritance in Man » |
| PBA | 4-Phénylbutyrate |
| PBD | « Peroxisome Biogenesis Disorders » |
| PBS | « Phosphate Buffer Saline » |
| PC | PhosphatidylCholine |
| PED | « Peroxisomal Enzyme Deficiency » |
| PEX | Peroxine |
| P-gp | glycoprotéine-P |
| Pi | Phosphate inorganique |
| PLA | « Proximity Ligation Assay » |
| PMP | « Peroxisomal Membrane Protein » |
| PMSF | « PhenylMethaneSulfonylFluoride » |
| PPAR | « Peroxisome Proliferator-Activated Receptor » |
| PTS | « Peroxisome Targeting Signal » |
| PVDF | « PolyVinylidene DiFluoride » |
| RCDP | « Rhizomelic ChondroDysplasia Punctata » |
| RXR | Récepteur X de l'acide 9-cis-rétinoïque |
| SCPx | « Sterol Carrier Protein x » |
| SDS | Sodium Dodécyl Sulfate |
| SDS-PAGE | « Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis » |
| SOD | SuperOxyde Dismutase |
| SRE | « Sterol Response Element » |
| SREBP | « Sterol Regulatory Element Binding Protein » |
| T ₃ | Triiodothyronine |
| THCA | Acide TriHydroxyCholestanoïque |
| TMD | Domaine TransMembranaire |
| TR | « Thyroid hormone Receptor » |
| TRE | « Thyroid hormone Response Element » |
| X-ALD | AdrénoleucoDystrophie liée au chromosome X |
| ZSS | « Zellweger Syndrome Spectrum » |

Liste des figures

| | |
|--|----|
| FIGURE 1 : ILLUSTRATION DE LA BIOGENESE DES PEROXYSONES..... | 19 |
| FIGURE 2 : MECANISME D'IMPORTATION DES PROTEINES MATRICIELLES ET MEMBRANAIRES PEROXYSONALES..... | 21 |
| FIGURE 3 : MODELE DE TRANSPORT DES AGTLC PAR LES TRANSPORTEURS ABCD PEROXYSONAUX ETABLI D'APRES DES ETUDES SUR L'IMPORT DES AGTLC DANS LE PEROXYSONE, CHEZ LA LEVURE ET LA PLANTE..... | 23 |
| FIGURE 4 : SUBSTRATS POTENTIELS DES TROIS TRANSPORTEURS ABCD PEROXYSONAUX..... | 24 |
| FIGURE 5 : LA B-OXYDATION PEROXYSONALE..... | 25 |
| FIGURE 6 : SCHEMA GLOBAL DE LA B-OXYDATION PEROXYSONALE CHEZ L'HOMME..... | 28 |
| FIGURE 7 : EVENEMENTS PHYSIOPATHOLOGIQUES IMPLIQUES DANS LA NEURODEGENERATION LIEE A L'X-ALD..... | 43 |
| FIGURE 8 : REPRESENTATION SCHEMATIQUE DE LA TOPOLOGIE DES TRANSPORTEURS ABC ENTIERS (A), ENTIERS ET AVEC UN TMD SUPPLEMENTAIRE (B), ET DES DEMI-TRANSPORTEURS (C) ET (D)..... | 55 |
| FIGURE 9 : FONCTIONNEMENT DES TRANSPORTEURS ABC SELON LE MODELE « ATP-SWITCH »..... | 56 |
| FIGURE 10 : LOCALISATION CELLULAIRE DES TRANSPORTEURS ABC IMPLIQUES DANS LE TRANSPORT DE LIPIDES..... | 58 |
| FIGURE 11 : ILLUSTRATION DES TROIS MODELES DE TRANSPORT DES LIPIDES ASSURE PAR LES TRANSPORTEURS ABC..... | 59 |
| FIGURE 12 : EFFLUX DE LIPOPROTEINES DE LA MEMBRANE PLASMIQUE (INTERNE) CHEZ LES BACTERIES GRAM-NEGATIVES..... | 60 |
| FIGURE 13 : MECANISME DE PRESENTATION DES PEPTIDES ANTIGENIQUES PAR LE CMH DE CLASSE I, FAISANT INTERVENIR LE TRANSPORTEUR TAP (ABCB2/ABCB3)..... | 61 |
| FIGURE 14 : LOCALISATION DANS LA PROTEINE ABCD1 DES SIX MOTIFS GXXXXG-LIKE CONSERVES ENTRE LES TRANSPORTEURS ABCD PEROXYSONAUX..... | 71 |
| FIGURE 15 : ANALYSE DES CLONES OBTENUS PAR SOUS CLONAGE DU CLONE 28..... | 84 |
| FIGURE 16 : VISUALISATION DE LA FLUORESCENCE DE L'EGFP EN MICROSCOPIE CONFOCALE DANS LE CLONE 28.38, SUREXPRESSANT ABCD2-EGFP SEULEMENT APRES INDUCTION A LA DOXYCYCLINE (2µg/ML)..... | 85 |
| FIGURE 17 : DETECTION DE LA PROTEINE RECOMBINANTE ABCD2-EGFP EN IMMUNOBLOT, AVANT ET APRES INDUCTION DU CLONE 28.38 A LA DOXYCYCLINE (2µg/ML)..... | 85 |
| FIGURE 18 : AUTORADIOGRAMME DU PRODUIT DE TRADUCTION IN VITRO DE LA SEQUENCE ADNC D'ABCD2 DE RAT, EN PRESENCE DE METHIONINE RADIOMARQUEE AU 35S..... | 86 |
| FIGURE 19 : DETECTION DE LA PROTEINE EGFP EN IMMUNOBLOT DANS LE LYSAT DE FIBROBLASTES CUTANES ISSUS D'UN PATIENT ATTEINT D'X-ALD, TRANSFECTES PAR UN PLASMIDE CODANT LA PROTEINE EGFP..... | 87 |
| FIGURE 20 : SEQUENCE DU PEPTIDE UTILISE LORS DE L'IMMUNISATION DES LAPINS AU COURS DU PROGRAMME D'OBTENTION D'UN ANTICORPS POLYCLONAL DIRIGE CONTRE LE TRANSPORTEUR ABCD1 DE SOURIS..... | 90 |
| FIGURE 21 : REACTIVITE EN IMMUNOBLOT DE L'ANTICORPS POLYCLONAL ANTI-ABCD1 (SERUM DU LAPIN N°925029) A J79..... | 91 |
| FIGURE 22 : SEQUENCE DU PEPTIDE UTILISE LORS DE L'IMMUNISATION DES LAPINS AU COURS DU PREMIER PROGRAMME D'OBTENTION D'UN ANTICORPS POLYCLONAL DIRIGE CONTRE LE TRANSPORTEUR ABCD2 DE SOURIS..... | 92 |
| FIGURE 23 : REACTIVITE EN IMMUNOBLOT DE L'ANTICORPS POLYCLONAL ANTI-ABCD2 (SERUMS DES LAPINS N°925001 ET 925003) A J70..... | 93 |

| | |
|--|-----|
| FIGURE 24 : SEQUENCE DU PEPTIDE UTILISE LORS DE L'IMMUNISATION DES LAPINS AU COURS DU SECOND PROGRAMME (QML57, THERMOFISHER) D'OBTENTION D'UN ANTICORPS POLYCLONAL DIRIGE CONTRE LE TRANSPORTEUR ABCD2. | 94 |
| FIGURE 25 : REACTIVITE EN IMMUNOBLOT DE L'ANTICORPS POLYCLONAL ANTI-ABCD2 (SERUM DU LAPIN PA4958 AU JOUR 72 ET IGG PURIFIEES A PARTIR DE CE MEME SERUM). | 95 |
| FIGURE 26 : REACTIVITE EN IMMUNOBLOT DE L'ANTICORPS POLYCLONAL ANTI-ABCD2 (IGG PURIFIEES A PARTIR DU SERUM DU LAPIN PA4958 AU JOUR 72). | 96 |
| FIGURE 27 : REACTIVITE EN IMMUNOBLOT DE L'ANTICORPS POLYCLONAL ANTI-ABCD2 (IGG PURIFIEES A PARTIR DU SERUM DU LAPIN PA4958 AU JOUR 72). | 97 |
| FIGURE 28 : SEQUENCE DU PEPTIDE UTILISE LORS DE L'IMMUNISATION DES LAPINS AU COURS DU PROGRAMME (QML58, THERMOFISHER) D'OBTENTION D'UN ANTICORPS POLYCLONAL DIRIGE CONTRE LE TRANSPORTEUR ABCD3. | 98 |
| FIGURE 29 : REACTIVITE EN IMMUNOBLOT DE L'ANTICORPS POLYCLONAL ANTI-ABCD3 (SERUM DU LAPIN PA4961 AU JOUR 72 ET IGG PURIFIEES A PARTIR DE CE MEME SERUM). | 99 |
| FIGURE 30 : REACTIVITE EN IMMUNOBLOT DE L'ANTICORPS POLYCLONAL ANTI-ABCD3 (IGG PURIFIEES A PARTIR DU SERUM DU LAPIN PA4961 AU JOUR 72). | 99 |
| FIGURE 31 : TRANSPORTEURS CHIMERIQUES ENTIERS A LA MEMBRANE PEROXYSSOMALE. | 114 |
| FIGURE 32 : DIMERE CHIMERIQUE ABCD1-ABCD2..... | 115 |
| FIGURE 33 : STRATEGIE UTILISEE POUR LA CONSTRUCTION DU PLASMIDE ABCD1N-ABCD2CpcDNA3.1(-), CODANT LE TRANSPORTEUR CHIMERIQUE ENTIER ABCD1-ABCD2. | 117 |
| FIGURE 34 : MISE AU POINT DE LA QUANTITE DE PLASMIDE A UTILISER LORS DE LA TRANSFECTION DES FIBROBLASTES X-ALD PAR LES DIFFERENTS PLASMIDES CODANT UN TRANSPORTEUR ABCD CHIMERIQUE ENTIER. | 119 |
| FIGURE 35 : CHOIX DU PROGRAMME A UTILISER LORS DE LA TRANSFECTION DES FIBROBLASTES X-ALD PAR UN PLASMIDE CODANT UN TRANSPORTEUR ABCD ENTIER, AVEC L'APPAREIL AMAXA. | 119 |
| FIGURE 36 : STRATEGIE DE VALIDATION DE LA FONCTIONNALITE DES TRANSPORTEURS ABCD ENTIERS CHIMERIQUES, COUPLES OU NON A L'EGFP, DANS LES FIBROBLASTES CUTANES DEFICIENTS EN ABCD1..... | 120 |
| FIGURE 37 : VERIFICATION DE LA PRESENCE DES TRANSPORTEURS ABCD ENTIERS CHIMERIQUES ET DES TRANSPORTEURS ABCD1 ET ABCD2, FUSIONNES A L'EGFP APRES TRANSFECTION TRANSITOIRE DES FIBROBLASTES X-ALD. | 121 |
| FIGURE 38 : INFLUENCE DE LA TEMPERATURE DE CULTURE DES FIBROBLASTES X-ALD APRES TRANSFECTION, SUR LE NIVEAU D'EXPRESSION DES DIMERES CHIMERIQUES PRODUITS DANS LES CELLULES..... | 122 |
| FIGURE 39 : VERIFICATION DE LA LOCALISATION PEROXYSSOMALE DES TRANSPORTEURS ABCD ENTIERS CHIMERIQUES ET D'ABCD1, FUSIONNES A L'EGFP, DANS DES FIBROBLASTES X-ALD TRANSFECTES DE MANIERE TRANSITOIRE..... | 123 |
| FIGURE 40 : ETUDE DE COMPLEMENTATION FONCTIONNELLE REALISEE SUR UN MODELE DE FIBROBLASTES CUTANES ISSUS DE PATIENTS ATTEINTS D'X-ALD (CELLULES DEFICIENTES EN ABCD1)..... | 124 |
| FIGURE 41 : ETUDE DE COMPLEMENTATION FONCTIONNELLE REALISEE SUR UN MODELE DE FIBROBLASTES CUTANES ISSUS DE PATIENTS ATTEINTS D'X-ALD (CELLULES DEFICIENTES EN ABCD1)..... | 126 |
| FIGURE 42 : MODELE DE TRANSPORT DES AG A TRAVERS LA MEMBRANE PEROXYSSOMALE, CHEZ LA LEVURE S. CEREVISIAE. | 129 |
| FIGURE 43 : ANALYSE DE LA FREQUENCE D'USAGE CHEZ LA LEVURE, DES 16 PREMIERS CODONS DES SEQUENCES NUCLEOTIDIQUES CODANT LES PROTEINES ABCD1 (A) ET ABCD2 (B), DE RAT. | 132 |

| | |
|--|-----|
| FIGURE 44 : ETUDE DE COMPLEMENTATION FONCTIONNELLE REALISEE SUR UN MODELE DE LEVURES DEFICIENTES EN PXA1 ET PXA2 (ORTHOLOGUES DU TRANSPORTEUR ABCD1). | 133 |
| FIGURE 45 : ETUDE PAR « DUOLINK IN SITU PROXIMITY LIGATION ASSAY »..... | 140 |
| FIGURE 46 : DETECTION PAR IMMUNOFUORESCENCE (SIGNAL IF) EN MICROSCOPIE CONFOCALE, DES PROTEINES MEMBRANAIRES PEROXYSOMALES ABCD1, ABCD2-EGFP, ABCD3 ET PMP22, DANS LE CLONE 28.38 INDUIT A LA DOXYCYCLINE..... | 142 |
| FIGURE 47 : ETUDE IN SITU DE LA PROXIMITE ENTRE ABCD2-EGFP ET D'AUTRES PROTEINES PEROXYSOMALES. | 143 |
| FIGURE 48 : CO-IMMUNOPRECIPITATION DES PROTEINES ABCD1 ET ABCD3 AVEC LA PROTEINE ABCD2-EGFP GRACE A L'ANTICORPS ANTI-GFP. | 145 |
| FIGURE 49 : SCHEMA HYPOTHETIQUE DE LA CO-IMMUNOPRECIPITATION DES PROTEINES ABCD1 ET ABCD3 AVEC L'ANTICORPS ANTI- GFP, COVALEMENT LIE AUX BILLES D'AGAROSE (MBL #D153-8). | 146 |
| FIGURE 50 : CO-IMMUNOPRECIPITATION DES PROTEINES ABCD1 ET ABCD2-EGFP AVEC LA PROTEINE ABCD3 GRACE A L'ANTICORPS ANTI-ABCD3. | 147 |
| FIGURE 51 : SCHEMA ILLUSTRANT LA CO-IMMUNOPRECIPITATION DES PROTEINES ABCD2-EGFP ET ABCD1 AVEC ABCD3 GRACE A L'ANTICORPS ANTI-ABCD3 QUE J'AI COVALEMENT LIE AUX BILLES DE PROTEINE A-SEPHAROSE. | 148 |
| FIGURE 52 : CO-IMMUNOPRECIPITATION DE LA PROTEINE ABCD2-EGFP AVEC ABCD1 GRACE A L'ANTICORPS ANTI-ABCD1. | 149 |
| FIGURE 53 : SCHEMA ILLUSTRANT LA CO-IMMUNOPRECIPITATION DE LA PROTEINE ABCD2-EGFP AVEC ABCD1 GRACE A L'ANTICORPS ANTI-ABCD1 QUE J'AI COVALEMENT COUPLE AUX BILLES DE PROTEINE A-SEPHAROSE. | 149 |
| FIGURE 54 : TEST DE SOLUBILISATION DES PROTEINES TOTALES DE LA CELLULE PAR LE B-DDM. | 152 |
| FIGURE 55 : LINEARITE, OBTENUE APRES ULTRACENTRIFUGATION, DU GRADIENT DISCONTINU DE SUCROSE 5-30%. | 153 |
| FIGURE 56 : ETALONNAGE DU GRADIENT DISCONTINU DE SUCROSE 5-30%. | 153 |
| FIGURE 57 : ETUDE DU STATUT OLIGOMERIQUE D'ABCD1 (A), ABCD2-EGFP (B) ET ABCD3 (C) PAR SEDIMENTATION SUR GRADIENT DE SUCROSE 5-30%. | 155 |
| FIGURE 58 : ANALYSE DENSITOMETRIQUE DE LA REPARTITION D'ABCD1 (A), ABCD2-EGFP (B) ET ABCD3 (C) DANS LES FRACTIONS ISSUES DES GRADIENTS DE SUCROSE 5-30%. | 157 |
| FIGURE 59 : SCHEMA ILLUSTRANT LE PRINCIPE D'UNE ELECTROPHORESE BIDIMENSIONNELLE (2D). | 158 |
| FIGURE 60 : ENRICHISSEMENT EN PROTEINES ABCD2-EGFP DANS LA PREPARATION DE MEMBRANES TOTALES ET DANS LA FRACTION ENRICHIE EN PEROXYSOAMES, OBTENUES A PARTIR DU CLONE 28.38 INDUIT A LA DOXYCYCLINE. | 159 |
| FIGURE 61 : ETUDE DE LA SOLUBILISATION D'ABCD1 (A), D'ABCD2-EGFP (B) ET D'ABCD3 (C,) A PARTIR DE LA FRACTION ENRICHIE EN PEROXYSOLE, EN FONCTION DE LA CONCENTRATION EN A-DDM UTILISEE (DE 0,1% A 1% ; (M/V)). | 160 |
| FIGURE 62 : ETUDE DU STATUT OLIGOMERIQUE D'ABCD2-EGFP (A) ET D'ABCD1 (B) PAR ELECTROPHORESE SUR GEL D'ACRYLAMIDE EN CONDITION NON DENATURANTE. | 162 |
| FIGURE 63 : ETUDE DU STATUT OLIGOMERIQUE D'ABCD2-EGFP (A) ET D'ABCD1 (B) PAR ELECTROPHORESE SUR GEL D'ACRYLAMIDE EN CONDITIONS NON DENATURANTES. | 163 |
| FIGURE 64 : ALIGNEMENT DES PROTEINES ABCD2-EGFP ET ABCD1 SEPREES SUR GEL D'ELECTROPHORESE D'ACRYLAMIDE EN CONDITION NATIVE. | 164 |
| FIGURE 65 : MODELE HYPOTHETIQUE DECRIVANT L'EVOLUTION DE L'AGENCEMENT OLIGOMERIQUE DES TRANSPORTEURS ABCD PEROXYSOMAUX, DEPUIS LEUR SYNTHESE (A) JUSQU'AU TRANSPORT DE SUBSTRAT (B)..... | 179 |
| FIGURE 66 : PRINCIPE DE LA MESURE DE LA B-OXYDATION DU C26:0. | 215 |

Liste des tableaux

| | |
|---|-----|
| TABLEAU 1 : RECAPITULATIF DES DIFFERENTES MALADIES PEROXYSOMALES..... | 34 |
| TABLEAU 2 : MALADIES DUES A UNE DEFICIENCE EN TRANSPORTEUR ABC..... | 53 |
| TABLEAU 3 : COMPARAISON DES PROFILS D'EXPRESSION EN ARNm, DES GENES CODANT LES TROIS TRANSPORTEURS ABCD PEROXYSOMAU, CHEZ LA SOURIS ET L'HOMME..... | 65 |
| TABLEAU 4 : RECAPITULATIF DES ANTICORPS DISPONIBLES AU LABORATOIRE AU DEBUT DE MA THESE..... | 100 |
| TABLEAU 5 : RECAPITULATIF DES ANTICORPS PRODUITS AU COURS DE MA THESE..... | 100 |
| TABLEAU 6 : CONSTRUCTIONS PLASMIDIQUES OBTENUES CODANT DES TRANSPORTEURS ABCD CHIMERIQUES ENTIERS, DISPONIBLES DANS LES VECTEURS D'EXPRESSION pCDNA3.1(-) ET pEGFP-N3..... | 117 |
| TABLEAU 7 : ETUDE DE LA FONCTIONNALITE DES TRANSPORTEURS ABCD ENTIERS CHIMERIQUES ET DES TRANSPORTEURS ABCD1, 2 ET 3, FUSIONNES A L'EGFP, DANS DES FIBROBLASTES X-ALD..... | 125 |
| TABLEAU 8 : FREQUENCE D'UTILISATION DES CODONS CHEZ LA LEVURE | 131 |
| TABLEAU 9 : PRESENTATION DES DOUZE PREMIERS CODONS DE LA SEQUENCE ADNC D'ABCD1 DE RAT ET DE LEUR FREQUENCE D'UTILISATION CHEZ LA LEVURE..... | 131 |
| TABLEAU 10 : CONSTRUCTIONS PLASMIDIQUES CODANT DES TRANSPORTEURS ABCD CHIMERIQUES ENTIERS, DISPONIBLES DANS LE VECTEUR D'EXPRESSION pEL30. | 132 |
| TABLEAU 11 : PRESENTATION DES ANTICORPS UTILISES LORS DE L'ETUDE PAR DUOLINK ET DES ESPECES ANIMALES DONT ILS SONT ISSUS. | 141 |
| TABLEAU 12 : BILAN DES CO-IMMUNOPRECIPITATIONS REALISEES SUR LE CLONE 28.38 ET VISANT A METTRE EN EVIDENCE LES INTERACTIONS ENTRE LES TRANSPORTEURS ABCD PEROXYSOMAU. | 150 |
| TABLEAU 13 : ANTICORPS UTILISES LORS DES EXPERIENCES D'IMMUNOFLUORESCENCE | 198 |
| TABLEAU 14 : TAMPONS DE LYSE UTILISES POUR LES LYES "CLASSIQUES" ET LES EXPERIENCES DE SEDIMENTATION SUR GRADIENT DE SUCROSE, D'IMMUNOPRECIPITATION. | 199 |
| TABLEAU 15 : ANTICORPS UTILISES LORS DES EXPERIENCES DE WESTERN-BLOTTING. | 201 |
| TABLEAU 16 : AMORCES UTILISEES POUR L'AMPLIFICATION DE LA SEQUENCE ADNC D'ABCD1 DE RAT..... | 212 |
| TABLEAU 17 : AMORCES UTILISEES POUR AMPLIFIER LES SEQUENCES ADNC D'ABCD2 ET D'ABCD3 DE RAT..... | 213 |

AVANT-PROPOS

Ce manuscrit de thèse porte sur l'« Etude structure-fonction du demi-transporteur ABCD2 dans le contexte de l'Adrénoleucodystrophie liée à l'X ». ABCD2 fait partie de la sous-famille D des transporteurs ABC, qui compte 3 autres membres : ABCD1 et ABCD3, localisés dans la membrane peroxysomale, et ABCD4 qui serait situé dans la membrane lysosomale. De façon intéressante, la protéine ABCD2 présente une redondance fonctionnelle partielle avec son plus proche homologue, ABCD1, associé à l'Adrénoleucodystrophie liée au chromosome X (X-ALD). Cette propriété fait du gène *ABCD2* une cible de choix dans la mise en place d'une thérapie pharmacologique de l'X-ALD. Le laboratoire travaille déjà depuis plusieurs années à l'identification de molécules capables d'induire l'expression d'*ABCD2*. La mise en place d'une telle thérapie nécessite de définir la fonction exacte du transporteur ABCD2, et plus généralement, des transporteurs ABCD peroxysomaux. Mon projet de thèse qui est basé sur l'étude structure-fonction d'*ABCD2*, s'inscrit dans cette optique.

L'introduction de ce manuscrit a pour rôle de présenter le peroxysome, l'X-ALD et les transporteurs ABCD peroxysomaux. Concernant le peroxysome, l'accent est mis sur son rôle dans le métabolisme lipidique, et sur les substrats potentiels des transporteurs ABCD peroxysomaux. Le chapitre 2 sur l'X-ALD aborde les différents phénotypes de la maladie et tente de faire le point sur la physiopathogénèse et les différentes thérapies de l'X-ALD. Enfin, le dernier chapitre est consacré aux transporteurs ABCD peroxysomaux. Il s'attache à décrire la structure des transporteurs ABC et leur mécanisme d'action, le phénomène de redondance fonctionnelle existant entre les transporteurs ABCD peroxysomaux et la piste thérapeutique de l'X-ALD qui en découle, et surtout détaillera le phénomène d'oligomérisation des transporteurs ABC. Après la présentation des objectifs de mon travail de thèse, les résultats sont présentés en quatre chapitres. Le premier chapitre évoque la mise en place des outils de travail. La seconde partie qui a fait l'objet d'une publication dans JBC intitulée « Substrate Specificity Overlap and Interaction between Adrenoleukodystrophy Protein and Adrenoleukodystrophy-related Protein », porte sur la caractérisation fonctionnelle d'*ABCD2*. Le chapitre 3 concerne le lien entre agencement dimérique et fonction des transporteurs ABCD peroxysomaux, tandis que le chapitre 4 traite de leur oligomérisation. Les résultats sont suivis d'une partie "Discussion générale-Conclusion" et de la bibliographie. La partie "Matériel et méthodes" est disponible en annexe, ainsi que la revue « Peroxisomal ABC transporters and X-linked adrenoleukodystrophy » publiée dans médecine/sciences, à laquelle j'ai participé (Geillon et al, 2012).

INTRODUCTION

CHAPITRE 1 : LE PEROXYSOME

I. GENERALITES

Le peroxysome est un organite cellulaire avec une simple membrane lipidique, présent dans toutes les cellules eucaryotes, exceptés les érythrocytes, des levures, jusqu'aux mammifères. Il a été décrit pour la première fois en 1954 par Rhodin, sous l'appellation de « microbodies », mais son importance physiologique était alors minimisée. En effet, dans les années 1980, avec la première description d'une maladie génétique létale associée à une déficience en peroxysome, son implication dans plusieurs voies métaboliques fut mise à jour, renforçant l'intérêt des scientifiques pour son étude. Le peroxysome comprend une cinquantaine d'activités enzymatiques et joue un rôle important, voire essentiel, dans de nombreux processus biochimiques, tels que la β -oxydation des acides gras à très longue chaîne, l' α -oxydation de l'acide phytanique, la synthèse des plasmalogènes et de l'acide docosahexanoïque, la détoxification du glyoxylate et également le métabolisme de l'oxygène. C'est un organite qui a la particularité de s'adapter, que ce soit en nombre, en taille ou en activité, aux besoins métaboliques et aux conditions physiologiques. D'une manière générale, il mesure de 0,1 à 1 μm et une cellule comporte de 100 à 1000 peroxysomes. Une vingtaine de maladies génétiques rares lui ont été associées. Elles sont liées à un défaut de sa biogenèse ou à une déficience en une enzyme. La plus fréquente des maladies peroxysomales est X-ALD, causée par la déficience en transporteur ABCD1, impliqué dans l'importation des acides gras à très longue chaîne.

II. BIOGENESE DES PEROXYSOMES

II.1. Origine des peroxysomes

Chez les mammifères, la formation des peroxysomes suit deux voies de biogenèse. Ils peuvent dériver des peroxysomes préexistants et sont alors considérés comme des organites autonomes se multipliant par croissance et division (Figure 1, Biogénèse autonome) (Motley *et al.* 2007). La division des peroxysomes est divisée en trois étapes : l'élongation des membranes peroxysomales, la constriction, puis la fission (Schrader *et al.* 2012). Les protéines de la famille PEX11 (Peroxine 11) sont considérées comme les acteurs clés de la division peroxysomale et seraient liées à l'élongation des membranes et à leur remodelage. Cependant, la scission finale nécessiterait l'intervention des protéines DLP (« Dynamin-like

proteins »). Les protéines PEX11 qui initient la division peroxysomale, permettraient le recrutement des protéines de la machinerie de division, telles que Fis1 et les DLP.

Les peroxysomes peuvent également résulter d'une biogenèse *de novo*, par bourgeonnement du réticulum endoplasmique (Figure 1, Biogenèse dérivée du réticulum endoplasmique) (Kim *et al.* 2006). Dans ce modèle établi d'après plusieurs études chez la levure, la formation des peroxysomes débute par l'insertion dans le réticulum endoplasmique, de protéines membranaires peroxysomales (« Peroxisomal Membrane Protein », PMP) synthétisées dans le cytosol : PEX3, PEX19, PEX16 ou encore PEX13 (Kim *et al.* 2006; Toro *et al.* 2009; van der Zand *et al.* 2010). Chez la levure comme chez l'Homme, le complexe PEX3/PEX19 jouerait un rôle crucial dans le bourgeonnement du réticulum endoplasmique et la formation de vésicules immatures, contenant une partie des PMP (Lam *et al.* 2010; Agrawal *et al.* 2011; Schmidt *et al.* 2012). Après bourgeonnement, les vésicules fusionneraient grâce à PEX1 et PEX6 et deviendraient alors des peroxysomes autonomes capables d'importer des protéines matricielles et membranaires (van der Zand *et al.* 2012).

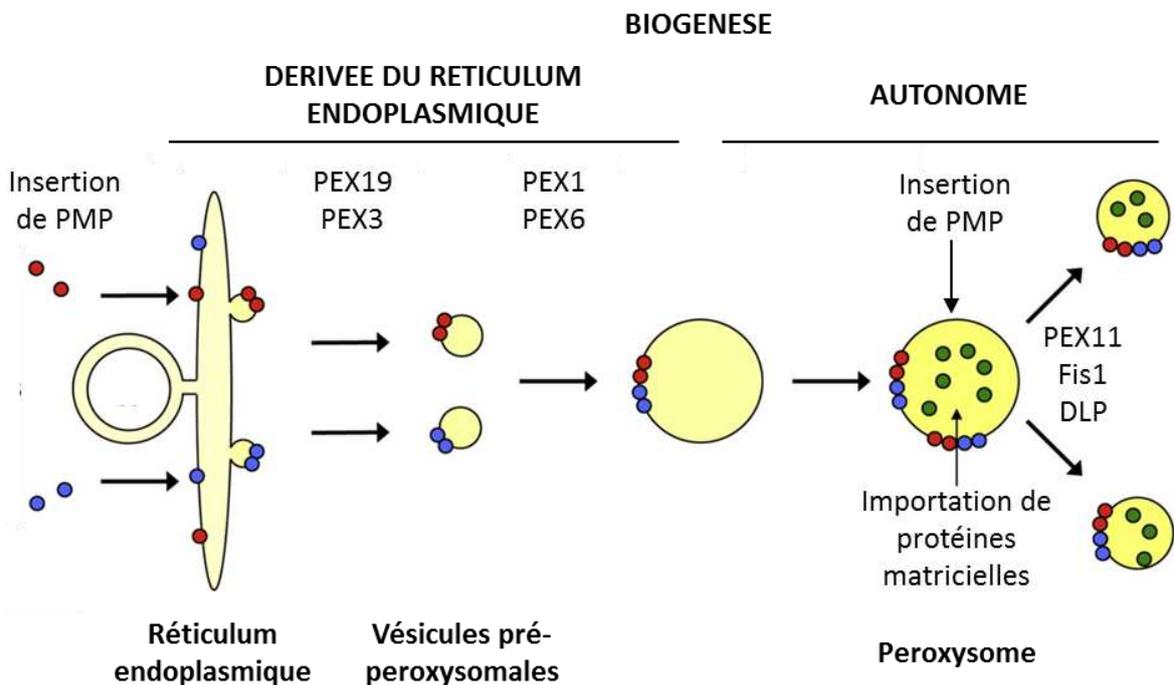


Figure 1 : Illustration de la biogenèse des peroxysomes. Les peroxysomes peuvent résulter d'une biogenèse *de novo*, à partir du réticulum endoplasmique. Cette biogenèse nécessite l'intervention du complexe PEX3/PEX19 lors du bourgeonnement des membranes et des PEX1 et PEX6 lors de la fusion des vésicules pré-peroxysomales. Les peroxysomes peuvent également résulter de la division de peroxysomes préexistants (biogenèse autonome). Ce mécanisme comprend trois étapes : l'élongation des membranes, la constriction, puis la fission, et nécessite l'intervention des protéines de la famille PEX11, des protéines DLP et de Fis1. [adapté de (van der Zand *et al.* 2012)]

II.2. Synthèse et importation des protéines membranaires

Le peroxyosome est un organite qui ne contient pas de matériel génétique. De façon étonnante, les protéines membranaires sont synthétisées sur des ribosomes libres, dans le cytosol. Les PMPs nouvellement synthétisées sont reconnues par PEX19 qui fixe leur séquence d'adressage au peroxyosome, le mPTS (« membrane Peroxisomal Targeting Signal »), et favorise leur repliement (Jones *et al.* 2004; Shibata *et al.* 2004). Par exemple, les transporteurs ABCD peroxyosomaux ABCD1, 2 et 3 présentent une séquence de 14 acides aminés très conservée, (F(F/L)X(R/Q/K)(L/F)(L/I/K)XLLKIL(F/I/V)P) localisée en amont du domaine transmembranaire (Landgraf *et al.* 2003; Kashiwayama *et al.* 2007). Cette séquence riche en acides aminés basiques correspondrait à une séquence d'adressage au peroxyosome et permettrait la reconnaissance des 3 transporteurs par PEX19 (Gloeckner *et al.* 2000; Rottensteiner *et al.* 2004). Au niveau de la membrane du peroxyosome, PEX19 interagit avec la protéine d'amarrage PEX3 (Fang *et al.* 2004; Matsuzono *et al.* 2006), libère la protéine membranaire par un processus non décrit, puis est recyclé dans le cytosol (Figure 2). Le complexe PEX19/PEX3 interviendrait donc non seulement dans la formation *de novo* des peroxyosomes, mais également dans l'importation des PMP après leur traduction dans le cytosol (Schmidt *et al.* 2012).

II.3. Synthèse et importation des protéines de la matrice

Les protéines de la matrice sont également synthétisées dans le cytosol, sur des ribosomes libres et leur importation dans le peroxyosome nécessite de nombreuses peroxines. La plupart des protéines matricielles peroxyosomales possèdent un signal de type PTS1 (« Peroxisome Targeting Signal 1 ») de séquence SKL, localisé à leur extrémité C-terminale et reconnu par le récepteur PEX5 (Gould *et al.* 1989). D'autres possèdent un signal de type PTS2 (séquence consensus : RLXXXXX(H/Q)L) localisé à leur extrémité N-terminale, qui est reconnu par le récepteur PEX7 (Swinkels *et al.* 1991; Petriv *et al.* 2004). De manière surprenante, certaines protéines ne possédant pas de signal PTS peuvent tout de même être adressées au peroxyosome, probablement par interaction avec des protéines matricielles possédant un PTS (McNew *et al.* 1994).

L'importation des protéines matricielles dans le peroxyosome implique l'intervention d'un important complexe localisé dans la membrane du peroxyosome nommé importomère, associé à la machinerie de recyclage du récepteur (Ma *et al.* 2011) (Figure 2). La dizaine de peroxines

constituant l'importomère, est organisée en deux sous-complexes : le complexe d'amarrage constitué de PEX13 et PEX14, et le complexe RING (PEX2, PEX12 et PEX10).

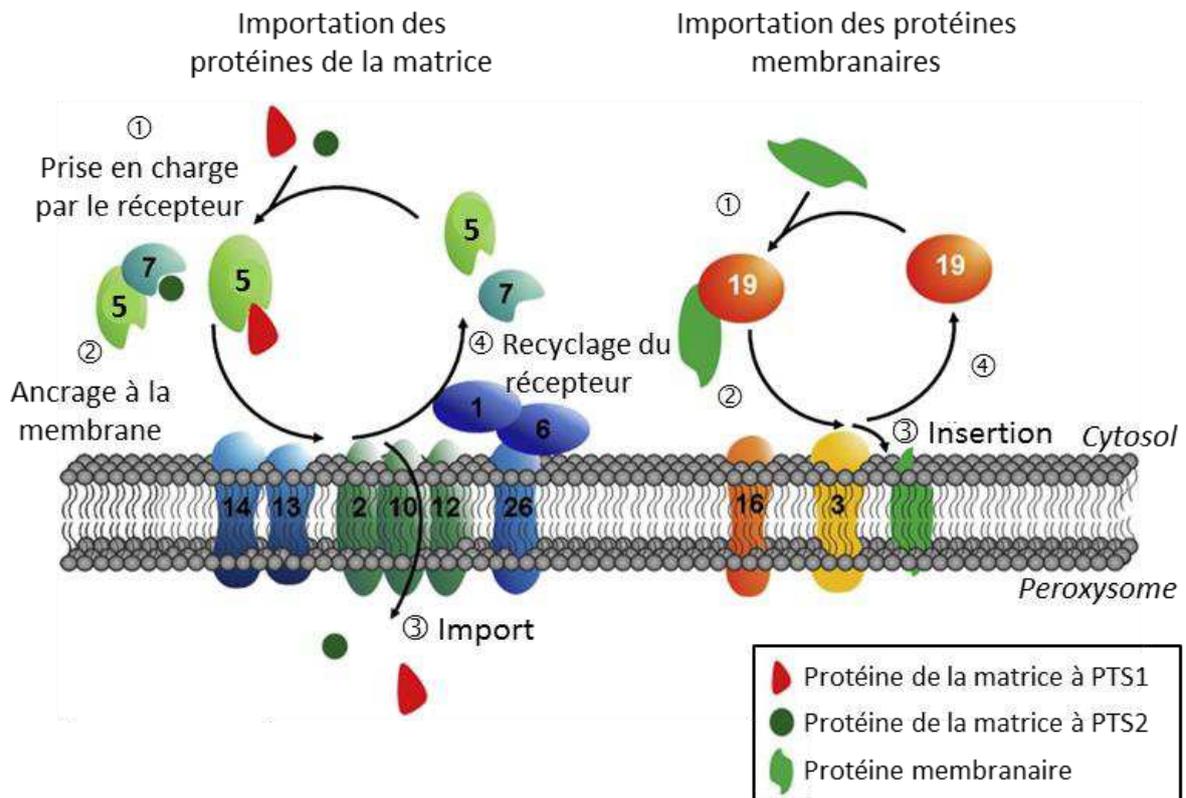


Figure 2 : Mécanisme d'importation des protéines matricielles et membranaires peroxysomales. [adapté de (Waterham et al. 2012)]

Étape 1 : Les protéines matricielles et membranaires synthétisées dans le cytosol sont importées à la membrane peroxysomale respectivement par le récepteur PEX5, associé ou non à PEX7, et par le récepteur PEX19

Étape 2 : Le récepteur chargé est ancré à la membrane, soit via le sous-complexe d'amarrage constitué de PEX13, PEX14 et PEX17 (pour PEX5 et PEX7), soit via PEX3 (pour PEX19).

Étape 3 : Cette fixation entraîne l'importation des protéines matricielles dans le peroxysome (probablement grâce à la formation d'un canal constitué de PEX14 et du récepteur PEX5 lui-même (Meinecke et al. 2010)), ou l'insertion des protéines membranaires (mécanisme non décrit).

Étape 4 : Après libération des protéines peroxysomales, les récepteurs sont ensuite recyclés dans le cytosol afin de participer à un nouveau cycle d'importation.

Le mécanisme de recyclage de PEX19 n'est pas connu.

Une fois libre, les récepteurs PEX5 et PEX7 sont ramenés dans la membrane par le sous-complexe RING, indirectement associé au sous-complexe d'amarrage, puis mono-ubiquitinylés (Alencastre et al. 2009). Ils sont ensuite renvoyés dans le cytosol grâce à la machinerie de recyclage qui comprend 2 ATP-ases (PEX1 et PEX6). Une fois dé-ubiquitinylés, ils peuvent participer à un nouveau cycle d'importation (Grou et al. 2012).

III. FONCTIONS REMPLIES PAR LE PEROXYSOME

III.1. L'oxydation des acides gras

III.1.1. La β -oxydation

Le peroxysome joue un rôle important dans le métabolisme des acides gras (AG), notamment au travers de la β -oxydation qui ressemble beaucoup à celle se déroulant dans la mitochondrie (Van Veldhoven 2010; Wanders *et al.* 2010). Néanmoins, les substrats pris en charge par le peroxysome sont bien spécifiques puisque celui-ci métabolise les AG à très longue chaîne (AGTCL) saturés et insaturés, les AG méthylés comme l'acide pristanique, les précurseurs des acides biliaires (Ferdinandusse *et al.* 2006), les AG dicarboxyliques (Ferdinandusse *et al.* 2004), les AG polyinsaturés (Petroni *et al.* 1998) et également les leucotriènes (Ferdinandusse *et al.* 2002).

- L'activation des acides gras

Avant d'être pris en charge par la voie de β -oxydation, les AG doivent absolument être activés par thioestérification au Coenzyme A (CoA). Cette réaction est assurée par des enzymes de la famille des acyl-CoA synthétases et nécessite la consommation d'ATP (Adénosine TriPhosphate). Les AG branchés tels que l'acide pristanique et les AG polyinsaturés, pourraient être activés par ACSL4 (« Acyl-CoA Synthetase Long Chain 4») ou ACSL1, dont la localisation peroxysomale a été montrée dans le foie (Lewin *et al.* 2002; Kikuchi *et al.* 2004). Concernant les AGTLC, ils pourraient être activés dans le foie et les reins par ACSVL1 (« Acyl-CoA Synthetase Very Long Chain 1», SLC27A2, FATP2 (« Fatty Acid Transport Protein » 2)), associée au réticulum endoplasmique mais également au peroxysome (Jansen *et al.* 2001). Cette synthétase serait également capable d'activer les AG à longue chaîne (AGLC), ainsi que les AG méthylés et les précurseurs des acides biliaires. Il a été montré que dans des fibroblastes cutanés, la synthétase ACSVL5 (SLC27A4, FATP4) possède un rôle majeur dans l'activation des AGTLC (Jia *et al.* 2007). Cependant, l'importance de cette synthétase ne serait pas limitée seulement aux fibroblastes. Elle pourrait également être impliquée dans le métabolisme lipidique au niveau du cerveau, de l'intestin, du foie et de la peau (Moulson *et al.* 2003).

- L'importation des acides gras dans le peroxysome

Dans la membrane peroxysomale, 3 transporteurs appartenant à la sous-famille D des transporteurs ABC (« ATP-Binding Cassette ») joueraient un rôle essentiel dans l'importation des substrats de la β -oxydation (Morita *et al.* 2012). ABCD1, 2 et 3 prendraient en charge des AGTLC, préalablement activés par une synthétase (van Roermund *et al.* 2008). L'enzyme ACSVL5, qui interagit avec ABCD1 dans le cytoplasme, est une bonne candidate pour assurer cette étape d'activation (Hillebrand *et al.* 2012).

D'après deux études récentes menées chez la levure et la plante, les transporteurs ABCD peroxysomaux hydrolyseraient les acyl-CoA (avant ou pendant leur transport) en AGTLC (van Roermund *et al.* 2012; De Marcos Lousa *et al.* 2013) (Figure 3). Une fois dans le peroxysome, les AGTLC libres seraient réactivés par une synthétase liée au transporteur, avant d'être métabolisés par β -oxydation. Cette synthétase pourrait vraisemblablement être ACSVL1, puisqu'elle est localisée à l'intérieur du peroxysome (Smith *et al.* 2000) et interagit avec ABCD1 (Makkar *et al.* 2006).

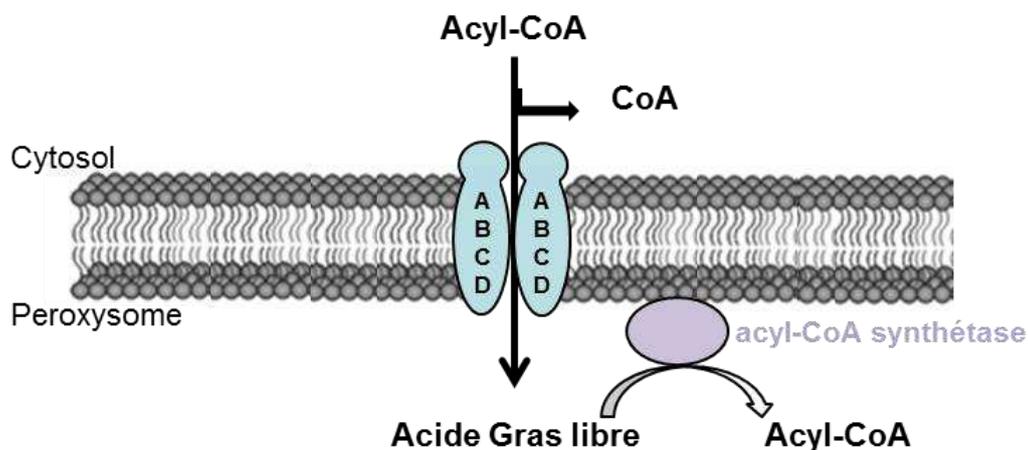


Figure 3 : Modèle de transport des AGTLC par les transporteurs ABCD peroxysomaux établi d'après des études sur l'import des AGTLC dans le peroxysome, chez la levure et la plante. [Adapté de (van Roermund *et al.* 2012; De Marcos Lousa *et al.* 2013)]

Les trois transporteurs ABCD peroxysomaux présenteraient des spécificités de substrat différentes, mais toutefois chevauchantes (Figure 4). ABCD1 serait impliqué dans le transport d'acyl-CoA à très longue chaîne, saturés et monoinsaturés (van Roermund *et al.* 2008; van Roermund *et al.* 2011). De façon intéressante, ABCD2 présenterait une redondance fonctionnelle avec ABCD1. Il transporterait des acyl-CoA à très longue chaîne, saturés, mono- et poly-insaturés, mais avec une préférence pour les AG polyinsaturés (Genin *et al.* 2011; van Roermund *et al.* 2011). Enfin, ABCD3 importerait les acyl-CoA à longue chaîne

(Imanaka *et al.* 1999) ainsi que les précurseurs des acides biliaires (Acide TriHydroxyCholestanôïque, THCA), Acide DiHydroxyCholestanôïque, DHCA), les AG méthylés (acide phytanique, acide pristanique) (Visser *et al.* 2007), et les AG dicarboxyliques (Kemp *et al.* 2011).

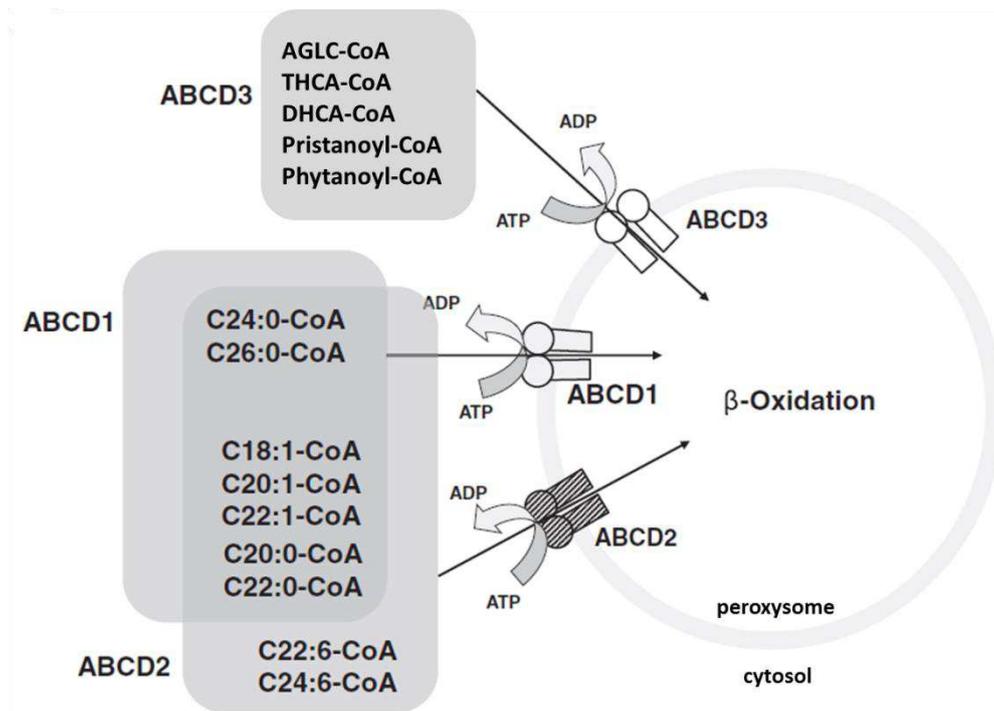


Figure 4 : Substrats potentiels des trois transporteurs ABCD peroxysomaux. AGLC : Acide Gras à Longue Chaîne, ATP : Adénosine TriPhosphate, ADP : Adénosine DiPhosphate. [Adapté de (Morita *et al.* 2012)]

- Les 4 étapes de la β -oxydation

Dans le peroxysome comme dans la mitochondrie, 4 étapes sont nécessaires au raccourcissement des AG : une étape de déshydrogénation réalisée par une acyl-CoA oxydase, suivie d'une hydratation et à nouveau d'une déshydrogénation (réactions catalysées par la protéine multifonctionnelle), et enfin d'un clivage thiolitique assuré par une thiolase (Figure 5). La β -oxydation des AG saturés s'accompagne de la formation d'acétyl-CoA et raccourcit leur chaîne alkyl de 2 atomes de carbone, tandis que les AG insaturés ou méthylés perdent trois atomes de carbone sous forme de propionyl-CoA. A la différence de la mitochondrie, le peroxysome ne permet pas la dégradation totale des AG mais seulement leur raccourcissement, éventuellement jusqu'à la formation d'AG à chaîne moyenne. De plus la β -oxydation peroxysomale ne s'accompagne pas de la production d'énergie sous forme d'ATP comme c'est le cas dans la mitochondrie.

La présence ou non d'un groupement méthyl sur le carbone α des AG conditionne leur β -oxydation par une batterie d'enzymes différentes (Figure 5).

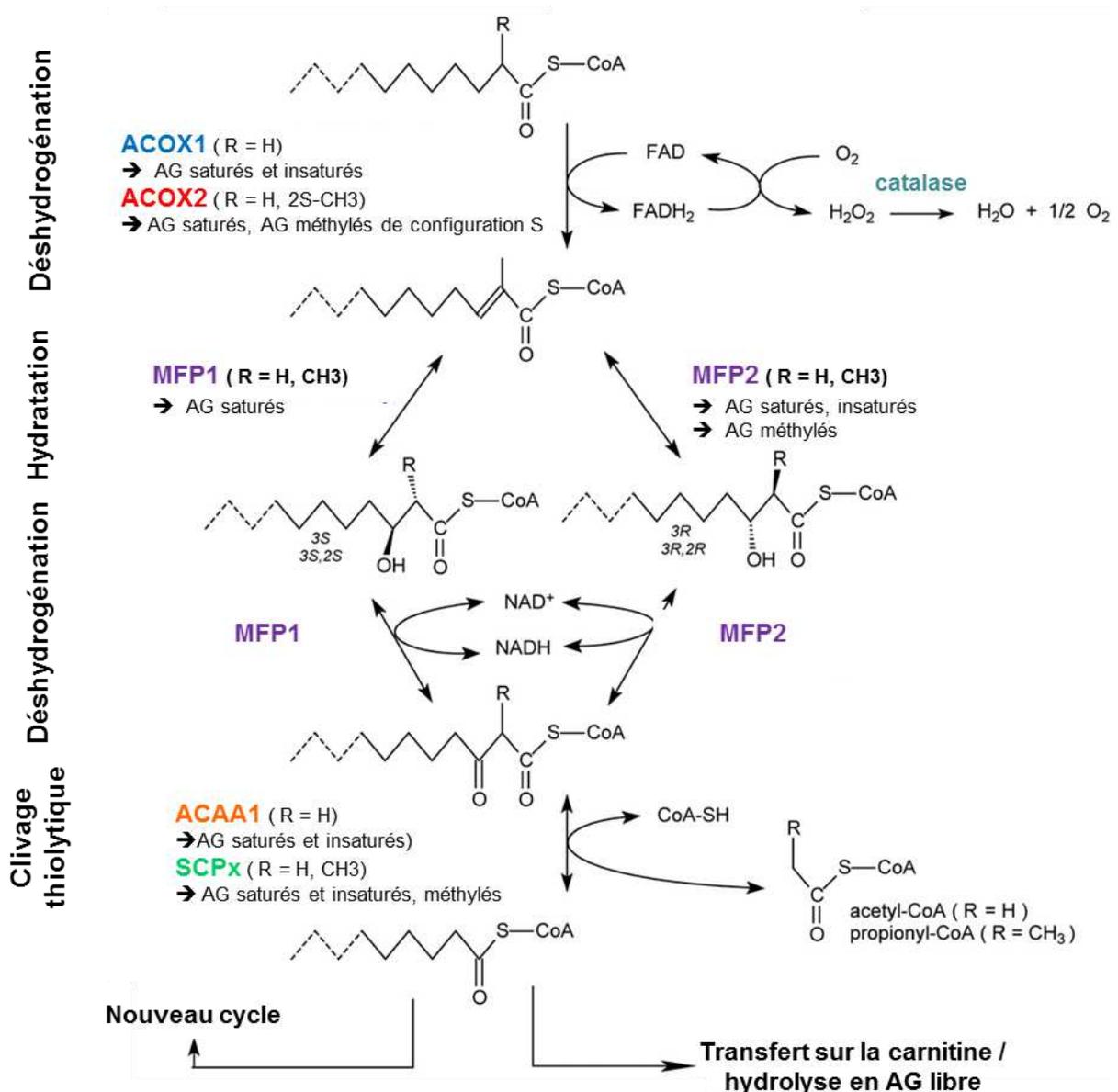


Figure 5 : La β -oxydation peroxysomale.

La première étape de déshydrogénation nécessite l'intervention d'une acyl-CoA oxydase (ACOX). Chez l'Homme il existe 2 ACOX qui possèdent des spécificités de substrat différentes : l'ACOX1 prend en charge les AG saturés et insaturés, tandis que l'ACOX2 prend en charge les AG saturés et les AG méthylés exclusivement de configuration S. Les AG méthylés de configuration R, tels que les précurseurs des acides biliaires, passent au préalable par une étape d'isomérisation catalysée par la 2-méthylacyl-CoA racémase (étape non montrée ici). Il existe 2 protéines multifonctionnelles (MFP, « MultiFunctional Protein ») qui assurent les étapes d'hydratation et de déshydrogénation : MFP1 ou LBP s'occupe uniquement des AG saturés, tandis que MFP2 ou DBP (« D-Bifunctional Protein ») s'occupe des AG saturés, insaturés et des AG méthylés sur leur carbone α . Enfin, le clivage des AG implique deux thiolases différentes : ACAA1 (« Acetyl-Coenzyme A Acyltransferase 1 ») qui dégrade les AG saturés et insaturés, et produit de l'acétyl-CoA, et SCPx (« Sterol Carrier Protein x ») qui dégrade en plus les AG méthylés tels que l'acide pristanique ou les précurseurs des acides biliaires, en produisant du propionyl-CoA. [Adapté de (Van Veldhoven 2010)]

- Le devenir des acides gras après la β -oxydation : la sortie du peroxyosome

Après un ou plusieurs cycles de β -oxydation, les AG raccourcis, ainsi que l'acétate et le propionate formés, sont toujours estérifiés au CoA et donc incapables de traverser la membrane peroxyosomale. Toutefois, il existe différentes stratégies pour séparer les AG du CoA et leur permettre de quitter le peroxyosome (Figure 6) (Antonenkov *et al.* 2012). L'AG peut être transféré sur une petite molécule très hydrophile, la carnitine, par différentes enzymes : la carnitine acétyl-transférase (CRAT) qui prend en charge l'acétyl-CoA et le propionyl-CoA, et la carnitine octanoyl-transférase (CROT) qui est spécifique des AG à chaîne moyenne liés au CoA. Les molécules obtenues sont plus petites et plus solubles que leurs homologues thioestérifiés et seraient alors capables de traverser la membrane à travers un canal formé par PXMP2. Après leur sortie du peroxyosome, les AG liés à la carnitine sont convertis en acyl/acétyl-CoA par la carnitine acyl-transférase, soit au niveau de la mitochondrie, soit dans le cytosol. Une deuxième voie de sortie des produits de la β -oxydation peroxyosomale est leur hydrolyse en AG libre et CoA. Cette réaction fait intervenir une acyl-CoA thioestérase (ACOT), dont il existe chez l'Homme 2 membres localisés dans le peroxyosome ; ACOT4 et ACOT8 (Hunt *et al.* 2012). Après hydrolyse, les AG libres plus solubles, seraient capables de sortir du peroxyosome par diffusion au travers de canaux, formés entre autre par PXMP2, mentionné ci-dessus.

III.1.2. L' α -oxydation

Dans le peroxyosome, les AG méthylés au niveau du carbone β sont incapables d'être dégradés par β -oxydation. Leur métabolisation passe nécessairement par un cycle d' α -oxydation qui les raccourcit d'un atome de carbone et les convertit en AG α -méthylés (Wanders *et al.* 2011). Cette voie a principalement été décrite pour la dégradation de l'acide phytanique provenant essentiellement de l'alimentation. Avant d'être α -oxydé dans le peroxyosome, l'acide phytanique doit être activé en phytanoyl-CoA dans le cytoplasme. Deux synthétases sont susceptibles de catalyser cette réaction : ACSL1 (Lewin *et al.* 2002) et ACSVL1 (Jansen *et al.* 2001). Le transport de l'acide phytanique dans le peroxyosome nécessiterait ensuite l'intervention du transporteur ABCD3 (Visser *et al.* 2007). Concernant le phytol, sa métabolisation aboutit après 4 réactions enzymatiques à la formation de phytanoyl-CoA, directement dans le peroxyosome.

Une fois dans le peroxysome, le phytanoyl-CoA est oxydé par la phytanoyl-CoA hydroxylase. Le 2-hydroxyphytanoyl-CoA obtenu est alors clivé en pristanal et formyl-CoA par la 2-hydroxyphytanoyl-CoA lyase (2-HPCL). La dernière étape consiste à convertir le pristanal en acide pristanique et implique l'intervention d'une déshydrogénase peroxysomale (Jansen *et al.* 2001; Ashibe *et al.* 2007). L'acide pristanique obtenu après α -oxydation de l'acide phytanique, est ensuite activé par une synthétase peroxysomale puis dégradé grâce à 3 cycles de β -oxydation.

III.1.3. La dégradation des acides gras dicarboxyliques

Dans le foie humain, les AGTLC peuvent être modifiés par ω -oxydation au niveau microsomal, puis dégradés dans le peroxysome par β -oxydation (Sanders *et al.* 2005). La synthèse des acides dicarboxyliques se déroule en trois étapes. La première étape consiste à convertir le groupement méthyl porté par le carbone ω de l'AG, en un groupement hydroxyle. Cette étape d'hydroxylation fait intervenir deux enzymes de la sous-famille CYP4F des CYP450 : CYP4F2 et CYP4F3B (Sanders *et al.* 2006). Dans la majorité des cas, l'AG serait ensuite oxydé en AG dicarboxylique grâce l'intervention d'une alcool-déshydrogénase non identifiée dont l'activité dépend du NAD⁺ (Nicotinamide Adénine Dinucléotide), et d'une déshydrogénase (FALDH, « Fatty ALdehyde DeHydrogenase ») (Sanders *et al.* 2008). Une seconde voie minoritaire, impliquerait les 2 enzymes CYP4F2 et CYP4F3B qui catalyseraient deux réactions supplémentaires d'hydroxylation de l'AG ω -oxydé, afin de synthétiser un AG dicarboxylique (Sanders *et al.* 2008). Après leur synthèse, les AG dicarboxyliques pourraient rejoindre le peroxysome, probablement grâce au transporteur ABCD3 (Kemp *et al.* 2011), et être métabolisés par β -oxydation. De façon très intéressante, le mécanisme d' ω -oxydation pourrait constituer une voie de secours chez les patients atteints d'X-ALD. En effet, ceux-ci présentent une déficience en *ABCD1*, qui se traduit notamment par une accumulation plasmatique et tissulaire d'AGTLC. Cependant, alors que la β -oxydation des AGTLC est réduite chez les patients atteints d'X-ALD, la β -oxydation des AG dicarboxyliques n'est pas altérée. Les AGTLC rejoignent très probablement le peroxysome grâce au transporteur ABCD1, tandis que les AG dicarboxyliques seraient pris en charge par ABCD3. L'induction de la voie d' ω -oxydation chez les patients présentant une déficience en *ABCD1*, pourrait permettre de diminuer l'accumulation des AGTLC en restaurant leur importation dans le peroxysome et leur dégradation.

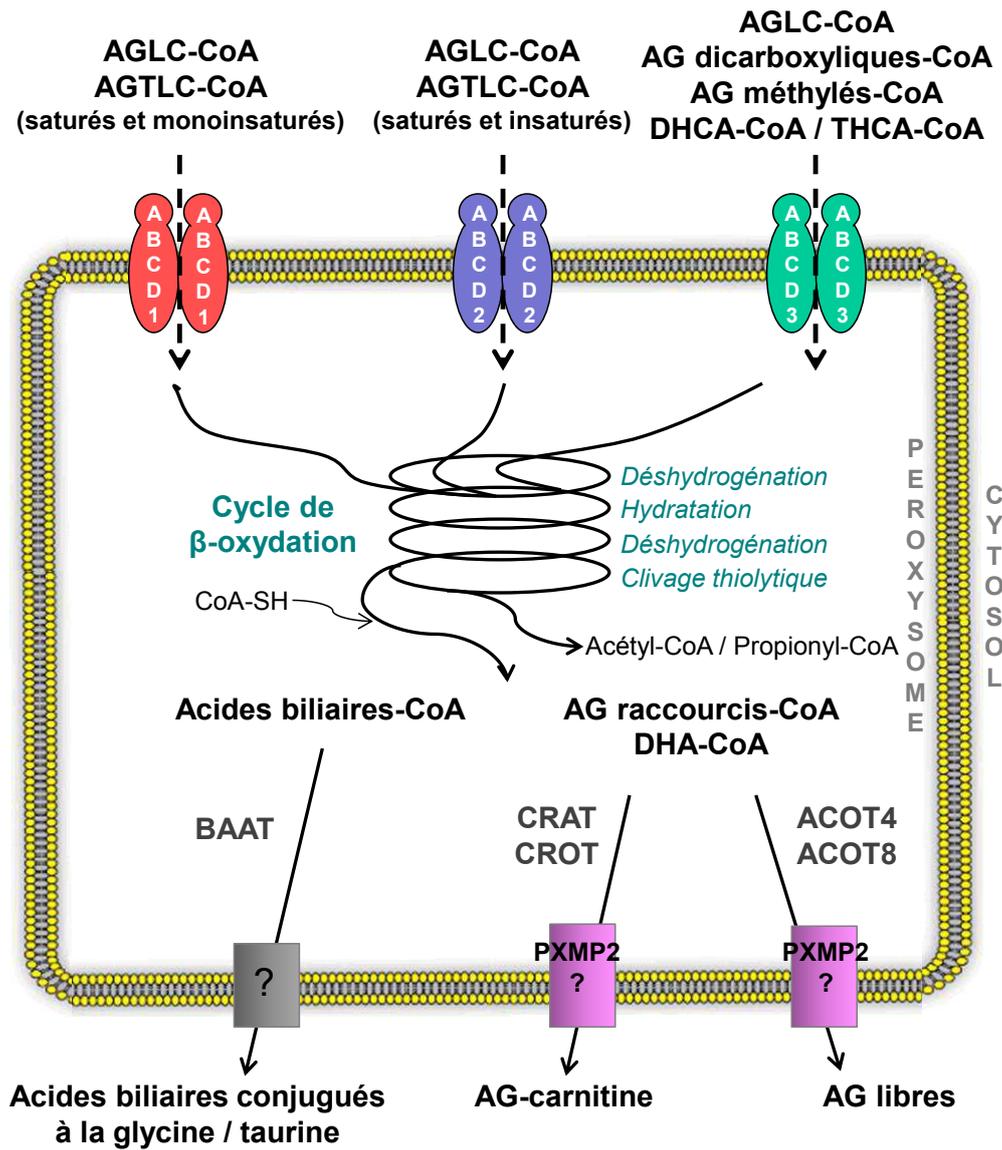


Figure 6 : Schéma global de la β-oxydation peroxysomale chez l'Homme.

(AGLC : Acide Gras à Longue Chaîne, AGTLC : Acide Gras à Très Longue Chaîne, DHCA : Acide DiHydroxyCholestanôïque, THCA : Acide TriHydroxyCholestanôïque, BAAT : « Bile Acid-CoA : Amino acid N-acyl Transferase », CRAT : Carnitine Acétyl-Transférase, CROT : Carnitine Octanoyl-Transférase, ACOT : Acyl-CoA Thioestérase). [Adapté de (Hunt et al. 2008; Kemp et al. 2011)]

III.2. La synthèse de lipides

III.2.1. Synthèse d'acides gras polyinsaturés

Parallèlement à son rôle dans la dégradation des AG à très longue chaîne, la β -oxydation peroxysomale est également impliquée dans la synthèse d'AG polyinsaturés, tels que l'acide docosahexanoïque (C22:6 n-3, DHA) (Ferdinandusse *et al.* 2001; Su *et al.* 2001) ou encore l'acide arachidonique (C20:4 n-6, AA). Les AG polyinsaturés sont des constituants essentiels des membranes, surtout au niveau cérébral, mais aussi des précurseurs des eicosanoïdes et des docosanoïdes. Ils sont produits à partir de deux AG provenant essentiellement de l'alimentation, l'acide α -linoléique (C18:3 n-3) à l'origine du DHA, et l'acide linoléique (C18:2 n-6) qui permet la formation d'AA. Leur synthèse implique plusieurs étapes successives d'élongation et de désaturation dans le réticulum endoplasmique, suivies d'un cycle de β -oxydation dans le peroxysome (Petroni *et al.* 1998). Les enzymes de la voie de β -oxydation impliquées dans la synthèse des AG polyinsaturés sont¹ l'ACOX1, MFP2 et les 2 thiolases SCPx et ACAA1 (Figure 5) (Ferdinandusse *et al.* 2001; Van Veldhoven 2010). L'importation des précurseurs dans le peroxysome ferait intervenir le transporteur ABCD2 qui transporterait préférentiellement les AG polyinsaturés (Fourcade *et al.* 2009; Genin *et al.* 2011; van Roermund *et al.* 2011).

Après sa synthèse, le DHA doit sortir du peroxysome et rejoindre le réticulum endoplasmique afin d'être incorporé dans les phospholipides. On peut se demander pourquoi à la différence du C24:6 n-3 qui est son précurseur direct, le DHA (C22:6 n-3) n'entre pas à son tour dans un cycle de β -oxydation ? D'après des mesures de β -oxydation dans des fibroblastes cutanés, le C24:6 n-3 est métabolisé 2,7 fois plus rapidement que le DHA (Ferdinandusse *et al.* 2003). Cette différence s'expliquerait pas le fait que le DHA-CoA est hydrolysé plus rapidement que le C24:6 n-3 et pourrait donc être transporté plus rapidement dans le réticulum endoplasmique sous forme d'AG libre. De plus, à la différence du C24:6 n-3, la β -oxydation du DHA nécessite l'intervention préalable d'une réductase et d'une isomérase. Ces étapes supplémentaires pourraient freiner la β -oxydation du DHA (Novikov *et al.* 1999; Sprecher 2000; De Nys *et al.* 2001) et ainsi favoriser sa sortie du peroxysome après hydrolyse, puis son intégration dans différentes classes de lipides.

¹ Voir page 22 : La β -oxydation

III.2.2. Synthèse des éthers-glycérophospholipides

Les glycérophospholipides (GP) sont les constituants majoritaires des membranes cellulaires et sont divisés en 2 classes, les esters- et les éthers-GP. Ces derniers comportent un alcool gras à chaîne longue en position *sn-1* du glycérol-3-phosphate, essentiellement du C16:0 ou du C18 saturé ou monoinsaturé, relié par une liaison éther. L'AG acylé en position *sn-2* est un AG polyinsaturé. La majorité des éthers-GP sont des plasmalogènes ou plasményl-lipides, qui comportent une liaison vinyl-éther tandis que les plasmanyl-lipides, comme le facteur d'activation plaquettaire (PAF, « Platelet Activating Factor »), comportent une simple liaison éther. La synthèse de l'ensemble des éthers-GP, essentiellement hépatique, débute dans le peroxyosome en suivant une seule voie (Braverman *et al.* 2012). Elle commence au sein d'un complexe formé de deux enzymes exclusivement peroxyosomales, la GNPAT (« GlyceroNePhosphate O-Acyl Transferase ») et l'AGPS (« AlkylGlycerone Phosphate Synthase »). Un AG, probablement issu de la β -oxydation peroxyosomale, est acylé en position *sn-1* sur une molécule de dihydroxyacétone phosphate (DHAP) grâce à la GNPAT, avant d'être échangé contre un alcool gras par l'AGPS. Le 1-O-alkyl-DHAP formé est ensuite réduit par l'acyl/alkyl-DHAP, associée dans le cytosol à la membrane peroxyosomale et à la membrane endosomale. La fin de la voie de synthèse des éthers-GP est localisée dans le réticulum endoplasmique.

Le rôle des plasmalogènes dans les membranes cellulaires est multiple (Braverman *et al.* 2012). Ils modifient la fluidité membranaire et seraient donc importants dans les phénomènes de fission et de fusion des membranes, ainsi que dans la transduction de signaux au niveau des radeaux lipidiques. De plus, ils auraient un rôle d'antioxydants dans les membranes et pourraient également constituer un réservoir d'AG polyinsaturés (DHA et AA), susceptible de leur conférer un rôle important dans la régulation de la réponse inflammatoire (Ifuku *et al.* 2012).

III.2.3. Synthèse des acides biliaires primaires

Dans le foie, le peroxyosome intervient dans la synthèse des acides biliaires primaires : l'Acide Cholique (CA) qui est formé à partir de THCA, et l'Acide ChénoDésoxyCholique (CDCA), formé à partir de DHCA (Ferdinandusse *et al.* 2009; Van Veldhoven 2010). Le THCA et le DHCA sont deux intermédiaires de la voie de synthèse "classique" des acides biliaires et

dérivent du cholestérol. Leur synthèse dans la mitochondrie intervient après modifications du noyau stéroïdien dans les microsomes puis dans le cytosol et consiste en l'oxydation de la chaîne stéroïde. Avant d'être importés dans le peroxyosome, ils sont estérifiés respectivement en THC-CoA et DHC-CoA, probablement au niveau du réticulum endoplasmique. Deux synthétases sont susceptibles de réaliser cette activation : l'ACSVL1, associée au réticulum endoplasmique mais également au peroxyosome (Jansen *et al.* 2001), et la BACS (« bile acyl-CoA synthetase » ou ACSLV6), localisée au niveau du réticulum endoplasmique (Mihalik *et al.* 2002). Une fois activés, ils seraient pris en charge par le transporteur ABCD3 qui probablement les hydrolyse et les importe dans le peroxyosome, où ils devront être réactivés par une synthétase (Visser *et al.* 2007; van Roermund *et al.* 2012). Avant de s'engager dans la voie de β -oxydation, la configuration R du groupement méthyl porté par la chaîne stéroïde est inversée grâce à l'intervention d'une racémase, l'AMACR (« α -MethylAcyl-CoA Racemase »).

Les enzymes participant à la β -oxydation du THC-CoA et du DHC-CoA sont² l'ACOX2, la DBP et la SCPx (Figure 5). Après un cycle de β -oxydation, la chaîne stéroïde est raccourcie de 3 atomes de carbone, libérés sous forme de propionyl-CoA. Les acides biliaires formés (CA ou CDCA) sont ensuite conjugués à un acide aminé, la taurine ou la glycine, par la BAAT (« Bile Acid-CoA : Amino acid N-acyl Transferase ») Cette conjugaison aboutit à la formation de sels biliaires (He *et al.* 2003; Pellicoro *et al.* 2007) qui sont ensuite exportés du peroxyosome, puis quittent les hépatocytes pour rejoindre la bile (Figure 6).

III.3. Le métabolisme de l'oxygène

Le peroxyosome est étroitement lié au métabolisme de l'oxygène, comme en témoigne le nom qui lui a été attribué par de Duve, en lien avec la présence dans cet organite d'oxydase capable de former du peroxyde d'hydrogène (Fransen *et al.* 2012). Avec d'autres organites, tels que la mitochondrie ou encore le réticulum endoplasmique, le peroxyosome génère la formation d'espèces réactives de l'oxygène (ERO). Celles-ci sont produites ordinairement au cours des nombreuses voies métaboliques qui siègent dans le peroxyosome, lors de l' α - et de la β -oxydation d'AG, lors de la synthèse des acides biliaires ou encore du métabolisme du glyoxylate (Antonenkova *et al.* 2010). Ainsi, le peroxyosome génère du peroxyde d'hydrogène, H₂O₂, principalement grâce à des flavoprotéines telles que les ACOX. Une autre enzyme, la

² Voir page 22 : La β -oxydation

xanthine oxydase (XDH) engendre la formation de radicaux superoxydes ($O_2\cdot^-$) et nitroxydes ($NO\cdot$). De plus, d'autres ERO peuvent être générées au sein du peroxysome, mais de façon non enzymatique : le radical hydroxyle ($\cdot OH$) obtenu à partir de l' H_2O_2 et le peroxydinitrite ($ONOO^-$) généré à partir de l' $O_2\cdot^-$ et du $NO\cdot$.

Bien que le peroxysome soit responsable de la formation d'ERO, il est également doté d'une machinerie permettant de lutter contre le stress oxydatif. Plusieurs enzymes appartiennent à ce système de défense. Les deux plus connues sont la SOD1 (SuperOxyde Dismutase 1) qui convertit l' $O_2\cdot^-$ en O_2 et H_2O_2 , et la catalase qui est l'une des plus abondantes protéines peroxysomales et qui dégrade l' H_2O_2 . Parallèlement à ces enzymes, de plus petites molécules antioxydantes comme le glutathion, l'acide ascorbique ou encore les plasmalogènes, luttent également contre le stress oxydant généré dans le peroxysome.

III.4. La détoxification du glyoxylate

Chez l'homme, le peroxysome contient une enzyme, l'Alanine:Glyoxylate aminoTransférase (AGT) capable de convertir le glyoxylate en glycine, en utilisant l'alanine qu'elle transforme en pyruvate. Le glyoxylate est une molécule intermédiaire du métabolisme de la glycine, de l'hydroxyproline ou encore du glycolate (Salido *et al.* 2012). Il peut être généré dans la mitochondrie, le cytosol et le peroxysome. Cependant, le glyoxylate produit dans le cytosol et la mitochondrie pourrait être importé par les canaux PXMP2 dans le peroxysome. Le peroxysome pourrait donc constituer le compartiment majeur de la détoxification du glyoxylate. Il éviterait ainsi sa conversion en oxalate, molécule qui ne peut être métabolisée et doit absolument être éliminée dans les urines, sans quoi elle peut précipiter, entraînant des dommages tissulaires.

IV. PATHOLOGIES ASSOCIEES AU PEROXYSOME

Le peroxysome est impliqué dans de nombreuses voies métaboliques comme la synthèse des acides biliaires et des plasmalogènes, la dégradation des AG à très longue chaîne, méthylés, saturés ou insaturés ou encore le métabolisme de l'oxygène. Plusieurs pathologies lui sont associées et sont classées en deux catégories, les PBD (« Peroxisome Biogenesis Disorders ») dues à des troubles de la biogenèse des peroxysomes et les déficiences en une enzyme peroxysomale appelées PED (« Peroxisomal Enzyme Deficiency »). L'ensemble de ces maladies génétiques rares est répertorié sur le catalogue en ligne OMIM (« Online Mendelian

Inheritance in Man », omim.org) et également en partie sur la base de données européenne orphanet (orpha.net).

IV.1. Les troubles de la biogenèse des peroxysomes

Les maladies peroxysomales se traduisant par un trouble de la biogenèse des peroxysomes concernent environ 1300 patients répertoriés. Ce sont des maladies autosomales récessives, dues à des mutations au niveau de 14 des gènes *PEX* (Waterham *et al.* 2012). Ces gènes codent les protéines PEX qui sont impliquées dans la formation des membranes et/ou l'importation des protéines matricielles peroxysomales (Tableau 1). On distingue deux catégories de maladies liées à un trouble de la biogenèse des peroxysomes : la chondrodysplasie ponctuée rhizomélrique de type 1 (RCDP, « Rhizomelic ChondroDysplasia Punctata ») due à une mutation dans le gène *PEX7*, et les maladies du spectre Zellweger (ZSS, « Zellweger Syndrome Spectrum ») causées par une mutation dans l'un des 13 autres gènes *PEX*.

IV.2. Les déficiences en une enzyme peroxysomale

Le peroxysome renfermerait une cinquantaine d'activités enzymatique, dont la plupart lui sont spécifiques (Wanders *et al.* 2006a). Parmi les enzymes peroxysomales, 9 sont associées à des pathologies rares à transmission autosomique récessive et sont impliquées dans diverses voies métaboliques : la biosynthèse des éthers-GP, l' α et la β -oxydation d'AG et la détoxification du glyoxylate (Wanders *et al.* 2006b) (Tableau 1).

IV.3. Les autres maladies peroxysomales

D'autres maladies associée au peroxysome ne sont ni dues à un problème de biogenèse, ni à la déficience en une enzyme directement impliquée dans le métabolisme du peroxysome (Tableau 1). Ainsi, la plus fréquente des maladies peroxysomales, l'X-ALD (MIM #300100) est due à une mutation dans le gène *ABCD1* qui code un transporteur ABC peroxysomal impliqué dans l'importation des AGTLC.

INTRODUCTION
CHAP 1 : LE PEROXYOSOME

| | Désordres peroxysomaux | Protéines Impliquées Fonction | Manifestations biochimiques | | | | | Signes cliniques et symptômes |
|---|--|---|-----------------------------|---------|--------|-----------|--|--|
| | | | AGTLC | Ac Pris | Ac Phy | DHCA THCA | PL | |
| Trouble de la biogenèse des peroxysomes | Maladies du spectre Zellweger ZS (MIM #214100) NALD (MIM #202370) IRD (MIM #266510) | PEX1, 2, 3, 5, 6, 10, 11β, 12, 13, 14, 16, 19, 26 <u>Biogenèse des peroxysomes</u> | ↑ | ↑ | ↑ | ↑ | ↓ | Problèmes hépatiques, retard variable du développement neuronal, rétinopathie surdité. (ZS = phénotype le plus sévère : la plupart du temps, décès avant l'âge de 1 an) |
| | RCDP de type 1 (MIM #215100) | PEX7 <u>Importation des protéines matricielles</u> | N | N | ↑ | N | ↓ | Raccourcissement proximal des membres, dysmorphisme facial, microencéphalie, petite taille, retard psychomoteur, développement de cataracte, |
| Déficiência en une enzyme peroxysomale | P-NALD (MIM #264470) | ACOX1 <u>β-oxydation</u> | ↑ | N | N | N | N | Hypotonie néonatale, retard fréquent de croissance, régression neurologique (âge moyen des patients : 28 mois) |
| | Déficiência en enzyme DPB (MIM #261515) | DPB <u>β-oxydation</u> | ↑ | ↑ | ↑ | ↑ | N | Seconde pathologie peroxysomale la plus fréquente. Hypotonie néonatale, épilepsie, absence de développement moteur, problèmes visuels et de croissance. |
| | Déficiência en SCPx (MIM #613724) | SCPx <u>β-oxydation</u> | N | ↑ | N | ↑ | N | Tremblement dystonique de la tête, atteinte neurologique et motrice. |
| | Déficiência en AMACR (MIM #614307) | AMACR <u>β-oxydation</u> | N | ↑ | ↑ | ↑ | N | Troubles hépatiques, neuropathie sensorielle. |
| | RCDP de type 2 (MIM #222765) | GNAPT <u>Synthèse des éthers-GP</u> | N | N | N | N | ↓ | Mêmes caractéristiques cliniques que la RCDP de type 1 |
| | RCDP de type 3 (MIM #600121) | AGPS <u>Synthèse des éthers-GP</u> | N | N | N | N | ↓ | |
| | Maladie de Refsum (MIM #266500) | Phytanoyl-CoA hydroxylase <u>α-oxydation</u> | N | N | ↑ | N | N | Premiers signes cliniques à l'adolescence : baisse de la vision nocturne, polyneuropathie distale motrice chronique. |
| | Hyperoxalurie primitive de type 1 (MIM #259900) | AGT <u>Détoxification du glyoxylate</u> | N | N | N | N | N | Perte progressive de la fonction rénale, trouble du rythme cardiaque, hypertension artérielle, mise en place d'un état grabataire. |
| Acatalasiémie (MIM #614097) | Catalase <u>Métabolisme de l'H₂O₂</u> | N | N | N | N | N | Maladie asymptomatique ou parfois développement d'ulcères, gangrène au niveau de la bouche, diabète sucré. | |
| Autres maladies peroxysomales | X-ALD (MIM #300100) | ABCD1 <u>Import des AGTLC</u> | ↑ | N | N | N | N | Pathologie peroxysomale la plus fréquente. Deux formes majeures : forme cérébrale infantile sévère (CCALD, « Childhood cerebral ALD ») et AdrénoMyéloNeuropathie (AMN). |
| | Déficiência en DLP-1 | DLP-1 <u>Division des peroxysomes</u> | N | N | N | N | N | Absence de développement neurologique, décès rapide de l'enfant. |

Tableau 1 : Récapitulatif des différentes maladies peroxysomales.

Celles-ci sont classées en trois groupes : les maladies liées au trouble de la biogenèse peroxysomale, les maladies liées à une déficiência en une enzyme peroxysomale, et les autres maladies peroxysomales. Pour chaque maladie, les profils de déficiência en AG métabolisés dans le peroxysome sont indiqués (AGTLC : Acide Gras à Très Longue Chaîne, Ac Pris : Acide Pristanique, Ac Phy : Acide Phytanique, DHCA et THCA : di- et tri- HydroxyCholestanoïque, PL : plasmalogènes, N : niveau normal), (ZS : « Zellweger Syndrome », NALD : Adrénoleucodystrophie Néonatale, IRD : maladie infantile de Refsum, RCDP : « Rhizomelic ChondroDysplasia Punctata », P-NALD : pseudo-Adrénoleucodystrophie Néonatale) [Adapté de (Wanders et al. 2006a)]

CHAPITRE 2 :
L'ADRENOLEUCODYSTROPHIE
LIEE AU CHROMOSOME X

I. GENERALITES

L'adrénoleucodystrophie liée au chromosome X est une maladie génétique héréditaire qui touche un nouveau-né sur 17 000 (Bezman *et al.* 2001). Dans 96% des cas, la mutation provient de l'un des deux parents (Wang *et al.* 2011). Le gène affecté dans cette maladie est le gène *ABCD1* (*ALD*, « AdrenoLeukoDystrophy »), localisé sur le chromosome X, et qui code un transporteur peroxysomal impliqué dans l'importation des AGTLC (Mosser *et al.* 1993). A ce jour, 610 mutations différentes ont été recensées (<http://www.x-ald.nl>), dont 50% correspondent à des mutations faux-sens, 29% à un décalage du cadre de lecture, et le reste à des mutations non-sens, des insertions ou délétions de nucléotides ou encore à des délétions d'exon(s). Les mutations aboutissent en majorité (77%) à l'absence de protéine détectée en immunofluorescence. Cependant la plupart des patients X-ALD exprimerait en réalité le transporteur *ABCD1*, mais à un niveau très bas, en dessous du seuil de détection de la technique d'immunofluorescence (Zhang *et al.* 2011). Une particularité de l'X-ALD est l'absence de relation entre le génotype et le phénotype. Par exemple, une même mutation affectant six membres d'une famille a conduit au développement de cinq phénotypes différents (Berger *et al.* 1994). De manière encore plus surprenante, deux jumeaux monozygotes peuvent présenter des symptômes cliniques totalement différents (Korenke *et al.* 1996). La physiopathogenèse de l'X-ALD reste un point encore mal compris et freine la mise en place d'une thérapie efficace pour les patients.

II. DESCRIPTION CLINIQUE

Très peu d'individus atteints d'X-ALD sont asymptomatiques. Pour la plupart d'entre eux, le diagnostic a été effectué avant les manifestations cliniques, souvent suite à la découverte de la maladie dans la famille. Les deux principales formes de l'X-ALD sont l'adrénomyélonéuropathie (AMN) et l'adrénoleucodystrophie cérébrale (CALD) (Engelen *et al.* 2012; Kemp *et al.* 2012).

II.1. L'adrénomyélonéuropathie

L'AMN est la forme la plus courante d'X-ALD. Chez les hommes, elle se manifeste à l'âge adulte principalement entre 20 et 30 ans ou à partir de 50 ans et concerne pratiquement tous les patients. Elle touche également les femmes hétérozygotes qui sont pourtant

majoritairement asymptomatiques, mais à un âge plus avancé par rapport aux hommes. Ainsi après 60 ans, 65% d'entre elles développent une AMN, qui progresse tout de même plus lentement que chez les hommes.

Au niveau clinique, ce phénotype est caractérisé par l'apparition de problèmes moteurs tels que des raideurs ou des faiblesses dans les jambes, la perte des sensations dans la partie inférieure des membres ou encore des troubles urinaires. Le phénotype est progressif et les problèmes moteurs peuvent s'aggraver, menant au bout de 10 à 20 ans, à une impotence. Les patients atteints d'AMN présentent une neuropathie périphérique axonale qui peut être démyélinisante ainsi qu'une légère atrophie de la moelle épinière, non démyélinisante et non inflammatoire, et qui peut progresser en même temps que l'aggravation de la myélopathie (Aubourg 2007). Cependant, aucune atteinte n'est observée au niveau du cerveau, si ce n'est parfois des lésions modérées.

Une dizaine d'années après l'apparition des signes cliniques d'AMN, 20% des patients, uniquement masculins, développent une démyélinisation cérébrale. Celle-ci est lente et peut parfois se stabiliser au bout de quelques années, impliquant uniquement des déficits cognitifs légers. Dans d'autres cas, après cette première phase de démyélinisation lente intervient une seconde phase de neuroinflammation, qui correspond à la phase active de la maladie. Chez ces patients, le pronostic et les symptômes rejoignent ceux des enfants atteints de CALD, avec en plus les symptômes de myélopathie déjà présents.

II.2. L'adrénoleucodystrophie cérébrale

La CALD est la forme d'X-ALD la plus sévère et celle qui évolue le plus rapidement. Essentiellement développée par les patients masculins, elle touche en grande majorité les enfants, entre 5 et 12 ans, mais également de façon moindre les adolescents et les adultes. Plus la maladie se déclare tôt, plus le phénotype progresse rapidement, conduisant le patient à un décès précoce.

Au niveau clinique, la CALD est d'abord caractérisée par une détérioration cognitive qui affecte les fonctions visuo-spatiales et visuo-motrices, l'attention, le raisonnement et qui se traduit chez les enfants et les adolescents par une baisse des performances scolaires. Cette phase d'atteinte cognitive dont la durée varie selon les patients, est suivie d'une phase d'atteinte neurologique se caractérisant entre autres par un comportement hyperactif, une

parésie, des troubles de l'audition et de la vision. Cette seconde phase est très évolutive et peut aboutir à la perte du langage et de la marche en quelques semaines, conduisant finalement au décès du patient après 2 à 5 ans d'état végétatif.

Avant la manifestation des premiers symptômes de CALD, l'IRM (Imagerie par résonance magnétique) conventionnelle cérébrale et médullaire des patients est tout à fait normale. L'apparition des signes cliniques coïncide avec la formation de lésions démyélinisantes, qui pour 80% des patients débute dans le splénium du corps calleux, puis s'étend à la matière blanche pariéto-occipitale. D'une manière générale cette première phase de démyélinisation non inflammatoire progresse lentement, surtout chez les adolescents et les adultes. La seconde phase correspond à un processus de démyélinisation inflammatoire qui évolue très rapidement et conduit à une inflammation sévère du cerveau et à la rupture de la barrière hématoencéphalique. Cette phase active de destruction neurologique conduit rapidement au décès du patient. Toutefois, 10% des patients présentant une CALD ne développent pas un tel processus inflammatoire. Dans cette forme d'X-ALD, dite forme cérébrale chronique, le phénomène de démyélinisation stoppe mais peut réapparaître après une dizaine d'année, accompagné d'une inflammation sévère.

II.3. Insuffisance surrénale ou maladie d'Addison

La majorité des patients atteints d'X-ALD développent une insuffisance surrénale, appelée maladie d'Addison. Elle peut se manifester avant l'apparition des premiers symptômes cliniques de l'AMN ou de la CALD, aidant alors au diagnostic des patients, ou bien après que le phénotype X-ALD soit déclaré. Cependant très peu de femmes hétérozygotes, environ 1%, développent une insuffisance surrénale.

La maladie d'Addison est caractérisée par un défaut de sécrétion des hormones produites par la glande surrénale : les glucocorticoïdes et les minéralocorticoïdes. Elle se manifeste par une mélanodermie puis par des crises d'insuffisance surrénale aiguës (douleurs abdominales, vomissements, hypotension et hypoglycémie). L'X-ALD est la première cause d'insuffisance surrénale chez les enfants et la seconde chez les adultes (Aubourg 2007).

III. PHYSIOPATHOGENESE

III.1. Aspect biochimique et métabolique de l'X-ALD

Tous les patients atteints d'X-ALD présentent une accumulation plasmatique et tissulaire d'AG à très longue chaîne (AGTLC, >C22:0) (Igarashi *et al.* 1976; Singh *et al.* 1984). En parallèle à cette accumulation, les patients présentent une déficience en plasmalogènes. Ces GP jouent un rôle important dans la fluidité membranaire, la transduction de signaux et la protection contre le stress oxydatif. Ainsi chez les patients, malgré une faible accumulation des AGTLC dans les régions cérébrales non lésées, une diminution significative des plasmalogènes peut être observée (Khan *et al.* 2008).

III.1.1. L'accumulation des AGTLC dans les tissus et les lipides

Chez les patients atteints d'X-ALD, les AGTLC s'accumulent majoritairement au niveau de la matière blanche du cerveau, du cortex surrénalien, des testicules, et du plasma (Moser 2000). Au niveau cérébral, l'accumulation d'AGTLC est non seulement retrouvée dans les lésions démyélinisantes inflammatoires des patients CALD, mais également dans la matière blanche non lésée (Reinecke *et al.* 1985). L'accumulation d'AGTLC s'effectue principalement au sein de lipides tels que les gangliosides, les phosphatidylcholines (PC), les sphingomyélines, les lysophosphatidylcholines (lysoPC) et les esters de cholestérol (Wilson *et al.* 1993; Singh *et al.* 2010), la plus forte concentration d'AGTLC étant retrouvée dans la fraction des lysoPC (Hubbard *et al.* 2006).

III.1.2. Causes de l'accumulation des AGTLC

Chez les patients atteints d'X-ALD, l'accumulation d'AGTLC est en partie liée à une diminution de leur β -oxydation peroxysomale. Le gène *ABCD1*, responsable de la maladie en cas de mutation, code un transporteur ABC transmembranaire peroxysomal (Mosser *et al.* 1993). Ce transporteur nommé ABCD1, serait chargé de l'importation des AGTLC saturés et monoinsaturés, activés sous forme d'acyl-CoA (van Roermund *et al.* 2008; van Roermund *et al.* 2011). Chez les patients atteints d'X-ALD, déficients en *ABCD1*, les AGTLC ne pourraient pas atteindre le peroxysome et s'accumuleraient en partie sous forme de C24:0-CoA et C26:0-CoA dans le cytosol (Ofman *et al.* 2010).

Le défaut de dégradation des AGTLC n'est pas la seule cause de leur accumulation (Kemp *et al.* 2012). En effet, des fibroblastes issus de patients atteints d'X-ALD, cultivés avec ou sans AGTLC, présentent les mêmes niveaux en C26:0. De plus, un régime pauvre en AGTLC n'aboutit pas chez les patients, à une diminution de la concentration plasmatique en C26:0. Ces résultats s'expliquent par l'origine en partie endogène des AGTLC qui s'accumulent chez les patients. Au niveau métabolique, l'X-ALD se traduit également par une augmentation de l'activité élongase et par conséquent par une augmentation de la synthèse d'AGTLC (Kemp *et al.* 2005). Cette synthèse intervient au niveau de la membrane du réticulum endoplasmique, face au cytosol, et implique un enchaînement de quatre réactions catalysées par des enzymes différentes. La première étape de condensation est l'étape limitante. Elle est assurée par une des 7 élongases, possédant chacune des spécificités de substrats distinctes. La synthèse de C26:0 impliquerait successivement deux élongases : ELOVL6 (« Elongation of very long chain fatty acid ») qui prendrait en charge les AG saturés de 18 à 22 atomes de carbone, puis ELOVL1 qui s'occuperait des AG saturés de 24 à 26 atomes de carbone (Ofman *et al.* 2010). Les trois enzymes assurant la suite de l'élongation sont communes, quel que soit le substrat, ce qui supposerait une sorte de compétition pour la synthèse des différents AG.

III.1.3. Corrélation entre accumulation d'AGTLC et phénotype

Malheureusement, il n'existe aucune corrélation entre le phénotype et le niveau d'accumulation des AGTLC dans le plasma et les tissus. Cependant, il semblerait que les niveaux d'AGTLC dans les régions cérébrales non lésées soient directement corrélés avec le phénotype clinique des malades, ce qui suppose que l'accumulation d'AGTLC précéderait les phénomènes de démyélinisation et d'inflammation (Asheuer *et al.* 2005). De plus, le degré d'accumulation des AGTLC dans les lésions inflammatoires des patients CALD pourrait être corrélé au niveau d'expression de gènes impliqués dans le processus inflammatoire (Paintlia *et al.* 2003).

III.1.4. Conséquences de l'accumulation des AGTLC

- Effets des AGTLC libres

Les AGTLC libres sont capables de s'intégrer dans les membranes et de perturber leur organisation en diminuant la fluidité membranaire (Knazek *et al.* 1983; Whitcomb *et al.* 1988;

Ho *et al.* 1995). Ils auraient un effet toxique sur les cellules, notamment les astrocytes, les neurones et les oligodendrocytes qui semblent être les plus sensibles (Hein *et al.* 2008). *In vitro*, les effets observés sont différents suivant les AGTLC : l'accumulation de C22:0 ou de C24:0 entraînerait une atteinte mitochondriale, tandis que l'accumulation de C26:0 aboutirait à des troubles de l'homéostasie du Ca^{2+} . Les cellules gliales ayant incorporé du C26:0 en forte quantité dans leurs membranes répondent de manière excessive au stress oxydant, libérant de grandes quantités de NO (« Nitric Oxide ») et également d'IL-6 (interleukine) (Di Biase *et al.* 2004). Le traitement d'oligodendrocytes murins par des AGTLC induit un stress oxydatif caractérisé par une augmentation de la production d'ERO, une augmentation de la peroxydation lipidique, de la carbonylation des protéines, et une diminution des défenses antioxydantes (enzymatiques et non enzymatiques) (Baarine *et al.* 2012).

- Effets des AGTLC accumulés dans les lipides

L'accumulation d'AGTLC dans les différentes classes de lipides est susceptible de modifier les propriétés des membranes cellulaires, notamment en termes de fluidité (Singh *et al.* 2010). Ainsi, l'enrichissement des PC en C26:0 sur leur carbone 1, pourrait stabiliser les membranes et ainsi favoriser la libération enzymatique d'AA en sn-2 (Khan *et al.* 2010). La sphingomyéline et le cholestérol libre sont des constituants importants des gaines de myéline, notamment au niveau des radeaux lipidiques. Ainsi, l'accumulation d'AGTLC dans la sphingomyéline et la réduction en cholestérol libre observés dans le cerveau de patients atteints d'X-ALD, pourraient affecter les processus régulés dans les microdomaines (Paintlia *et al.* 2003). Une étude récente sur des lymphoblastes issus de patients X-ALD va également dans ce sens (Uto *et al.* 2008) et suppose que l'accumulation d'AGTLC dans les membranes pourrait altérer le « turn-over » de la sous unité gp91^{PHOX} de la NADPH oxydase contenue dans les radeaux lipidiques.

L'accumulation d'AGTLC dans les lipides pourrait également se révéler toxique pour les cellules. Ainsi, les lysoPC qui accumulent la plus grande quantité d'AGTLC au niveau cérébral, semblent être particulièrement toxiques pour les cellules microgliales, cellules du système immunitaire présentes dans le cerveau (Eichler *et al.* 2008). D'autres cellules du système immunitaires sont sensibles à l'accumulation d'AGTLC, tels que les macrophages qui y répondent par une augmentation des phénomènes inflammatoires et oxydatifs (Yanagisawa *et al.* 2008).

III.2. La souris déficiente en *Abcd1*

Plusieurs modèles de souris déficientes en *Abcd1* ont été développés de façon indépendantes, afin d'étudier la physiopathogenèse de l'X-ALD (Forss-Petter *et al.* 1997; Kobayashi *et al.* 1997; Lu *et al.* 1997). Au niveau biochimique, ces souris présentent un défaut de β -oxydation du C26:0 et une accumulation d'AGTLC surtout dans le cerveau et les glandes surrénales, comme chez les patients atteints d'X-ALD (Lu *et al.* 1997). Contrairement aux patients, les souris déficientes en *Abcd1* ne présentent pas d'accumulation plasmatique d'AGTLC. En revanche, elles présentent une augmentation des niveaux plasmatiques en cholestérol (Weinhofer *et al.* 2005a). Malgré l'accumulation d'AGTLC, les souris déficientes pour *Abcd1* commencent seulement à développer des troubles neurologiques et comportementaux à partir de 15 mois (Pujol *et al.* 2002). A partir de 15 mois, elles dévoilent des anomalies de la myéline et des axones dans la moelle épinière, mais pas dans le cerveau. Pourtant, les souris déficientes en *Abcd1* développent très jeunes (3 mois et demi) un stress oxydatif au niveau de la moelle épinière, bien avant que les premiers troubles neurologiques n'apparaissent (Fourcade *et al.* 2008). Finalement, le modèle murin de l'X-ALD présente uniquement un phénotype de type "AMN". Il permet toutefois d'étudier les mécanismes menant à l'accumulation des AGTLC, mais également de tester l'efficacité des thérapies pharmacologiques visant à diminuer l'accumulation des AGTLC ou encore le stress oxydatif.

III.3. Lien entre AGTLC - Stress oxydatif et Inflammation

Si la physiopathogenèse de l'X-ALD est un élément encore mal connu, on sait que l'accumulation d'AGTLC, le stress oxydatif et l'inflammation sont des phénomènes importants dans le développement de la maladie (Figure 7) (Galea *et al.* 2012).

Le stress oxydatif est pour sûr un élément impliqué dans l'X-ALD. En effet, chez les patients symptomatiques on retrouve une augmentation de la peroxydation lipidique et des défenses antioxydantes enzymatiques, tandis que les défenses non enzymatiques sont diminuées (glutathion) (Vargas *et al.* 2004). Mais le stress oxydatif est un élément précoce dans l'évolution de la maladie car il est détecté avant l'apparition des symptômes que ce soit chez les patients atteints d'X-ALD ou chez les souris déficientes en *Abcd1* (Deon *et al.* 2006; Fourcade *et al.* 2008).

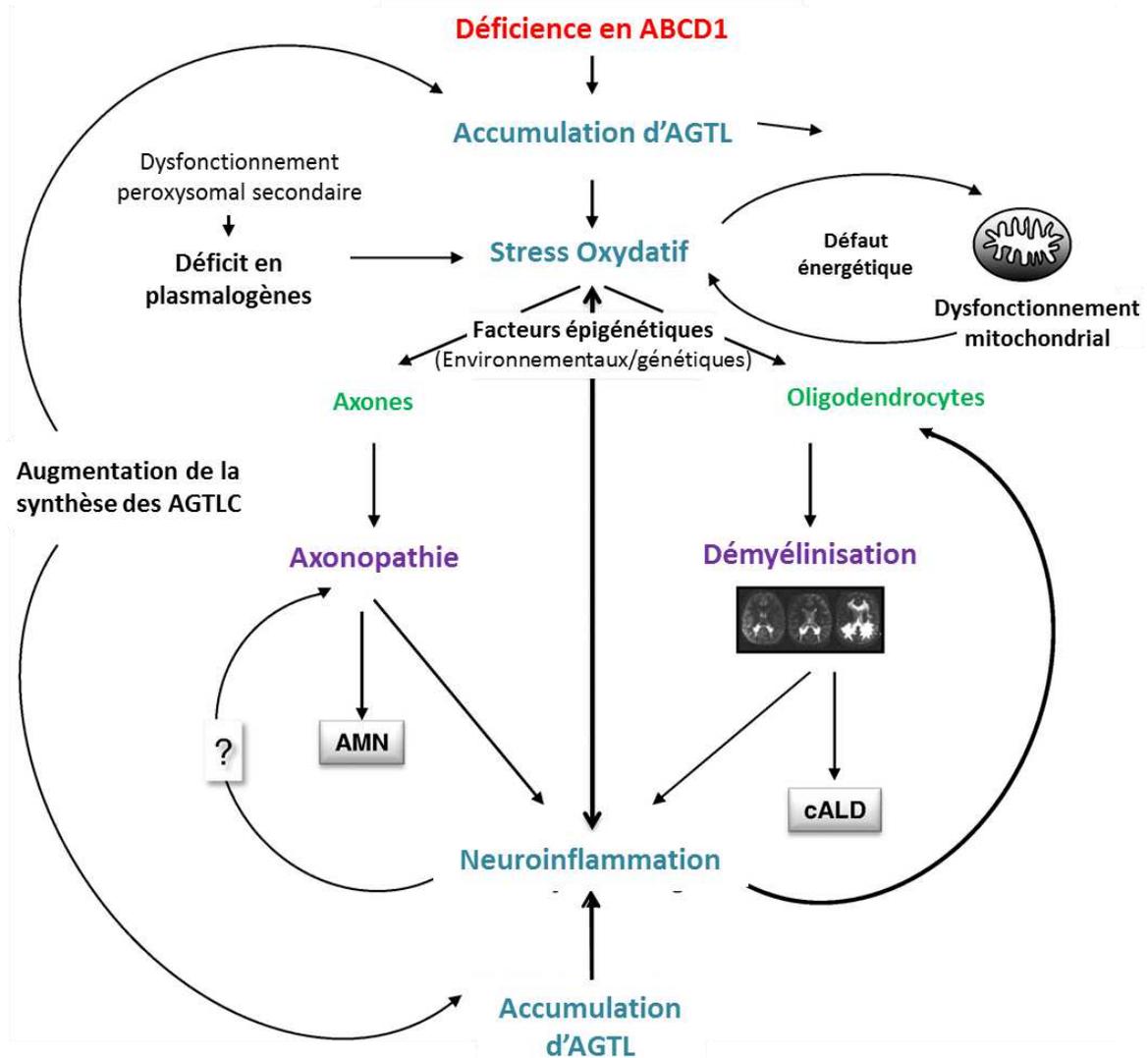


Figure 7 : Evènements physiopathologiques impliqués dans la neurodégénération liée à l'X-ALD. [Adapté de (Galea et al. 2012)]

L'accumulation d'AGTLC semble être la cause directe de l'induction du stress oxydatif (Figure 7) (Fourcade *et al.* 2008). Cependant, le mécanisme précis par lequel les AGTLC entraînent la génération d'ERO reste inconnu. En modifiant la composition des membranes, il est probable que l'accumulation d'AGTLC altère les processus régulés dans les radeaux lipidiques, notamment ceux impliqués dans la signalisation redox (Uto *et al.* 2008). Ils pourraient également stabiliser les membranes et favoriser la libération d'AA des phosphatidylcholines, puis sa transformation en leucotriènes en augmentant l'expression et l'activité de la 5-lipoxygénase (Khan *et al.* 2010). Or les leucotriènes sont des molécules impliquées dans l'inflammation, de par leur propriété chimioattractive et inductrice de mort cellulaire, mais également dans le stress oxydatif, via la modification des résidus cystéines de protéines et de peptides, notamment le glutathion.

L'accumulation d'AGTLC est également associée à la perturbation des mitochondries (Figure 7) (Hein *et al.* 2008; Schluter *et al.* 2012). Plusieurs enzymes clés de la glycolyse et du cycle de Krebs présentent des dommages oxydatifs et sont inactivées, causant l'inhibition de ces 2 voies et l'accroissement du stress oxydatif. Le trouble énergétique serait particulièrement néfaste pour les axones qui présentent un besoin énergétique élevé et pourrait être responsable de la dégénérescence axonale observée chez les patients AMN et les souris déficientes pour *Abcd1* (Galea *et al.* 2012).

La diminution des niveaux en plasmalogènes dans le cerveau des patients atteints d'X-ALD, pourrait également jouer un rôle dans le développement du stress oxydatif (Figure 7), en sensibilisant les cellules aux ERO (Khan *et al.* 2008). D'après une étude menée sur des souris déficientes en *Abcd1*, il semblerait que les plasmalogènes modulent la pathologie causée par l'excès d'AGTLC (Brites *et al.* 2009).

Au niveau cérébral, les oligodendrocytes, les neurones et les astrocytes qui sont sensibles aux AGTLC, sont également très liés d'un point de vue métabolique et surtout fonctionnel. Les oligodendrocytes protègeraient les neurones de la dégénérescence axonale (Kassmann *et al.* 2007), tandis que les astrocytes fourniraient les oligodendrocytes en plasmalogènes et dégraderaient leurs AGTLC (Bottelbergs *et al.* 2010). Dans l'X-ALD, la perturbation d'un type cellulaire aurait finalement des répercussions sur les 2 autres types cellulaires. Les cellules microgliales sont elles aussi touchées. En effet, elles sont totalement absentes des lésions démyélinisantes, tandis qu'en périphérie, elles sont activées et induisent une réponse inflammatoire. Malheureusement elles meurent ensuite par apoptose, ce qui diminue la neuroprotection des cellules à risque, notamment les oligodendrocytes (Eichler *et al.* 2008). Les cellules microgliales interviendraient tôt dans l'évolution des lésions et joueraient donc un rôle important dans la physiopathogenèse de l'X-ALD.

Ainsi, en plus du stress oxydatif, l'X-ALD est également caractérisée par une réponse inflammatoire au niveau cérébral (Figure 7). Le stress oxydatif joue d'ailleurs un rôle dans l'induction de la réponse inflammatoire, au travers des produits de la peroxydation lipidique et des protéines ayant subi des modifications oxydatives. Cependant, l'inflammation peut directement être induite par l'accumulation d'AGTLC, parallèlement au stress oxydatif (Uto *et al.* 2008). Elle ferait suite à l'induction de cytokines pro-inflammatoires, de chimiokines et des récepteurs des chimiokines (Paintlia *et al.* 2003).

De façon intéressante, les niveaux d'expression des cytokines pro-inflammatoires sont augmentés dans la matière blanche morphologiquement normale de patients CALD (Paintlia *et al.* 2003). De plus, des enfants CALD en attente d'une greffe de moelle osseuse et donc ne présentant pas encore de neuroinflammation, montrent une augmentation des niveaux de cytokines pro-inflammatoires dans leur liquide céphalo-rachidien (Lund *et al.* 2012). Le phénomène inflammatoire pourrait concerner tous les patients X-ALD, sans forcément mener à une neuroinflammation.

IV. GENES MODIFICATEURS ET INFLUENCE DE L'ENVIRONNEMENT

L'X-ALD est caractérisée par une absence de corrélation entre génotype et phénotype, ce qui suppose l'intervention de facteurs génétiques et/ou environnementaux dans le développement de la maladie. Comme nous l'avons vu précédemment, la physiopathogenèse de l'X-ALD met en jeu plusieurs processus biochimiques et cellulaires, et de nombreuses pistes ont donc été explorées pour identifier les facteurs modulant la pathologie. Ainsi, des gènes modificateurs pourraient intervenir au niveau du transport des AGTLC (*ABCD2* et *ABCD3*), de leur synthèse ainsi que de leur activation en acyl-CoA (*BG1*, *ACSVL1*, *ELOVL1*), au niveau du processus inflammatoire (gènes du Complexe Majeur d'Histocompatibilité (CMH), *CD1*) ou encore du phénomène de stress-oxydatif (*SOD2*, *CBS*, *Tc2*).

Le transporteur *ABCD1* appartient à la sous famille D des transporteurs ABC qui contient trois autres membres : *ABCD2* et 3, localisés avec *ABCD1* dans la membrane peroxysomale et *ABCD4*, dans la membrane du lysosome. Les transporteurs ABCD peroxysomaux présentent une redondance fonctionnelle, et pourraient moduler la physiopathogenèse de l'X-ALD (Kemp *et al.* 1998; Netik *et al.* 1999). Cependant, d'après des études récentes d'analyse de séquence et d'association, *ABCD2* et *ABCD3* ne seraient pas des gènes modificateurs (Maier *et al.* 2008; Matsukawa *et al.* 2011). En revanche, le niveau d'expression d'*ABCD4* dans la matière blanche non lésée de patients, semble être corrélé avec la gravité de la maladie (Asheuer *et al.* 2005). Selon une récente étude, le transporteur *ABCD4* serait impliqué dans le métabolisme de la vitamine B12 (Coelho *et al.* 2012). De façon intéressante, la transcobalamine 2 (Tc2), servant au transport de la vitamine B12 dans les tissus, possède un variant dont l'affinité pour la vitamine B12 est affectée et qui est plus fréquemment retrouvé chez les patients développant un phénotype cérébral (Linnebank *et al.* 2006a; Semmler *et al.* 2009).

L'X-ALD étant caractérisée par une diminution de l'activité synthétase (Singh *et al.* 1981; Hashmi *et al.* 1986), l'étude des gènes modificateurs s'est également penchée sur les gènes codant des synthétases. Ainsi, le gène *BGI* code une synthétase impliquée dans l'activation des AGTLC, et dont le niveau d'expression dans la matière blanche non lésée de patients semble corrélé avec la gravité de la maladie (Asheuer *et al.* 2005). Si la fonction de la protéine n'est pas clairement définie, sa localisation suit parfaitement les organes affectés dans l'X-ALD : le cerveau, les glandes surrénales et les testicules.

A ce jour, aucune étude n'a rapportée l'importance des élongases dans la variabilité phénotypique de l'X-ALD.

Les gènes impliqués dans le processus inflammatoire, se développant chez les patients CALD, pourraient également être des gènes modificateurs. Pourtant d'après plusieurs études, ni les gènes du CMH de classe I et II (Berger *et al.* 1995; McGuinness *et al.* 1997), ni ceux de la famille génique CD1 codant des glycoprotéines présentatrices d'antigènes lipidiques (Barbier *et al.* 2012), ne seraient impliqués dans la variabilité phénotypique de l'X-ALD .

Concernant les gènes impliqués dans le stress oxydatif, un variant allélique de l'enzyme mitochondriale SOD2 est associé au phénotype cérébral de l'X-ALD (Brose *et al.* 2012). Ce polymorphisme implique une diminution de l'activité SOD2 et donc une diminution du potentiel antioxydant de l'enzyme. Les gènes engagés dans le métabolisme de la méthionine sont également susceptibles de faire partie des gènes modificateurs. En effet, le métabolisme de la méthionine est impliqué dans la synthèse de glutathion, mais également dans la formation de la gaine de myéline et la méthylation de l'ADN (Acide DésoxyriboNucléique). Il est très dépendant de la disponibilité en vitamines (vitamine B12, B6, acide folique) essentiellement issues de l'alimentation. L'enzyme CBS (cystathionine β -synthase), intervenant en amont de la synthèse du glutathion, présente un polymorphisme associé au phénotype AMN (Linnebank *et al.* 2006b).

En plus des gènes modificateurs, des facteurs extérieurs comme l'alimentation pourraient influencer le développement de l'X-ALD. Cette hypothèse est d'autant plus probable que deux jumeaux homozygotes peuvent développer un phénotype différent, malgré un patrimoine génétique totalement identique (Korenke *et al.* 1996). Depuis peu, l'intérêt se porte sur le rôle de la flore intestinale dans le développement des maladies démyélinisantes du système nerveux central (pour revue voir (Ochoa-Reparaz *et al.* 2011)). Certaines cellules

présentatrices d'antigènes, activées par des bactéries intestinales, pourraient migrer au niveau du système nerveux central et moduler les réponses immunitaires dans le cerveau et la moelle épinière. Une modification de la flore intestinale pourrait être envisagée dans le traitement des maladies démyélinisantes. A l'heure actuelle, aucune étude concernant l'influence de la flore intestinale sur la variabilité phénotypique de l'X-ALD n'a été publiée.

V. DIAGNOSTIC DE L'X-ALD

V.1. Diagnostic clinique

Le diagnostic de l'X-ALD peut faire suite à l'apparition de symptômes cliniques chez un individu (Engelen *et al.* 2012) et repose avant tout sur l'IRM. L'X-ALD peut être diagnostiquée chez des individus présentant des lésions au niveau de la matière blanche cérébrale, surtout lorsque les lésions apparaissent au niveau du splénium du corps calleux et que l'injection de gadolinium met en évidence un phénomène inflammatoire (van der Knaap *et al.* 2012). Avant l'apparition des lésions (hypersignal de la matière blanche en séquence T2 et FLAIR, hyposignal en séquence T1), les individus ne présentent pas de symptômes neurologiques.

V.2. Diagnostic biochimique

Lorsque la pathologie est suspectée chez un patient, un dosage plasmatique d'AGTLC est effectué. Chez les hommes, 99,9% des patients atteints d'X-ALD présentent une augmentation du taux en C26:0 et du rapport C26:0/C22:0. Le dépistage des nouveaux nés à partir d'une goutte de sang est réalisable, mais pas encore mis en place (Hubbard *et al.* 2009; Sandlers *et al.* 2012). Il consiste à doser le taux de lysoPC-C26:0 à partir d'échantillons de sang. Les patients atteints d'X-ALD présentent une quantité moyenne de lysoPC-C26:0 dix fois plus élevée que la norme.

V.3. Diagnostic moléculaire

L'augmentation des niveaux d'AGTLC n'étant pas spécifique de l'X-ALD, si l'examen métabolique est positif, il doit être suivi d'un séquençage du gène *ABCD1*. Chez les femmes atteintes de myélopathie, le diagnostic de l'X-ALD est directement confirmé par une

recherche de mutation dans le gène *ABCD1*. En effet, environ 15% des femmes atteintes d'X-ALD présentent un niveau normal d'AGTLC (Moser *et al.* 1983). L'examen génétique systématique au sein des familles où un membre est atteint d'X-ALD, permet de détecter les femmes porteuses de mutation dans le gène *ABCD1*, ainsi que les individus pré-symptomatiques. Lors d'une grossesse, dans un couple où l'un des deux parents est atteint d'X-ALD, un dépistage prénatal peut être réalisé dès la 11^{ème} semaine de grossesse, afin de savoir si le fœtus est porteur de la maladie. Il est crucial de diagnostiquer la maladie le plus tôt possible, car la prise en charge précoce des patients permet d'améliorer leur pronostic.

VI. THERAPIES DE L'X-ALD

VI.1. Thérapie Nutritionnelle : l'Huile de Lorenzo.

L'administration d'huile de Lorenzo dans le cadre d'un régime pauvre en AGTLC, constitue un des rares traitements proposés à ce jour aux patients atteints d'X-ALD (Berger *et al.* 2010). Cette huile comprend un mélange d'acide érucique monoinsaturé (C22:1) sous forme de triglycéride et d'acide oléique monoinsaturé (C18:1) également sous forme de triglycéride, dans un rapport de 4:1. En jouant sur la compétition entre les AG saturés et monoinsaturés au moment de l'élongation, cette thérapie permet de diminuer en quelques semaines les niveaux plasmatiques en C26:0 (Rizzo *et al.* 1989). Après trois mois de traitement, ceux-ci diminuent de 42% chez les enfants présentant un phénotype CALD et de 65% chez les patients asymptomatiques qui retrouvent alors un taux normal en C26:0 (1,4 $\mu\text{mol/L}$) (Deon *et al.* 2008). Malgré la diminution des niveaux d'AGTLC, l'huile de Lorenzo n'empêche ni même n'atténue le phénomène de stress oxydatif chez les patients X-ALD, symptomatiques ou non (Deon *et al.* 2006).

L'efficacité de l'huile de Lorenzo, dans le cadre d'un régime pauvre en AGTLC, reste relativement floue. En effet, elle ne permet pas de stopper la progression des atteintes neurologiques chez les patients CALD et n'empêche pas l'apparition du phénotype inflammatoire chez les patients AMN (Aubourg *et al.* 1993; van Geel *et al.* 1999). Cependant, d'après une étude récente réalisée sur 89 jeunes patients asymptomatiques, ce traitement diminuerait les risques de développer un phénotype cérébral inflammatoire (Moser *et al.* 2005). De plus, chez des patients avec un phénotype AMN, l'administration d'huile de Lorenzo ralentirait l'évolution de la maladie dans le cas d'une atteinte cérébrale (Moser *et al.*

2007). Cette huile pourrait également améliorer la fonction surrénale des patients AMN avec un phénotype précoce de la maladie d'Addison, notamment en restaurant l'activité du récepteur de l'ACTH (Adrénocorticotrophine) (Cappa *et al.* 2011).

VI.2. Greffe de moelle osseuse et thérapie génique.

A ce jour, la greffe de moelle osseuse constitue la seule réelle thérapie pour les patients présentant un phénotype CALD (Cartier *et al.* 2010). Le premier essai concluant de transplantation de cellules souches hématopoïétiques (HSCT, « Hematopoietic Stem Cell Transplantation ») chez un patient X-ALD, date de 1990 (Aubourg *et al.* 1990). Cette thérapie permet de stopper le processus de démyélinisation cérébrale inflammatoire, et ce environ un an après la transplantation. La transplantation de cellules souches hématopoïétique est surtout réservée aux enfants CALD ne présentant pas de déficits neurologiques et avec des lésions démyélinisantes peu marquées.

Le mécanisme précis par lequel la greffe stoppe le processus de démyélinisation reste encore inconnu. Chez les souris déficientes en *Abcd1*, la transplantation de moelle osseuse permettrait la recolonisation partielle et lente du cerveau, par les cellules microgliales dérivées des cellules souches hématopoïétiques du donneur (Kennedy *et al.* 1997). Cette faible recolonisation (30% un an après la greffe) ne permettrait pas de corriger l'accumulation d'AGTLC au niveau cérébral, à une exception près (Yamada *et al.* 2004). En effet, chez un mâle receveur, une recolonisation un peu plus efficace au niveau du cerveau se serait traduit par une diminution de l'accumulation d'AGTLC. Au niveau de tissus riches en cellules dérivées de la moelle osseuse, tels que la rate et le foie, la recolonisation des organes après transplantation serait élevée (Kennedy *et al.* 1997), et permettrait de diminuer l'accumulation d'AGTLC (Yamada *et al.* 2004). Il semblerait que les cellules issues du donneur corrigent les troubles métaboliques liés à l'X-ALD par contact avec les cellules déficientes en *Abcd1* (Yamada *et al.* 2004).

La thérapie génique constitue une alternative intéressante à la transplantation de cellules souches hématopoïétiques (Cartier *et al.* 2009). Elle consiste à réimplanter les cellules souches du patient qui ont été modifiées génétiquement pour exprimer la protéine déficiente ABCD1. Un mois après la transplantation, environ 25% des cellules sanguines périphériques expriment le transporteur ABCD1 non muté. A ce jour, quatre enfants ont pu bénéficier de la thérapie génique, mais les résultats pour seulement deux d'entre eux ont été publiés. Ces deux

enfants d'environ 7 ans, présentaient un phénotype CALD peu avancé et étaient en attente d'une transplantation de cellules souches hématopoïétique. Aucun donneur n'étant compatible, ils ont pu profiter des premiers essais de la thérapie génique dans le cadre de l'X-ALD. Malgré une faible proportion de cellules souches hématopoïétiques corrigées réintroduites, le processus de démyélinisation fut stoppé chez les deux patients, environ un an après la transplantation. Trois ans après, leurs examens neurologiques sont normaux, mais ils présentent tout de même des déficits cognitifs légers, dus à la progression des lésions au cours de l'année suivant la transplantation.

VI.3. Piste thérapeutique

Depuis une dizaine d'année, la piste d'une thérapie pharmacologique basée sur la redondance fonctionnelle partielle entre les transporteurs ABCD peroxysomaux, a été envisagée. Le chapitre 3 de l'introduction détaille ce phénomène de redondance fonctionnelle entre les transporteurs ABCD peroxysomaux³, et fait un bilan des thérapies pharmacologiques visant à induire l'expression d'ABCD2 et/ou ABCD3 chez les patients atteints d'X-ALD⁴.

³ Voir page 64 : Les transporteurs ABCD peroxysomaux et la redondance fonctionnelle

⁴ Voir page 67 : Les traitements visant à induire l'expression d'ABCD2 et/ou ABCD3

CHAPITRE 3 :
LES TRANSPORTEURS ABCD
PEROXYSOMAX

I. GENERALITES SUR LES TRANSPORTEURS ABC

Les transporteurs membranaires jouent un rôle fondamental dans la cellule, particulièrement dans l'importation de substances nutritives et l'élimination des déchets métaboliques. La superfamille des transporteurs ABC constitue une catégorie importante de transporteurs membranaires. On les retrouve dans tous les types cellulaires, des procaryotes aux eucaryotes. Depuis 1999, afin de faciliter leur identification les 48 transporteurs ABC présents chez l'Homme sont classés en fonction de leur séquence, en 7 sous-familles de ABCA à ABCG, et portent un numéro qui fait souvent référence à l'ordre dans lequel ils ont été découverts. Le premier transporteur à avoir été identifié est la glycoprotéine-P (P-gp), dorénavant nommée ABCB1 (Juliano *et al.* 1976).

Grâce à l'énergie libérée par la fixation et l'hydrolyse d'ATP, les transporteurs ABC déplacent une large variété de substrats à travers les membranes, de façon unidirectionnelle. On distingue plusieurs catégories de transporteurs ABC, notamment en fonction de la direction du transport des substrats. Les exportateurs transportent leurs substrats du cytoplasme, à l'extérieur de la cellule ou à l'intérieur d'un organe. Ils sont présents chez les procaryotes et les eucaryotes, et permettent d'éliminer des xénobiotiques, des toxines, des polysaccharides, des lipides et des stérols. Les importateurs sont retrouvés uniquement chez les procaryotes. Ils transportent les substrats à l'intérieur de la cellule, grâce à l'intervention de protéines PBP (« Periplasmic Binding Protein ») qui fixent le substrat à l'extérieur de la cellule et vont l'apporter au niveau des transporteurs. Chez les procaryotes, les importateurs permettent d'accumuler des substances essentielles comme les acides aminés, les sucres, les ions et des vitamines. Il existe une troisième catégorie de transporteurs ABC qualifiés de "non-transporteurs". Cette catégorie regroupe des canaux perméables aux ions, tel que ABCC7 (CFTR, « Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator »), mais également des protéines qui régulent les canaux ioniques (SUR1, ABCC8). Le fonctionnement de ces protéines dépend bien de l'hydrolyse d'ATP, mais cette hydrolyse ne permet pas en elle-même le transport de substrats. Les "non-transporteurs" comprennent également les transporteurs ABC qui sont dépourvus de domaines transmembranaires. Ces protéines solubles sont impliquées dans l'organisation des chromosomes, la réparation de l'ADN ou encore dans le transport des ARNm (Acide RiboNucléique messenger) en dehors du noyau.

Les transporteurs ABC interviennent dans la plupart des processus biologiques. Chez l'Homme, ils sont associés à de nombreuses maladies génétiques, telles que l'X-ALD ou la mucoviscidose (Tableau 2). Certains transporteurs ABC interviennent également dans la résistance des cellules à des agents chimiothérapeutiques, en les expulsant des cellules. Ce phénomène de résistance est appelé MDR (« Multi Drug Resistance ») et implique 15 transporteurs ABC, dont la P-gp (ABCB1), MRP1 (« Multi Drug Resistance Protein » 1, ABCC1) ou encore BCRP (« Breast Cancer Resistance Protein », ABCG2). La plupart des recherches menées sur les transporteurs ABC porte sur le phénomène MDR et en particulier sur la P-gp.

| Protéine | Nomenclature ABC | Fonction | Maladie associée |
|---------------|------------------|---------------------------------------|----------------------------------|
| ABC1 | ABCA1 | Efflux de cholestérol | Maladie de Tangier |
| ABCR | ABCA4 | Transport de rétinol (vitamine A) | Dégénération maculaire |
| TAP1/2 | ABCB2/B3 | Transport de peptides antigéniques | Déficit immunitaire |
| ABC7 | ABCB7 | Transport de Fer | Anémie et Porphyrine |
| ABCB6 | ABCB6 | Transport mitochondrial de porphyrine | Porphyrie |
| MRP6 | ABCC6 | ? | Pseudoxanthome élastique |
| ALD | ABCD1 | Importation peroxysomale d'AGTLC-CoA | Adrénoleucodystrophie liée à l'X |
| PMP69 | ABCD4 | Régulation du transport de la VitB12? | Carence en Vitamine B12 |
| Stéroline 1/2 | ABCG5/G8 | Efflux de stérols/phytostérols | Sitostérolémie |
| PGY/MDR3 | ABCB4 | Efflux de phosphatidylcholine | Maladies hépatiques |
| BSEP/SPGP | ABCB11 | Efflux d'acides biliaires | |
| MRP2 | ABCC2 | Efflux de bilirubine conjuguée | |
| MDR1 | ABCB1 | Efflux de xénobiotiques hydrophobes | Résistance à la chimiothérapie |
| BCRP/MXR | ABCG2 | | |
| MRP1 | ABCC1 | Efflux de xénobiotiques conjugués | |
| MRP4 | ABCC4 | Efflux de nucléosides conjugués | |
| CFTR | ABCC7 | Canal ionique et régulateur de canaux | Mucoviscidose |
| SUR | ABCC8 | Régulation de canaux potassiques | Hyperinsulinisme congénital |

Tableau 2 : Maladies dues à une déficience en transporteur ABC.
[Adapté de (Linton 2007)]

II. STRUCTURE DES TRANSPORTEURS ABC

Pour être fonctionnel, un transporteur ABC comporte au minimum 4 domaines centraux : deux domaines transmembranaires et deux domaines cytosoliques, de fixation et d'hydrolyse d'ATP (Higgins *et al.* 1986).

Les domaines transmembranaires (TMD) fixent les substrats et conditionnent ainsi la spécificité du transporteur. Ils sont très variables d'un transporteur à l'autre et présentent une faible identité de séquence. Le plus généralement, chacun des deux TMD comporte 6

hélices α qui peuvent former ensemble une poche de fixation du substrat, ouverte du côté cytoplasmique à l'état basal (Aller *et al.* 2009).

Les deux domaines de fixation des nucléotides (NBD, « Nucleotide Binding Domain ») fournissent l'énergie nécessaire au transport des substrats. Ils sont très conservés entre les transporteurs ABC et présentent les motifs caractéristiques de la superfamille ABC. Chaque domaine NBD (environ 200 acides aminés) comprend entre autre :

- un motif appelé Walker A ou P-loop dont la séquence consensus est riche en glycine : GxxG(A/C/S)GKS/T (où x peut être n'importe quel acide aminé),
- un motif Walker B de séquence consensus hhhhD où h est un acide aminé hydrophobe (Walker *et al.* 1982),
- et une séquence caractéristique appelée "signature ABC" ou motif C dont la séquence consensus est LSGG(Q/E). Cette séquence est caractéristique des transporteurs ABC.

Ces 3 motifs sont impliqués dans la fixation et l'hydrolyse d'ATP. Les NBD fonctionnent sous forme de dimère, interagissant en tête à queue ("sandwich inversé"). Au sein d'un transporteur fonctionnel, la dimérisation des NBD crée 2 poches de fixation d'ATP, chaque NBD contribuant à la fixation des 2 molécules. En effet, un site de fixation comprend le Walker A et le Walker B d'un NBD, en association avec la "signature ABC" de l'autre NBD (Smith *et al.* 2002).

Chez l'Homme, les deux TMD et les deux NBD qui sont nécessaires et suffisants au transport des substrats par les transporteurs ABC, peuvent être fusionnés au sein d'une seule protéine ou bien être exprimés séparément. Ainsi, les transporteurs ABC peuvent être qualifiés de transporteurs entiers ou de demi-transporteurs (Figure 8). Un transporteur ABC entier comprend 2 TMD et 2 NBD qui s'enchaînent de la façon suivante : TMD1-NBD1-TMD2-NBD2 (exemple d'ABCB1) (Figure 8A). Certains transporteurs entiers possèdent un TMD supplémentaire : TMD0-TMD1-NBD1-TMD2-NBD2 (exemple d'ABCC1) (Figure 8B). Enfin, les demi-transporteurs ABC, tels que les membres des sous-familles ABCD et ABCG, contiennent seulement un TMD et un NBD et doivent absolument se dimériser afin de constituer un transporteur ABC fonctionnel⁵. Ils peuvent présenter une configuration TMD-NBD comme les transporteurs ABCD (Figure 8C), ou une configuration inversée NBD-TMD comme les transporteurs de la sous-famille G (Figure 8D).

⁵ Voir page 72 : La dimérisation des demi-transporteurs

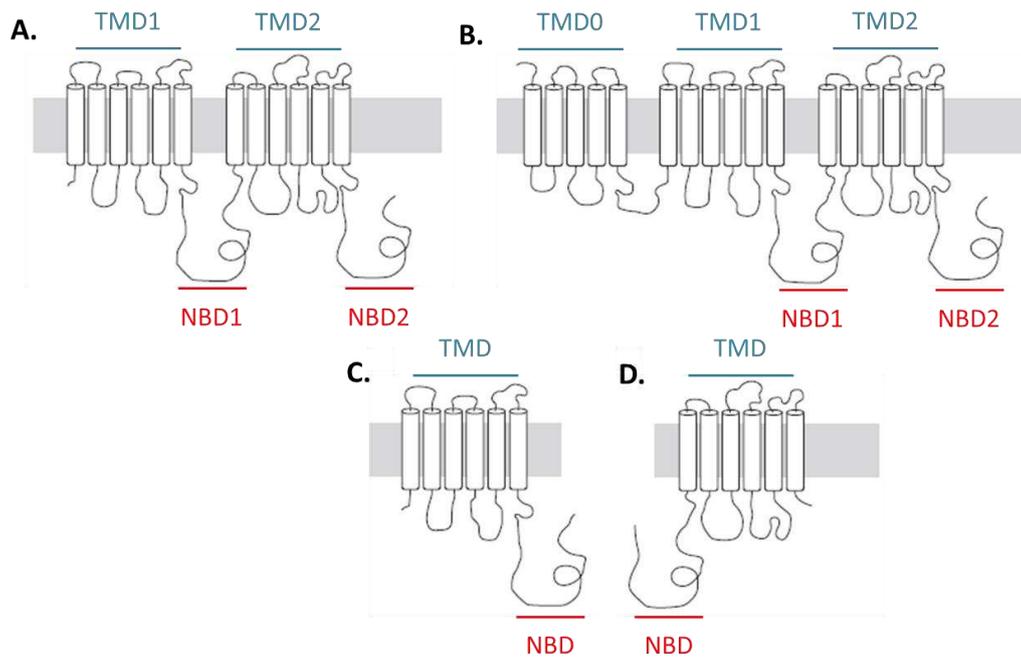


Figure 8 : Représentation schématique de la topologie des transporteurs ABC entiers (A), entiers et avec un TMD supplémentaire (B), et des demi-transporteurs (C) et (D).
[Adapté de (Mo et al. 2009)]

III. LA FONCTION DE TRANSPORT DES TRANSPORTEURS ABC

III.1. Le cycle catalytique

Le modèle du cycle catalytique le plus répandu pour décrire le transport des substrats par les transporteurs ABC, est le modèle « ATP-switch » (Figure 9) (Higgins *et al.* 2004). Dans ce modèle, l'énergie nécessaire au transport du substrat provient non seulement de son hydrolyse, mais également de sa fixation sur les NBD et de sa libération sous forme d'ADP et Pi.

Le cycle de transport du substrat débute avec la fixation du substrat sur un site de haute affinité, localisé au niveau des TMD et accessible du côté cytoplasmique. Cette fixation entraînerait une modification de la conformation des TMD qui se répercuterait sur les NBD et faciliterait la fixation d'ATP et le rapprochement des NBD. Le dimère de NBD passerait alors d'une configuration ouverte, à une configuration fermée dans laquelle les deux molécules d'ATP seraient prises en sandwich à l'interface des 2 NBD. Le rapprochement des deux NBD en configuration fermée, provoquerait à son tour une modification majeure de la conformation des TMD et initierait la translocation du substrat. Le site de fixation du substrat localisé au niveau des TMD ferait alors face au milieu extracellulaire et perdrait son affinité pour le

substrat. La "communication" entre les TMD et les NBD ferait intervenir deux structures nommées ICL (« IntraCytosolic Loop ») qui sont des prolongements cytoplasmiques des TMD. Ces structures constituées chacune de 3 hélices α , sont positionnées à l'interface entre les TMD et les NBD et permettraient de propager l'énergie médiée par la fixation et l'hydrolyse d'ATP, au transport du substrat (Dawson *et al.* 2006).

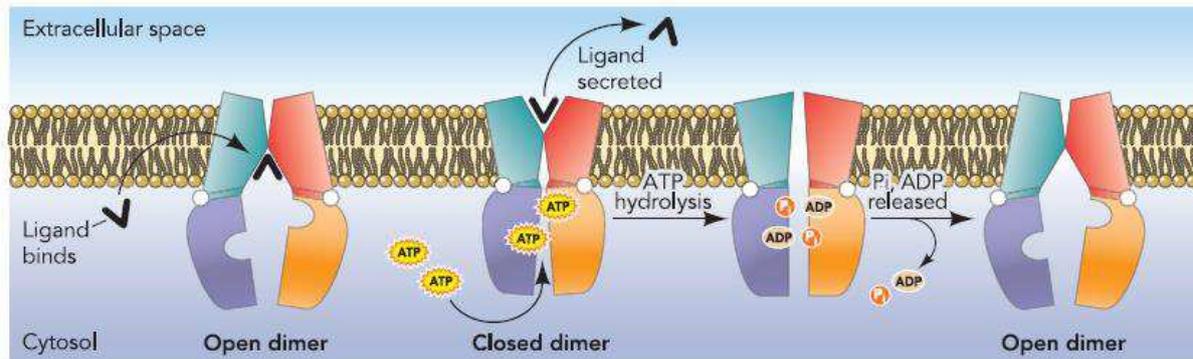


Figure 9 : Fonctionnement des transporteurs ABC selon le modèle « ATP-Switch ».

Les deux domaines NBD passent d'une configuration dimérique fermée autour de 2 molécules d'ATP à une configuration ouverte après hydrolyse d'ATP et libération d'ADP et de Pi. [Issu de (Linton 2007)]

Enfin, l'hydrolyse d'ATP déstabiliserait les NBD et initierait le retour du transporteur dans un état basal, qui s'achèverait avec la libération d'ADP et de Pi (Phosphate inorganique). A la fin du cycle de transport, le dimère de NBD est en configuration ouverte, tandis que le site de fixation du substrat est accessible du côté cytoplasmique et présente une haute affinité pour le substrat. Dans ce modèle « ATP switch », la fixation et l'hydrolyse des deux molécules d'ATP est séquentielle et coopérative. A l'état basal, les NBD sont libres et adoptent une conformation ouverte, avec un espacement de 20 à 30Å entre les deux NBD (Aller *et al.* 2009).

Un autre modèle de mécanisme des transporteurs ABC, appelé « constant contact model », propose l'existence d'une asymétrie dans le fonctionnement des deux poches de fixation d'ATP, et n'implique pas la perte de contact entre les NBD au cours du cycle de transport du substrat (George *et al.* 2012). Ce modèle a été élaboré à partir d'études plus anciennes réalisées par l'équipe de Senior et qui proposaient une hydrolyse alternative des deux molécules d'ATP fixées au niveau des NBD (Senior *et al.* 1995). Dans ce modèle, seule une des deux poches de fixation d'ATP est occupée. Le second site est libre et présente une faible affinité pour l'ATP. Les NBD sont en configuration fermée autour de la molécule d'ATP, tandis qu'ils sont en configuration ouverte au niveau du second site libre. La fixation du

substrat entraîne l'hydrolyse d'ATP au niveau du premier site, ce qui permet d'augmenter l'affinité pour l'ATP du site libre. La fixation d'ATP au niveau du second site induit la fermeture des NBD autour de l'ATP et leur ouverture au niveau du premier site, libérant ainsi de l'ADP et du Pi. Ce changement de conformation s'accompagnerait de la libération du substrat. L'hydrolyse de la molécule d'ATP fixée sur le second site permettrait alors le retour du transporteur à l'état basal.

III.2. Les transporteurs ABC participant au transport de lipides

Plusieurs mécanismes interviennent dans le transport des lipides à travers les membranes cellulaires. Les lipides peuvent diffuser passivement d'un feuillet membranaire à l'autre, par un mécanisme appelé "flip-flop", ce mouvement bidirectionnel pouvant être facilité par l'intervention de protéines présentes dans la membrane. Certains lipides tels que le cholestérol, les phospholipides, les sphingolipides ou encore les AGTLC, sont incapables de traverser les membranes cellulaires de façon passive (ou très lentement : coefficient de diffusion des phospholipides estimé à $10^{-15} \text{ cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$) (Tarling *et al.* 2013). Leur transport nécessite l'intervention d'enzymes flippases dont l'activité dépend de l'hydrolyse d'ATP (Coleman *et al.* 2013) ; i) les ATPases de type P4 qui en tant que flippases permettent le transfert de certains lipides (phospholipides) du feuillet externe de la membrane, au feuillet interne cytosolique, afin de maintenir l'asymétrie naturelle des biomembranes ; ii) les transporteurs ABC, qui à l'inverse, permettent le transfert de lipides du feuillet interne cytosolique de la membrane, au feuillet externe.

Parmi les 48 transporteurs ABC présents chez l'Homme, certains participent au transport de lipides, tels que le cholestérol, les stérols végétaux, les acides biliaires, les phospholipides, les sphingolipides ou encore les AGTLC (Figure 10). Le premier transporteur ABC à avoir été associé au transport de lipides est ABCB4. En effet, afin d'identifier la fonction de ce transporteur très proche de la P-gp (ABCB1), des souris déficientes en *Abcb4*^{-/-} ont été créées (Smit *et al.* 1993). Les chercheurs ont alors observé que ces souris mutantes étaient incapables d'excréter la PC dans la bile. Depuis, une vingtaine de transporteurs ABC ont été caractérisés comme transporteurs de lipides. Ils ne sont pas seulement localisés dans la membrane plasmique, mais également dans la membrane peroxysomale, lysosomale ou encore endosomale (Figure 10). Les termes de feuillet interne et feuillet externe ne sont donc pas forcément très appropriés à l'ensemble des transporteurs ABC impliqués dans le transport des

lipides. Pour généraliser, le feuillet interne de la membrane fait référence au feuillet cytosolique, tandis que le feuillet externe fait face au milieu extracellulaire ou à l'intérieur d'un organe (feuillet extracellulaire ou luminal).

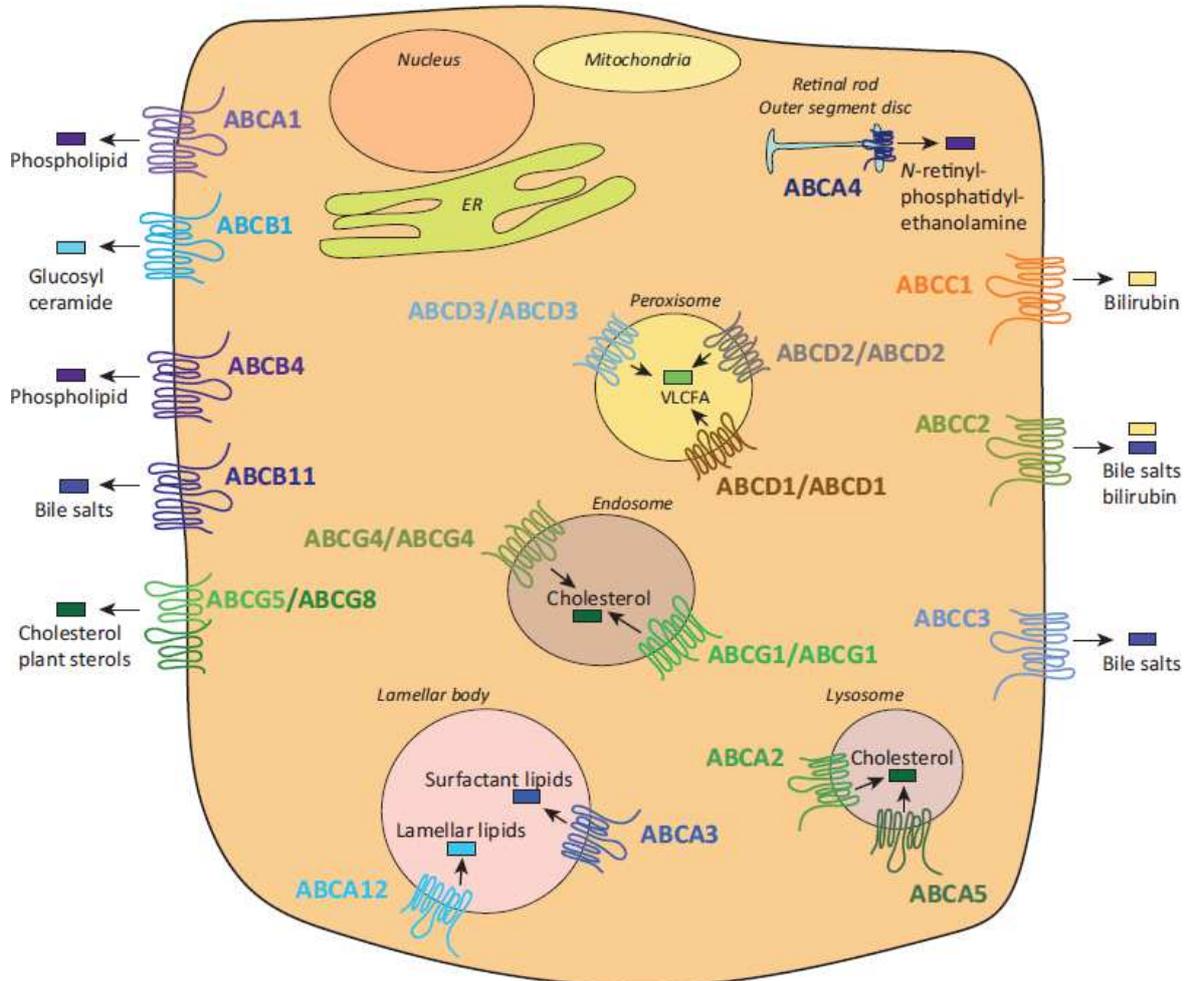


Figure 10 : Localisation cellulaire des transporteurs ABC impliqués dans le transport de lipides. [Issu de (Tarling et al. 2013)]

III.3. Le mécanisme de transport des lipides

Le mécanisme général de transport des lipides est très vraisemblablement similaire à celui des molécules solubles, à la différence près que les lipides accèderaient à la poche de fixation du substrat depuis le feuillet cytosolique de la membrane. La fixation du substrat s'accompagnerait d'un réarrangement important des TMD, aboutissant à la présentation de cette poche et de son substrat, du côté extracellulaire ou du côté luminal (suivant la localisation du transporteur).

Trois modèles de transport des lipides par les transporteurs ABC ont été proposés (Figure 11).

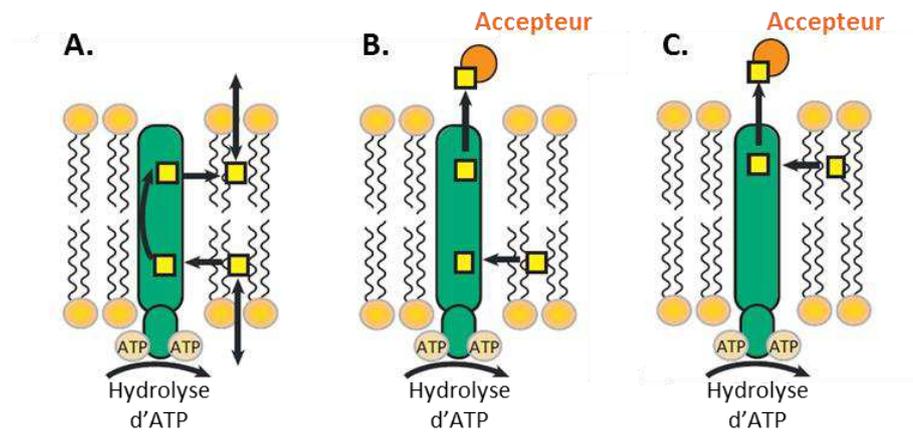


Figure 11 : Illustration des trois modèles de transport des lipides assurés par les transporteurs ABC. Les trois modèles (A, B, et C) sont détaillés dans le texte. [Adapté de (Tarling et al. 2013)]

Dans le premier modèle (Figure 11A), les lipides rejoignent la poche de fixation depuis le feuillet membranaire cytosolique, puis ils sont transportés dans le feuillet membranaire externe (ou luminal) qu'ils ne peuvent pas quitter. Dans le second modèle (Figure 11B), les lipides rejoignent la poche de fixation depuis le feuillet membranaire cytosolique, puis ils sont transportés en direction du milieu extracellulaire (ou luminal), et quittent la poche de fixation du substrat après avoir été récupérés par un accepteur. Ces accepteurs peuvent être une lipoprotéine (ABCA1, phospholipides) (Iatan *et al.* 2011), des acides biliaires (ABCB4, PC ; ABCG5/G8, cholestérol) (Morita *et al.* 2007; Vrins *et al.* 2007), ou une enzyme (ABCD1, AGTLC ; voir chapitre suivant). Il semblerait que les transporteurs ABC de lipides se comportent davantage comme de réels exportateurs, plutôt que de simples flippases, en transférant les lipides du feuillet cytoplasmique à un accepteur localisé dans le milieu extracellulaire ou dans un organelle. Dans une troisième configuration, les transporteurs ABC de lipides peuvent transférer leur substrat, du feuillet extracellulaire ou luminal, directement sur un accepteur (Figure 11C).

III.4. La collaboration entre protéines dans le transport de substrat impliquant un transporteur ABC

Chez les bactéries gram-négatives, telle qu'*E. coli*, l'efflux de lipoprotéines de la membrane interne implique l'intervention d'une protéine acceptrice (Figure 12). Ce mécanisme est impliqué dans la biogénèse de la membrane externe des bactéries gram-négatives qui pour rappel présentent en plus de la membrane plasmique (membrane interne), une membrane externe, avec un espace périplasmique situé entre les deux membranes.

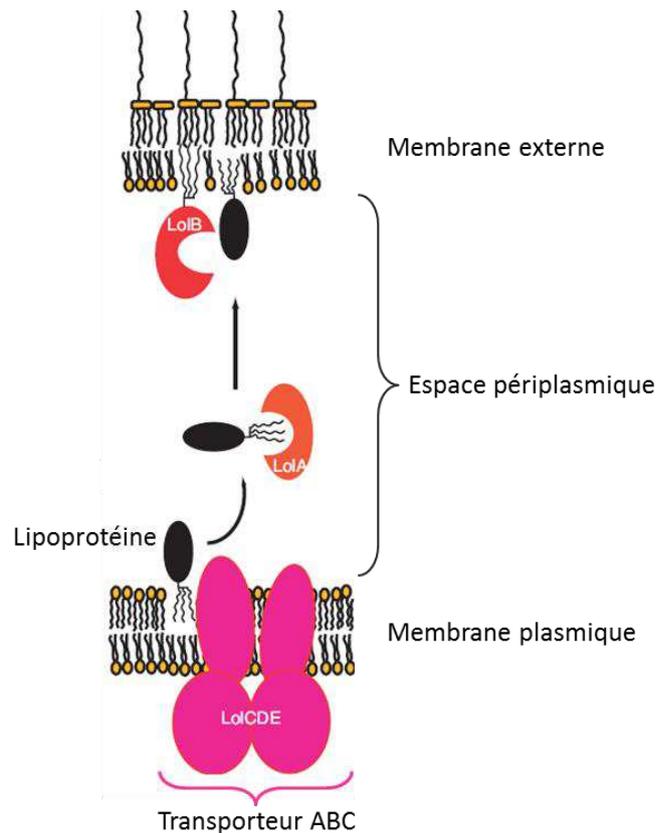


Figure 12 : Efflux de lipoprotéines de la membrane plasmique (interne) chez les bactéries gram-négatives.
[Adapté de (Tokuda 2009)]

L'efflux de lipoprotéines fait intervenir un transporteur ABC composé de 4 chaînes polypeptidiques : LolC et LolE qui correspondent aux deux TMD, et deux copies de LolD qui correspondent aux deux NBD (Tokuda 2009). La lipoprotéine, ancrée dans le feuillet périplasmique de la membrane plasmique, serait reconnue par le complexe LolCDE, induisant la fixation d'ATP au niveau des NBD, et un réarrangement important des TMD. Ce changement s'accompagnerait d'une diminution de l'affinité du substrat pour son site de fixation. Cependant, la lipoprotéine resterait liée au transporteur ABC, jusqu'à ce qu'elle soit prise en charge par la protéine périplasmique LolA. Le complexe lipoprotéine-LolA traverserait alors le périplasmique en direction de la membrane externe, où la lipoprotéine serait transférée sur la lipoprotéine LolB, puis intégrée dans la membrane externe.

L'intervention d'accepteur dans l'efflux des substrats n'est pas limitée au transport des lipides. En effet, le transporteur ABCB2/ABCB3 (TAP1/TAP2, également appelé TAP) importe des peptides antigéniques cytosoliques à l'intérieur du réticulum endoplasmique, où

ils sont chargés sur le CMH I. De plus, ce mécanisme (Hinz *et al.* 2012), fait intervenir au total 6 protéines différentes qui interagissent de façon continue ou transitoire (Figure 13) :

- le transporteur hétérodimérique ABCB2/B3 qui reconnaît et transporte les peptides antigéniques cytosoliques dans le réticulum endoplasmique,
- une glycoprotéine, la tapasine, qui se lie au transporteur ABC au niveau d'un TMD supplémentaire (TMD0),
- une oxydoréductase, ERp57, qui joue un rôle de protéine chaperonne et qui est reliée à la tapasine via un pont-disulfure,
- un CMH I préassemblé, composé d'une chaîne lourde et de β 2-microglobuline, interagissant avec la tapasine,
- une seconde protéine chaperonne, la calréticuline, qui stabilise le CMH I et interagit avec ERp57.

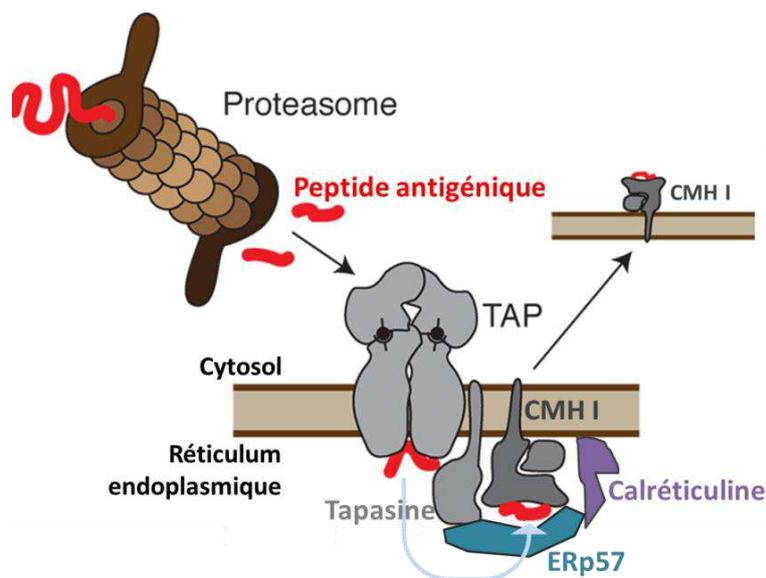


Figure 13 : Mécanisme de présentation des peptides antigéniques par le CMH de classe I, faisant intervenir le transporteur TAP (ABCB2/ABCB3).

[Adapté de (Hinz *et al.* 2012)]

Dans ce gros complexe, la tapasine fait le lien entre le transporteur ABC et le CMH I associé aux protéines chaperonnes, et catalyse la fixation d'un peptide antigénique sur le CMH I. Cette fixation stabilise alors le CMH I qui quitte le réticulum en direction de la membrane plasmique, via l'appareil de golgi.

L'exemple du mécanisme de présentation des peptides antigéniques par le CMH I illustre bien le fait que les transporteurs ABC sont souvent amenés à interagir avec d'autres protéines dans le cadre de leur fonctionnement.

IV. REGARD SUR LES TRANSPORTEURS ABCD PEROXYSOMAX

Les trois demi-transporteurs ABCD1, 2 et 3 sont localisés dans la membrane du peroxysome où ils semblent être impliqués dans le transport d'AGTLC activés en acyl-CoA (van Roermund *et al.* 2008).

Bien que peu d'informations aient été obtenues à ce sujet, leur mécanisme d'action serait vraisemblablement similaire aux autres transporteurs ABC :

- la fixation du substrat s'accompagnerait d'un changement de conformation des TMD d'ABCD1 (Guimaraes *et al.* 2005),
- la fonction de transporteur d'ABCD1 et d'ABCD3 nécessiterait la fixation et l'hydrolyse d'ATP au niveau de leurs NBDs (Imanaka *et al.* 1999; Roerig *et al.* 2001; Tanaka *et al.* 2002),
- et le NBD d'ABCD3 associé sous forme dimérique, changerait de conformation suite à la fixation et à l'hydrolyse d'ATP (Kashiwayama *et al.* 2002). De façon intéressante, la fixation d'ATP stabiliserait le dimère de NBD.

Concernant le lien entre la fixation du substrat, la fixation d'ATP et les changements de conformation des TMD et des NBD, peu de choses sont connues. Il est supposé que les NBD et les TMD sont étroitement liés durant le cycle de transport. En effet, en présence de substrat, le blocage du cycle catalytique par des molécules d'ATP non hydrolysables, bloquerait le changement de conformation des TMD normalement observé (Guimaraes *et al.* 2005). La "communication" entre les TMD et les NBD pourrait faire intervenir un motif très conservé chez les transporteurs ABCD peroxysomax (motif "EAA"), localisé entre les hélices transmembranaires 4 et 5 (Shani *et al.* 1995; Daus *et al.* 2007; Dietrich *et al.* 2009).

Les transporteurs ABCD peroxysomax participent au transport des lipides, plus précisément des AGTLC. Comme il a été évoqué précédemment, le transport de lipides nécessite l'intervention d'accepteurs qui récupèrent les substrats au niveau de leur poche de fixation, côté extracellulaire ou luminal. Mais le transport des lipides pourrait également faire intervenir des protéines chargées d'amener les substrats au niveau du transporteur ABC...

D'ailleurs, du côté cytoplasmique, il a récemment été montré que les transporteurs ABCD1 et ABCD3 interagissaient avec plusieurs protéines : ACLY (« ATP Citrate Lyase ») et FASN (« Fatty Acid SyNthase ») impliquées dans la synthèse d'AG à partir d'acétyl-CoA, et FATP4 (ACSVL5), une synthétase impliquée dans l'activation et le transport des AGTLC (Hillebrand

et al. 2012). En plus, d'interagir avec ABCD1 et ABCD3, ces protéines interagissent également ensemble : ACLY avec FASN (et avec l'acétyl-CoA carboxylase qui synthétise de l'acétyl-CoA), et FASN avec FATP4. On peut tout de même se demander pourquoi des enzymes impliquées dans la synthèse d'AG seraient fonctionnellement reliées à une protéine qui transporterait ensuite ces AG dans le peroxysome, en vue de leur dégradation...

Du côté peroxysomal, il a été montré qu'ABCD1 interagissait avec ACSVL1 (FATP2), une synthétase impliquée dans l'activation des AGTLC (Makkar *et al.* 2006). L'interaction d'un transporteur ABCD avec une synthétase peroxysomale a été également récemment décrite chez la levure et la plante (van Roermund *et al.* 2012; De Marcos Lousa *et al.* 2013). Ces études ont permis de faire émerger une nouvelle théorie selon laquelle les transporteurs ABCD peroxysomaux hydrolyseraient les acyl-CoA (avant ou pendant leur transport) en AGTLC. Une fois dans le peroxysome, les AGTLC libres seraient réactivés par une synthétase liée au transporteur, avant d'être métabolisés par β -oxydation. Il est tout à fait envisageable que l'ACOX1 qui est la première enzyme intervenant dans cette voie, joue le rôle d'accepteur dans la matrice du peroxysome, et prenne en charge les substrats des transporteurs ABCD peroxysomaux. Ces transporteurs présentent d'ailleurs une région très conservée entre les hélices transmembranaires 1 et 2 (motif "loop 1") (Shani *et al.* 1995). Situé du côté peroxysomal, ce domaine pourrait être impliqué dans le recrutement de protéines de la matrice peroxysomale telles qu'ACSVL1 ou encore ACOX1.

Finalement, les transporteurs ABCD peroxysomaux ne fonctionneraient pas de manière isolée, mais feraient partie d'un gros complexe protéique spécialisé dans le métabolisme des lipides.

V. LA REDONDANCE FONCTIONNELLE ENTRE LES TRANSPORTEURS ABCD PEROXYSOMAX, A LA BASE D'UNE PISTE THERAPEUTIQUE DE L'X-ALD

V.1. Les transporteurs ABCD peroxysomaux et la redondance fonctionnelle

Le gène *ABCD1* (*ALD*) impliqué dans l'X-ALD code le transporteur ABCD1 (ALDP, « Adrenoleukodystrophy Protein »), constitué de 745 acides aminés (Mosser *et al.* 1993). Il s'exprime de façon relativement ubiquitaire, mais apparaît à un haut niveau d'expression seulement dans quelques tissus : les glandes surrénales, le foie, les reins, les poumons, le cœur, l'intestin, le placenta et les testicules (Tableau 3) (Berger *et al.* 1999; Langmann *et al.*

2003; Hoftberger *et al.* 2007). ABCD1 est surtout abondant dans les tissus demandeurs en énergie, mais seulement dans certains types cellulaires. Ainsi, le transporteur est exprimé dans les cellules du cortex des glandes surrénales, dans les cellules de Kupffer et les capillaires du foie, dans les tubules distaux des reins ou encore dans les fibroblastes de la peau (Troffer-Charlier *et al.* 1998). Au niveau cérébral, il est exprimé dans les cellules microgliales, les cellules endothéliales, les astrocytes et dans une sous population d'oligodendrocytes, mais pas dans les neurones (Fouquet *et al.* 1997; Troffer-Charlier *et al.* 1998; Hoftberger *et al.* 2007). ABCD1 serait chargé d'importer des AGTLC saturés et monoinsaturés⁶ dans le peroxysome (van Roermund *et al.* 2008; van Roermund *et al.* 2011).

ABCD1 fait partie de la sous famille D des transporteurs ABC. Cette sous famille comprend quatre membres : ABCD1, 2 et 3 qui sont localisés dans la membrane du peroxysome, et ABCD4. Ce dernier a longtemps été considéré comme transporteur peroxysomal avant d'être localisé dans la membrane du réticulum endoplasmique (Kashiwayama *et al.* 2009). Finalement, il serait absent du réticulum et présent dans la membrane lysosomale et participerait au métabolisme de la vitamine B12 (Coelho *et al.* 2012).

La protéine ABCD2 est codée par le gène *ABCD2* (« AdrenoLeukoDystrophy-Related », *ALDR*) (Lombard-Platet *et al.* 1996). Elle est constituée de 741 acides aminés et présente 66% d'identité de séquence avec ABCD1. La distribution tissulaire d'ABCD2 est plus restreinte que celle d'ABCD1 (Tableau 3). L'expression du gène *ABCD2*, est essentiellement retrouvée dans le cerveau, le cœur, les glandes surrénales et l'utérus, et seulement dans certains types cellulaires : dans la zone médullaire des glandes surrénales, dans les neurones, les astrocytes et les cellules microgliales du cerveau (Lombard-Platet *et al.* 1996; Holzinger *et al.* 1997; Langmann *et al.* 2003). Chez la souris, l'expression du gène *Abcd2*, est non seulement retrouvée dans les neurones, les astrocytes et les cellules microgliales du cerveau, mais également dans les oligodendrocytes (Holzinger *et al.* 1997). De manière intéressante, les protéines ABCD1 et ABCD2 présentent une expression tissulaire en partie chevauchante, mais complémentaire au niveau cellulaire (Troffer-Charlier *et al.* 1998). La présence des deux transporteurs ne serait pas indispensable au bon fonctionnement des cellules.

⁶ Voir page 22 : L'importation des acides gras dans le peroxysome

| | ABCD1 | | ABCD2 | | ABCD3 | |
|---------------------|--------|-------|--------|-------|--------|-------|
| | Souris | Homme | Souris | Homme | Souris | Homme |
| Cerveau | + | • | ++ | ••• | + | • |
| Foie | + | • | + | • | +++ | • |
| Reins | + | • | +/- | • | +++ | •• |
| Cœur | ++ | •• | + | • | ++ | • |
| Muscle squelettique | + | • | ++ | • | + | • |
| Rate | + | •• | + | •• | + | • |
| Testicules | ++ | ••• | + | • | + | ••• |
| Poumons | ++ | ••••• | + | • | ++ | •• |
| Intestin | ++ | • | +/- | • | ++ | • |
| Prostate | ∅ | •• | ∅ | •• | ∅ | ••••• |
| Trachée | ∅ | • | ∅ | •••• | ∅ | ••••• |
| Utérus | ∅ | ••• | ∅ | •••• | ∅ | •• |
| Thymus | ∅ | • | ∅ | • | ∅ | • |
| Cervelet | ∅ | • | ∅ | ••••• | ∅ | • |

Tableau 3 : Comparaison des profils d'expression en ARNm, des gènes codant les trois transporteurs ABCD peroxysomaux, chez la souris et l'Homme.

Les données concernant les tissus murins sont issues de la publication (Berger *et al.* 1999). Les niveaux d'expression relatifs des gènes murins peuvent être comparés seulement au sein d'une colonne : +/- détectable uniquement par RT-PCR ; + expression faible ; ++ bonne expression ; +++ expression élevée ; ∅ pas de donnée. Les données concernant les tissus humains sont issues de la publication (Langmann *et al.* 2003). Les niveaux d'expression relatifs des gènes humains peuvent être comparés au sein d'une colonne (•<••<•••<••••<•••••). Afin de comparer les niveaux d'expression des trois transporteurs ABCD peroxysomaux au sein d'un tissu (analyse horizontale), il faut se référer au code couleur : niveau d'expression élevé (rouge), moyen (vert), faible (bleu) et très faible (gris).

A ce jour, aucune pathologie n'a été associée à la déficience en ABCD2. Elle serait impliquée dans l'importation des AG à longue et très longue chaîne, mono et polyinsaturés⁷ (Genin *et al.* 2011; van Roermund *et al.* 2011). ABCD2 pourrait également jouer un rôle dans la synthèse du DHA. En effet, les neurones corticaux de souris déficientes en *Abcd2* présentent une diminution de 30% des niveaux en DHA (Fourcade *et al.* 2009).

Enfin, la protéine ABCD3 (PMP70, « 70kDa peroxisomal membrane protein ») est codée par le gène *PMP70 (ABCD3)* (Kamijo *et al.* 1990). Ce transporteur de 659 acides aminés présente 45% d'identité de séquence avec ABCD1. Ce fut le premier transporteur ABC peroxysomal identifié. L'expression du gène *ABCD3* sous forme d'ARNm est relativement ubiquitaire

⁷ Voir page 22 :L'importation des acides gras dans le peroxysome

(Tableau 3). Cependant il est plus fortement exprimé dans le cerveau, les testicules et le thymus, ainsi que dans le foie et les reins (Berger *et al.* 1999; Kemp *et al.* 2011). A ce jour aucune pathologie n'a été associée à sa déficience, même si il fut un temps soupçonné d'être à l'origine de troubles de la biogenèse du peroxysome chez deux patients atteint du syndrome de Zellweger (Gartner *et al.* 1992; Shimozawa *et al.* 1996). Au niveau fonctionnel, ABCD3 prendrait en charge les précurseurs des acides biliaires, les AG méthylés et les AG dicarboxyliques⁸ (Visser *et al.* 2007).

Au vu de leur similarité structurelle et également de la complémentarité de leur profil d'expression, il a été supposé que les trois transporteurs ABC peroxysomaux pourraient présenter une redondance fonctionnelle. Et en effet, l'augmentation de l'expression des protéines ABCD2 et ABCD3 chez des souris traitées au fénofibrate permet de restaurer la β -oxydation des AGTLC au niveau du foie (Netik *et al.* 1999). La surexpression d'ABCD3 dans des fibroblastes de patients X-ALD corrige partiellement la β -oxydation des AGTLC, tandis que la surexpression d'ABCD2 la corrige complètement et normalise les niveaux en AGTLC (Braiterman *et al.* 1998; Kemp *et al.* 1998; Netik *et al.* 1999). L'efficacité d'ABCD3 pour remplacer ABCD1 est d'autant plus étonnante que la protéine est déjà exprimée au niveau basal dans les fibroblastes. Sa surexpression serait donc nécessaire à la restauration de la β -oxydation peroxysomale. La correction de la déficience en *ABCD1* ne serait pas liée à sa stabilisation par l'un des deux autres transporteurs ABC peroxysomaux, mais bien à une compensation fonctionnelle par ABCD2 et ABCD3 (Netik *et al.* 1999). *In vivo*, la surexpression (x5-x10) ubiquitaire d'*Abcd2* chez des souris X-ALD permet de normaliser les niveaux en AGTLC au niveau de la moelle épinière, des glandes surrénales et du nerf sciatique (Pujol *et al.* 2004). Elle permet également de prévenir le phénotype "AMN" normalement développé chez ces souris déficientes en *Abcd1*.

V.2. Les traitements visant à induire l'expression d'ABCD2 et/ou ABCD3

Comme nous l'avons vu précédemment, les transporteurs ABCD peroxysomaux présentent une redondance fonctionnelle partielle. Il existe toute une panoplie de molécules qui ont été décrites pour induire l'expression d'ABCD2 et/ou d'ABCD3 *in vivo* et qui sont donc intéressantes d'un point de vue thérapeutique car elles pourraient permettre de restaurer le

⁸ Voir page 22 : L'importation des acides gras dans le peroxysome

transport des AGTLC dans le peroxysome chez les patients atteints d’X-ALD, et ainsi normaliser les niveaux tissulaires et plasmatiques d’AGTLC.

V.2.1. Les agents hypolipidémiant

Les statines et les fibrates sont deux types d’agents hypolipidémiant capable d’induire *in vivo* l’expression du gène *ABCD2*.

Chez des patients atteints d’X-ALD, la lovastatine permet de diminuer les niveaux plasmatiques en AGTLC après 6 mois de traitement (Singh *et al.* 1998a). Cette diminution serait liée à la stimulation de la β -oxydation du C24:0 dans les cellules déficientes en *ABCD1* (Singh *et al.* 1998b). Les effets de la lovastatine passeraient probablement par l’activation d’un facteur de transcription de type SREBP (« Sterol Regulatory Element Binding Protein ») qui se fixerait sur le promoteur du gène *ABCD2*, au niveau d’un élément de réponse spécifique (SRE, « Sterol Response Element ») (Weinhofer *et al.* 2002).

Le fénofibrate stimule l’expression hépatique d’*Abcd2* et d’*Abcd3* chez la souris et le rat, et restaure la β -oxydation peroxysomale dans le foie de souris déficientes en *Abcd1* (Albet *et al.* 1997; Netik *et al.* 1999). Malgré l’absence de PPRE (« PPAR Response Element ») fonctionnel dans son promoteur, l’induction hépatique du gène *Abcd2* par le fénofibrate dépend de PPAR α (« Peroxisome Proliferator-Activated Receptor » α) (Fourcade *et al.* 2001; Rampler *et al.* 2003). Au niveau hépatique, le mécanisme d’induction serait indirect et ferait intervenir un facteur de transcription de type SREBP susceptible de se lier au SRE présent dans le promoteur d’*Abcd2* (Weinhofer *et al.* 2002; Rampler *et al.* 2003).

V.2.2. Les agents proliférateurs de peroxysome

Le traitement au 4-PBA (4-phénylbutyrate) de cellules humaines et murines déficientes en *ABCD1*, restaure la β -oxydation des AGTLC grâce à l’induction de l’expression d’*ABCD2* et corrige les niveaux en AGTLC (Kemp *et al.* 1998; McGuinness *et al.* 2001). *In vivo*, le 4-PBA permet de normaliser les niveaux en AGTLC dans les glandes surrénales de souris déficientes en *Abcd1*, mais également dans leur cerveau (Kemp *et al.* 1998). Chez le rat, l’administration de 4-PBA induit l’expression hépatique d’*Abcd2*, mais ne module pas son expression cérébrale. Pourtant, le traitement de cellules gliales de rat stimule l’expression d’*Abcd2* (Gondcaille *et al.* 2005).

Malgré sa capacité à induire la prolifération des peroxysomes, l'action du 4-PBA ne passerait pas par l'activation de PPAR α , sauf dans le foie où l'induction d'*Abcd2* dépendrait en partie de PPAR α . Le 4-PBA induirait l'expression d'*Abcd2* principalement grâce à l'inhibition d'histone désacétylases (Gondcaille *et al.* 2005). Ces enzymes ont un rôle important dans la régulation épigénétique. Elles éliminent les groupements acétyles des histones, favorisant la condensation de la chromatine et donc agissent comme des inhibiteurs de la transcription.

V.2.3. Les hormones stéroïdiennes

La plupart des patients atteints d'X-ALD présente une insuffisance primaire du cortex surrénal qui s'accompagne d'une diminution des niveaux plasmatiques en DHEA (Déhydroépiandrostérone) conjuguée au sulfate (DHEA-S). *In vivo* l'administration de DHEA-S à des rongeurs mâles induit l'expression hépatique d'*Abcd2* et *Abcd3* (Gueugnon *et al.* 2007). Contrairement à *Abcd3*, le mécanisme d'induction hépatique d'*Abcd2* ne dépendrait pas de PPAR α .

V.2.4. Les AG polyinsaturés

Chez le rat, une alimentation riche en AG polyinsaturés (oméga 3) permet d'induire l'expression hépatique des gènes *Abcd2* et *Abcd3* (Leclercq *et al.* 2008).

V.2.5. L'hormone thyroïdienne T3 (Triiodothyronine)

Le traitement de fibroblastes cutanés issus de patients X-ALD avec l'hormone thyroïdienne T3, permet d'induire l'expression d'*ABCD2* et de corriger les niveaux d'AGTLC, mais seulement de façon transitoire (Fourcade *et al.* 2003). Néanmoins, l'utilisation de thyromimétiques, moins sensibles à l'inactivation par des enzymes, permet d'induire l'expression du gène *ABCD2* dans des fibroblastes de patients atteints d'X-ALD, de façon non transitoire (Genin *et al.* 2009). *In vivo*, le traitement de rats par l'hormone T3 permet d'induire l'expression hépatique d'*Abcd2*, mais pas son expression cérébrale (ou seulement dans certains types cellulaires) (Fourcade *et al.* 2003). Concernant son mécanisme d'action, l'hormone T3 se lie aux récepteurs nucléaires des hormones thyroïdiennes (TR, « Thyroid hormone Receptor », isoforme TR α ou TR β). Ces TR agissent en se fixant sur un élément de réponse spécifique (TRE, « Thyroid hormone Response Element ») présent dans le promoteur

de gènes cibles, sous forme d'hétérodimère avec RXR α (Récepteur X de l'acide 9-cis-rétinoïque α) (Zhang *et al.* 2000). Le promoteur du gène *ABCD2* présente un TRE fonctionnel, capable de fixer l'hétérodimère TR β /RXR α (Weinhofer *et al.* 2002; Fourcade *et al.* 2003). De façon intéressante, cet élément de réponse est chevauchant avec un SRE fonctionnel, capable de fixer SREBP (Weinhofer *et al.* 2005b). Une fois activés par la T3, les TR lient la séquence chevauchante SRE/TRE et interagissent avec SREBP1c, favorisant ainsi l'expression du gène *ABCD2* (Weinhofer *et al.* 2008).

VI. L'OLIGOMERISATION DES TRANSPORTEURS ABC

VI.1. Les domaines et motifs impliqués

VI.1.1. Les domaines et motifs PDZ

Les domaines PDZ sont des modules de liaisons spécifiques entre protéines. Ils sont composés d'environ 90 acides aminés et comportent 6 feuillets β et 2 hélices α . Ils reconnaissent des motifs PDZ situés à l'extrémité C-terminale des protéines cibles (« PDZ Binding Motif »), dont la séquence consensus varie en fonction du type de motif (Sheng *et al.* 2001). Les protéines qui possèdent un domaine PDZ en possèdent généralement plusieurs, favorisant ainsi la formation de complexes protéiques qui peuvent regrouper des canaux ioniques, des récepteurs, des transporteurs, ou encore des protéines de signalisation cellulaire.

Le transporteur ABCC7 (CFTR) présente un motif PDZ situé à son extrémité C-terminale (¹⁴⁷⁷DTRL¹⁴⁸⁰ chez l'Homme), qui est reconnu par plusieurs protéines à domaines PDZ : NHERF1, NHERF2, PDZK1, PDZK2, CAL, et Shank2 (Li *et al.* 2010). Ces interactions sont notamment impliquées dans la régulation fonctionnelle d'ABCC7, dans la régulation de sa localisation, ou encore de sa maturation et sa dégradation. Il a été montré que la protéine CAP70 (PDZK1), facilite la dimérisation d'ABCC7 grâce la fixation bivalente de deux domaines PDZ et ainsi augmenterait l'activité du canal ionique (Wang *et al.* 2000). De la même façon, la protéine NHERF pourrait augmenter l'activité d'ABCC7 en favorisant sa dimérisation (Raghuram *et al.* 2001). A la différence des autres transporteurs ABC, la protéine ABCC7 possède un domaine de régulation cytoplasmique, situé entre le NBD1 et le TMD2. Ce domaine contient de nombreux résidus chargés et la majorité des sites potentiels de phosphorylation, impliqués dans la régulation du transporteur par les protéines kinases A et

C. Il pourrait également contribuer à la dimérisation du transporteur ABCC7 (Gupta *et al.* 2004).

D'autres transporteurs ABC possèdent également un motif PDZ situé à leur extrémité C-terminale, éventuellement impliqué dans leur dimérisation : ABCA1, ABCA7, ABCC2 et ABCC4 (Buechler *et al.* 2002; Hegedus *et al.* 2003). Une étude récente suppose que la fixation de la protéine PDZ RhoGEF stabilise le transporteur ABCA1 et augmente l'efflux de cholestérol (Okuhira *et al.* 2010). Sur les trois types de motifs PDZ, comportant chacun une séquence consensus différente, l'acide aminé en dernière position est soit la valine, la leucine, l'alanine, ou l'isoleucine. Concernant les transporteurs ABCD peroxysomaux, ceux-ci ne présentent pas de motif PDZ à leur extrémité C-terminale. D'autres domaines et/ou motifs doivent probablement être impliqués dans leur oligomérisation.

VI.1.2. Le motif GXXXG

Le motif GXXXG est un motif très représenté dans les séquences des protéines membranaires (Senes *et al.* 2000). Il est vraisemblablement impliqué dans la dimérisation des hélices transmembranaires (Russ *et al.* 2000) et jouerait donc un rôle crucial dans le repliement et l'oligomérisation des protéines membranaires intégrales. En plus du motif GXXXG, le motif SmXXXSm (où Sm est un petit résidu : Gly, Ala, Ser, ou encore Thr) , autrement appelé GXXXG-like, serait également important dans la dimérisation au niveau des hélices transmembranaires en absence de motif GXXXG classique (Li *et al.* 2012).

Le transporteur ABCG2 est un demi-transporteur ABC localisé dans la membrane plasmique et qui doit au minimum se dimériser afin de constituer un transporteur fonctionnel. Au niveau de sa première hélice transmembranaire (TM1), les résidus Glycine en position 406 et 410 qui sont très conservés au sein de la sous-famille ABCG, appartiennent à un motif de dimérisation GXXXG (Polgar *et al.* 2004; Polgar *et al.* 2010). Leur substitution, simple ou double, par un résidu Leucine entrave la fonctionnalité d'ABCG2. Le motif GXXXG, présent dans le TM1 d'ABCG2, serait donc important pour la fonctionnalité du transporteur, et pourrait être impliqué dans sa dimérisation. La triple mutation des résidus Glycine en position 406 et 410, et du résidu Thréonine en position 402, aboutit à une réduction encore plus importante de la fonctionnalité du transporteur et déstabiliserait l'homodimère ABCG2/ABCG2. La dimérisation d'ABCG2 pourrait donc finalement faire intervenir un motif GXXXG élargi, comprenant un résidu Thréonine (motif TXXXGXXXG) (Polgar *et al.* 2010).

Les transporteurs ABCD peroxysomaux sont également des demi-transporteurs qui doivent donc au minimum se dimériser afin de constituer un transporteur fonctionnel. De manière très intéressante, cinq motifs GXXXG-like à priori présents dans les hélices transmembranaires (d'après les programmes de prédiction), sont très conservés entre les protéines ABCD1 et ABCD2, tandis qu'un sixième motif est très conservé entre ABCD1, 2 et 3 (Figure 14).

```

1   MPVLSRPRPWRGNTLKR TAVLLALAAYGAHKVYPLVRQCLAPARGLQAPAGEPTQEASGV
61  AAAKAGMNRVFLQRL L WLLRLLFPRLCRETGLLALHSAALVSRTFLSVVVA ARLDGRLAR
121 CIVRKDPRAFGWQLLQWLLIALPATFVNSAIRYLEGQLALSFRSRLVAHAYRLYFSQQTY
181 YRVSNMDGRLRNP DQSLTEDVVAFAASVAHLYSNLTKPLLDVAVTSYTL LRA ARSRGAGT
241 AWPSAIAGLVVFLTANVLR AFSPKF GELVAEEARRKGEELRYMHSRVVANSEEI A AFYGGHE
301 VELALLQRSYQDLASQINLILLERLWYVMLEQFLMKYVWSASGLLMVAVPIITATGYSES
361 DAEAVKKAALEKKEEELVSE RTEAFTIARNLLTAAADAIERIMSSYKEVTELAGYTARVH
421 EMFQVFEDVQRCHFKRPRELEDAQAGSGTIGRSGVRVEGPLKIRGQVVDVEQGIICENIP
481 IVTPSGEVVVASLNIRVEEGMHL LIT GPNGCGKSSLFRILGGLWPTYGGVLYKPPPQRMF
                               Walker A
541 YIPQRPYMSVGS LRDQVIYPDSVEDMQRKGYSEQDLEAILD VVHLHHILQREGGWEAMCD
601 WKDVL LSGGKQQRIGMARMFYHRPKY ALLDECTSAV SIDVEGKIFQA AKDAGIALLSITHR
                               Signature ABC Walker B
661 PSLWKYHTHLLQFDGEGGWKF EKLD SAARLSL TEEKQRLEQQLAGIPKMQRRLQELCQIL
721 GEAVAPAHVPAPSPQGP GGLQGAST

```

Figure 14 : Localisation dans la protéine ABCD1 des six motifs GXXXXG-like conservés entre les transporteurs ABCD peroxysomaux.

Les motifs conservés entre ABCD1 et ABCD2 sont indiqués en vert, tandis que le motif conservé entre les trois transporteurs ABCD peroxysomaux est indiqué en jaune. En plus des motifs GXXXG-like, sont localisés : les acides-aminés retrouvés mutés chez certains patients atteints d'X-ALD et faisant parti d'un motif (*), et en rouge les motifs caractéristiques de la superfamille ABC (Walker A et B, et Signature ABC)

De plus, il se trouve que sur les ≈ 300 mutations faux-sens différentes recensées chez les patients atteints d'X-ALD (<http://www.x-ald.nl/>), certaines sont retrouvées au niveau de 5 de ces 6 motifs (Figure 14). On pourrait donc envisager que ces motifs interviennent dans la dimérisation des transporteurs ABCD peroxysomaux et jouent un rôle essentiel dans leur fonctionnement. Cette hypothèse est renforcée par un article récent qui montre que la mutation G116R située au niveau du premier motif GXXXG-like dans la protéine ABCD1 humaine et retrouvée chez certains patients atteint d'X-ALD, altère l'homodimérisation de la

protéine (Hillebrand *et al.* 2012). Le motif GXXXG-like comportant le résidu Alanine en position 112 et le résidu Glycine en position 116, pourrait donc être impliqué dans la dimérisation du transporteur ABCD1, et peut-être également dans la dimérisation d'ABCD2.

VI.2. La dimérisation des demi-transporteurs

Les demi-transporteurs ABC sont constitués d'un NBD et d'un TMD. Ils doivent donc se dimériser, au moins pour deux raisons : 2 NBD sont nécessaires à la formation des deux poches de fixations et d'hydrolyse d'ATP (Smith *et al.* 2002; Dawson *et al.* 2006), et 2 TMD sont nécessaires à la formation d'un hypothétique pore par lequel transitent les substrats, ou tout du moins à la formation d'une poche de fixation des substrats (Aller *et al.* 2009).

VI.2.1. Homodimérisation stricte

Le seul demi-transporteur ABC connu pour s'homodimériser de façon stricte est le transporteur ABCG2. Celui-ci transporterait de nombreux substrats à travers la membrane plasmique (molécules chargées : molécules cytotoxiques utilisées en chimiothérapie, molécules fluorescentes ou encore molécules chimiques toxiques) et restreindrait leur entrée dans le cerveau et le placenta.

Plusieurs études ont montré qu'ABCG2 est capable de s'homodimériser. En effet, la surexpression d'ABCG2 muté présente un effet transdominant négatif sur la protéine non mutée (Kage *et al.* 2002). Lors de l'analyse d'ABCG2 en SDS-PAGE (« Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis »), la protéine est retrouvée à 140 kDa en absence d'agent réducteur, et à 70 kDa en présence d'agent réducteur. ABCG2 serait donc présent sous forme dimérique dans les cellules, les deux monomères étant liés par un pont-disulfure (Kage *et al.* 2002; Litman *et al.* 2002). L'expression d'ABCG2 dans des cellules d'insectes, n'exprimant pas le transporteur, permet de conserver la fonctionnalité du transporteur (Ozvegy *et al.* 2001). Ces résultats suggèrent qu'ABCG2 est fonctionnel sous forme homodimérique et ne nécessiterait pas l'intervention d'autres protéines pour fonctionner. D'ailleurs, le transporteur purifié et reconstitué dans des liposomes reste fonctionnel (Telbisz *et al.* 2013). Des dimères chimériques d'ABCG2, correspondant à l'enchaînement covalent de 2 demi-transporteurs ABCG2, ont été créés et seraient correctement localisés dans la membrane plasmique et surtout fonctionnels (Bhatia *et al.* 2005). C'est sur ce travail que

repose une partie de mon travail de thèse, lié à l'étude fonctionnelle des transporteurs ABCD peroxysomaux.

VI.2.2. Hétérodimérisation stricte

Contrairement à l'homodimérisation stricte où seul ABCG2 est concerné, au sein des demi-transporteurs ABC, l'hétérodimérisation stricte est un peu plus répandue. Elle concerne les demi-transporteurs ABCB2 et ABCB3 dans la membrane du réticulum endoplasmique, et ABCG5 et ABCG8 dans la membrane plasmique.

Les demi-transporteurs ABCB2 (TAP1) et ABCB3 (TAP2) sont localisés dans la membrane du réticulum endoplasmique. Ils sont impliqués dans la présentation des peptides antigéniques à la surface des cellules par le CMH de classe I⁹ et jouent donc un rôle important dans la défense immunitaire (Hinz *et al.* 2012). Plusieurs études d'immunoprécipitation, « cross-linking » ou encore de chromatographie d'exclusion, ont montré qu'ABCB2 et ABCB3 s'hétérodimérisent dans la membrane du réticulum et sont fonctionnels sous forme hétérodimérique (Spies *et al.* 1992; Ortmann *et al.* 1997; Lacaille *et al.* 1998). Enfin, l'étude de la structure tridimensionnelle du complexe TAP a révélé l'association hétérodimérique d'ABCB2 et ABCB3 (Velarde *et al.* 2001).

Les demi-transporteurs ABCG5 et ABCG8 sont impliqués dans le contrôle de l'absorption de stérols venant de l'intestin et dans le contrôle de l'excrétion des stérols dans le foie (Hirata *et al.* 2009). Il a été montré qu'ABCG5 et ABCG8 forment des hétérodimères localisés dans la membrane plasmique, tandis que les homodimères sont retenus dans le réticulum endoplasmique (Graf *et al.* 2002; Graf *et al.* 2003). Les hétérodimères localisés à la surface des cellules sont stables et fonctionnels, et permettent l'efflux de cholestérol. En revanche, les homodimères ne semblent pas fonctionnels et sont dégradés rapidement par le protéasome (Graf *et al.* 2002; Okiyoneda *et al.* 2006). Récemment, la première reconstitution de transport de substrat par un transporteur ABC purifié à partir de tissu de mammifère, a été publiée (Wang *et al.* 2008a). Cette étude a permis de montrer que l'hétérodimère ABCG5/ABCG8 est fonctionnel et qu'il n'existe pas d'état oligomérique supérieur au dimère lors du cycle de transport de substrat.

⁹ Voir page 60 : La collaboration entre protéines dans le transport de substrat impliquant un transporteur ABC

VI.2.3. Dimérisation alternative

Certains demi-transporteurs ABC pourraient se dimériser de façon alternative, probablement afin de s'adapter aux substrats intracellulaires à transporter. Chez la drosophile (*Drosophila melanogaster*), la dimérisation alternative du demi-transporteur ABC white soit avec le demi-transporteur brown, soit avec le demi-transporteur scarlet, illustre parfaitement cette idée. En effet, l'hétérodimère white/brown transporte du tryptophane, tandis que l'hétérodimère white/scarlet transporte de la guanine (O'Hare et al. 1984, Pepling and Mount 1990, Dreesen et al. 1988, Tearle et al. 1989).

Chez l'Homme, les demi-transporteurs ABCG1 et ABCG4 présentent une identité de séquence élevée (72 %), alors qu'il existe normalement très peu d'homologie au sein de la sous famille ABCG. ABCG1 serait impliqué dans le transport des lipides et permettrait l'efflux de cholestérol et de phospholipides des macrophages vers les HDL (Klucken *et al.* 2000). La fonction du demi-transporteur ABCG4 est moins connue. Il pourrait travailler en coordination avec ABCG1 dans le cerveau (Wang *et al.* 2008b). Il a été montré qu'ABCG1 était fonctionnel sous forme homodimérique (Kobayashi *et al.* 2006). *In vitro*, la surexpression d'ABCG1 et d'ABCG4 dans des cellules d'insectes aboutit à la formation d'hétérodimères, dont la valeur fonctionnelle n'a pas encore été élucidée (Cserepes *et al.* 2004).

Concernant les transporteurs ABCD peroxysomaux, leur fonctionnement sous forme d'homodimère ou d'hétérodimère reste à clarifier. De nombreux substrats doivent être transportés dans le peroxysome pour être dégradés, comme les AGTLC, les AG branchés, les AG hydroxylés, les AG dicarboxyliques... La possibilité de former différentes combinaisons homo- et hétéro-dimériques pourrait permettre de répondre à ces besoins. Chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*, les deux seuls transporteurs ABC peroxysomaux Pxa1 et Pxa2 ont été décrits pour fonctionner sous la forme d'un hétérodimère et permettent le transport d'acyl-CoA dans le peroxysome (Hetteema *et al.* 1996; Shani *et al.* 1996; van Roermund *et al.* 2012). Chez les mammifères, il a été montré par des expériences de double hybride et de co-immunoprécipitation qu'*in vitro* ABCD1, ABCD2 et ABCD3 sont capables de former des homodimères ainsi que des hétérodimères (Liu *et al.* 1999; Smith *et al.* 1999). Dans des foies murins pauvres en Abcd2, les protéines Abcd1 et Abcd3 sont toutes deux retrouvées au sein d'un même complexe constitué d'autres protéines membranaires peroxysomales capables de fixer de l'ATP (Tanaka *et al.* 2002). Cependant, cette étude ne permet pas de définir le statut

dimérique d'ABCD1 et ABCD3. Une autre étude dans le foie conclut qu'ABCD1 et ABCD3 sont majoritairement sous forme homodimérique (Guimaraes *et al.* 2004). Récemment, deux études *in vivo* basée sur la technique de FRET (« Förster resonance energy transfer ») et de BRET (« Bioluminescence resonance energy transfer »), et focalisées sur ABCD1 et ABCD3, ont montré que les deux protéines peuvent s'homodimériser et s'hétérodimériser (Hillebrand *et al.* 2007; Hillebrand *et al.* 2012). De plus, l'expression d'ABCD1 et d'ABCD2 humains chez la levure a permis de vérifier que les homodimères ABCD1 et ABCD2 étaient fonctionnels (van Roermund *et al.* 2008; van Roermund *et al.* 2011). Lorsque j'ai débuté mon travail de thèse, aucune étude concernant la valeur fonctionnelle des hétérodimères n'avait été publiée. Cependant, d'après nos résultats publiés en 2011 (Genin *et al.* 2011), la protéine ABCD2 mutée et non fonctionnelle a un effet transdominant négatif sur la protéine ABCD1, vis-à-vis de l'accumulation cellulaire d'AGTLC saturés et monoinsaturés. Ce travail apporte le premier élément d'une interaction fonctionnelle entre ABCD1 et ABCD2.

VI.3. L'oligomérisation des demi-transporteurs et des transporteurs entiers

Un transporteur ABC fonctionnel ne se résumerait pas forcément à l'association entre deux TMD et deux NBD. Certains transporteurs ABC pourraient exister dans les membranes sous formes de complexes oligomériques de taille supérieure à un transporteur entier ou à un dimère de demi-transporteur.

Le demi-transporteur ABCG2 s'associerait dans des complexes oligomériques de taille supérieure à de simples homodimère (Litman *et al.* 2002; Bhatia *et al.* 2005; Dezi *et al.* 2010). Grâce à la combinaison de différentes techniques biochimiques (gel d'électrophorèse en condition native, chromatographie d'exclusion, sédimentation sur gradient de sucrose, « cross-link », co-immunoprécipitation), il a été montré qu'ABCG2 serait majoritairement présent dans des complexes correspondant à des dodécamères (Xu *et al.* 2004). L'association minimale permettant d'assurer une stabilité au complexe correspondrait à la formation de tétramères et aucun monomère ABCG2, ni aucun dimère ne serait présent dans la membrane plasmique. Dans une autre étude, la purification d'ABCG2, puis son analyse tridimensionnelle (faible résolution), permettrait d'observer un complexe octamérique (McDevitt *et al.* 2006). Même si à ce jour on ne connaît pas la façon dont s'associe le demi-transporteur ABCG2 au sein des complexes octamériques ou dodécamériques, on peut

fortement supposer qu'ABCG2 appartient à des complexes oligomériques de taille supérieure à des dimères.

Les transporteurs ABC entiers seraient également capables de s'oligomériser. De façon très intéressante, le transporteur de lipides ABCA1 changerait de statut oligomérique au cours du cycle de transport de substrats (Trompier *et al.* 2006). A l'état basal, il serait présent dans la membrane plasmique sous forme dimérique, et pourrait s'associer ensuite en tétramère lors du transport de substrats. Le transporteur entier ABCC7 qui est un canal ionique, existerait dans la membrane sous forme dimérique (Ramjeesingh *et al.* 2003). La création d'un dimère chimérique correspondant à l'association covalente de deux protéines ABCC7, a permis de montrer que le transporteur est fonctionnel sous forme dimérique (Zerhusen *et al.* 1999). La dimérisation d'ABCC7 impliquerait son domaine de régulation situé dans le cytoplasme, mais également l'intervention de protéines à domaines PDZ via le motif PDZ localisé à son extrémité C-terminale¹⁰. En plus d'ABCA1 et ABCC7, les deux transporteurs entiers ABCB1 et ABCC1 seraient également capables de s'oligomériser, probablement sous forme de dimères (Boscoboinik *et al.* 1990; Poruchynsky *et al.* 1994; Yang *et al.* 2007). La dimérisation d'ABCC1 ferait intervenir son domaine membranaire supplémentaire TMD0.

¹⁰ Voir page 69 : les domaines et motifs PDZ

OBJECTIFS

L'X-ALD est une maladie neurodégénérative rare, liée à la mutation du gène *ABCD1* qui code un demi-transporteur peroxysomal impliqué dans le transport d'AGTLC. Actuellement, aucune thérapie véritablement satisfaisante n'est proposée à l'ensemble des patients atteints d'X-ALD. Cependant, une piste thérapeutique basée sur l'induction pharmacologique d'*ABCD2* et *ABCD3* est en cours d'étude. Cette piste thérapeutique s'appuie sur le phénomène de redondance fonctionnelle existant entre *ABCD1* et ses deux homologues peroxysomaux, *ABCD2* et *ABCD3*. *ABCD3* étant exprimé de manière relativement ubiquitaire et sa redondance fonctionnelle avec *ABCD1* étant seulement partielle, les recherches sont d'avantage focalisées sur l'induction d'*ABCD2*. Les travaux réalisés au laboratoire ces dernières années ont eu pour objectif d'identifier et de tester des molécules capables d'induire l'expression du gène *ABCD2* de manière efficace dans les tissus cibles de l'X-ALD et de caractériser les mécanismes moléculaires des voies d'activation de ces inducteurs (Fourcade *et al.* 2001; Bugaut *et al.* 2003; Gondcaille *et al.* 2005; Gueugnon *et al.* 2007; Leclercq *et al.* 2008; Genin *et al.* 2009). Une publication sur l'induction *in vitro* et *in vivo* d'*ABCD2* par des antagonistes de LXR, à laquelle j'ai participé, est d'ailleurs en cours de rédaction au sein de l'équipe.

La mise en place d'une thérapie pharmacologique visant à induire *ABCD2* chez les patients atteints d'X-ALD nécessite d'identifier le rôle précis du transporteur *ABCD2* au niveau cellulaire. Or, on ne connaît pas précisément les substrats qui sont transportés par *ABCD2*, ni son agencement dimérique au moment de la prise en charge des substrats : est-il sous la forme d'homo- ou d'hétérodimère ? Sur le modèle des demi-transporteurs ABC White, Brown et Scarlett présents chez la Drosophile (O'Hare *et al.* 1984; Dreesen *et al.* 1988; Tearle *et al.* 1989; Pepling *et al.* 1990), *ABCD2* pourrait alternativement s'homo- et s'hétéro-dimériser avec *ABCD1* et *ABCD3*, et ainsi permettre l'importation de différents substrats selon les dimères formés. De plus, aucune information n'est disponible au sujet du statut oligomérique d'*ABCD2* et de ses partenaires protéiques. En effet, d'après la littérature, certains demi-transporteurs ABC pourraient exister dans les membranes sous formes de complexes oligomériques de taille supérieure à un dimère. Ainsi, *ABCD2* pourrait appartenir à des complexes oligomériques, associé ou non à *ABCD1* et *ABCD3*. Au niveau agencement, *ABCD2* est également susceptible d'interagir avec des partenaires protéiques non ABC. En effet, le transport d'AGTLC dans le peroxysome nécessite probablement l'intervention de protéines solubles chargées de véhiculer le substrat jusqu'au transporteur dans le cytosol, ou chargées de récupérer le substrat dans le peroxysome. En interagissant avec *ABCD2*, ces

protéines pourraient jouer un rôle dans son oligomérisation. Au final, l'agencement (dimérique et/ou oligomérique) d'ABCD2 pourrait conditionner sa spécificité de substrat, ainsi que sa fonctionnalité. Il est donc important de déterminer si l'induction d'ABCD2 chez les patients atteints d'X-ALD modifie l'agencement d'ABCD2 et sa spécificité de substrat.

Mon projet de thèse centré sur l'étude structure-fonction d'ABCD2, a été développé afin de répondre à cette problématique. Au début de ma thèse, quatre objectifs avaient été fixés :

- développer les outils nécessaires à l'étude d'ABCD2,
- étudier la fonctionnalité d'ABCD2 sous forme homo- et hétérodimérique,
- préciser l'agencement oligomérique d'ABCD2,
- et identifier ses partenaires protéiques.

Réaliser ces objectifs nécessitait un bon modèle cellulaire et des anticorps spécifiques des transporteurs ABC peroxysomaux. Mon travail a donc tout d'abord débuté par le développement de ces outils qui sont présentés dans le premier chapitre des résultats, intitulé « Les outils ». Ce chapitre détaille les deux modèles cellulaires stables créés au laboratoire, qui surexpriment de façon inductible la protéine ABCD2 (fonctionnelle ou non) fusionnée à l'EGFP (« Enhanced Green Fluorescent Protein »). Il aborde notamment le sous-clonage des deux lignées qui a permis de récupérer pour chaque clone, une population homogène. Le chapitre 1 présente également les programmes d'obtention d'anticorps polyclonaux dirigés contre nos protéines d'intérêt (ABCD1, 2 et 3) et la caractérisation de ces anticorps.

Un des objectifs de mon projet de thèse visait à préciser la fonction du transporteur ABCD2 et plus généralement des trois transporteurs ABCD peroxysomaux. Cette étude, démarrée au laboratoire dans le cadre de la thèse d'Emmanuelle Genin, avait pour but d'identifier les substrats transportés par la protéine ABCD2, grâce aux modèles cellulaires surexprimant ABCD2 fusionnée à l'EGFP mentionnés ci-dessus. Le chapitre 2 des résultats intitulé « Caractérisation fonctionnelle d'ABCD2 » présente l'article qui découle de ce travail, article publié dans *Journal of Biological Chemistry* en 2011 « Substrate specificity overlap and interaction between Adrenoleukodystrophy protein (ALDP/ABCD1) and Adrenoleukodystrophy-related protein (ALDRP/ABCD2) » (Genin *et al.* 2011) auquel j'ai participé activement, notamment pour les expériences de caractérisation des interactions protéine-protéine.

Le chapitre 3 des résultats intitulé « Lien entre agencement dimérique et fonction des transporteurs ABCD peroxysomaux », présente les résultats que j'ai obtenus à partir d'une approche complémentaire basée sur la création et l'utilisation de dimères chimériques. L'objectif de ce projet était d'identifier les substrats pris en charge par les transporteurs ABCD peroxysomaux sous forme d'homodimères et d'hétérodimères. La fonctionnalité des dimères chimériques a été testée dans deux modèles cellulaires : des fibroblastes cutanés issus d'un patient atteint d'X-ALD, et dans un modèle de levures dépourvues de transporteurs ABC peroxysomaux, en collaboration avec le Dr van Roermund (Equipe du Pr Wanders, Amsterdam, Pays-Bas). D'après les résultats, les transporteurs ABCD peroxysomaux seraient fonctionnels aussi bien sous forme d'homodimères que d'hétérodimères.

La suite de mon projet de thèse a visé à caractériser la structure d'ABCD2 et plus généralement des transporteurs ABCD peroxysomaux. L'objectif était de clarifier leur statut oligomérique, mais également d'identifier leurs partenaires protéiques. Afin de caractériser le statut oligomérique des transporteurs ABCD peroxysomaux, une approche multi-technique ayant déjà fait ses preuves pour d'autres protéines ABC a été choisie. Elle est basée sur les techniques biochimiques de co-immunoprécipitation, de sédimentation sur gradient de sucrose et d'électrophorèse en condition native. Les résultats sont présentés dans le chapitre 4 des résultats intitulé « Statut oligomérique des transporteurs ABCD peroxysomaux ».

L'identification des partenaires protéiques des transporteurs ABCD peroxysomaux constituait le dernier objectif de mon projet de thèse. Le projet reposait sur des techniques de co-immunoprécipitation et de gel bidimensionnel. Par manque de temps, je n'ai pas pu véritablement démarrer ce travail, mais j'ai néanmoins contribué à mettre au point les techniques nécessaires, lors de l'étude sur l'oligomérisation des transporteurs ABCD peroxysomaux. Ce travail de mise au point devrait faciliter le travail de l'équipe et d'un futur thésard visant à identifier les partenaires protéiques des transporteurs ABCD peroxysomaux.

RESULTATS

CHAPITRE 1 : LES OUTILS

I. LES MODELES CELLULAIRES

La caractérisation fonctionnelle d'ABCD2, ainsi que l'étude du statut oligomérique des transporteurs ABCD1, ABCD2 et ABCD3 a été réalisée sur un modèle de cellules transfectées de façon stable, obtenu à partir de cellules d'hépatomes de rats H4IIEC3 (clone 28). Ce modèle cellulaire élaboré au laboratoire, surexprime de manière inducible selon la dose de doxycycline ajoutée, la protéine ABCD2 fusionnée à l'EGFP de masse moléculaire 110 kDa (Gueugnon *et al.* 2006) (Figure 15). Les cellules H4IIEC3 présentent l'avantage d'exprimer ABCD1 et ABCD3, mais pas (ou quasiment pas) ABCD2, au niveau basal. Ainsi, le niveau d'expression d'ABCD2-EGFP étant dépendant de la dose de doxycycline, ce modèle permet de se placer dans différentes conditions pour observer d'éventuelles modifications des interactions protéine-protéine impliquant ABCD2.

En plus du clone 28, nous disposons également d'un second clone cellulaire obtenu à partir de cellules d'hépatomes de rats H4IIEC3, qui surexprime la protéine ABCD2 mutée fusionnée à l'EGFP (clone 19). Le mutant ABCD2 présente une modification unique dans sa séquence (D207H) qui est naturellement retrouvée dans la protéine ABCD1, chez certains patients atteint d'X-ALD (D196H). Chez les patients, cette mutation affecte la fonctionnalité de la protéine, sans entraver son adressage au peroxysome, ni sa capacité à se dimériser (Unterrainer *et al.* 2000)

Les cellules hépatiques H4IIEC3 constituent un bon modèle cellulaire pour l'étude de protéines peroxysomales car le foie est le principal organe du métabolisme lipidique. De plus, même si *ABCD2* n'y est pas fortement exprimé, son expression hépatique est fortement régulée. En effet, son expression est induite *in vivo* par différents mécanismes¹¹, dans le foie de rat ou de souris traitées à l'hormone thyroïdienne T3, aux fibrates, ou encore au 4-PBA. De plus, les cellules H4IIEC3 expriment l'ensemble des enzymes de la β -oxydation et répondent au ciprofibrate, un proliférateur de peroxysome (Osumi *et al.* 1990).

L'étude sur l'oligomérisation des transporteurs ABCD peroxysomaux nécessite une population cellulaire homogène au niveau de l'expression du transgène *ABCD2-EGFP*. Or, le clone 28 obtenu au laboratoire et sur lequel j'ai démarré mon étude présentait une population hétérogène (Figure 15A), suggérant une extinction progressive de l'expression du transgène au cours des passages en culture cellulaire. Afin d'être dans les conditions optimales lors des

¹¹ Voir page 67 : Les traitements visant à induire l'expression d'*ABCD2* et/ou *ABCD3*

expériences ultérieures de sédimentation sur gradient de sucrose, d'immunoprécipitation et de gels natifs, il a été nécessaire de récupérer une population de cellules homogène avec un niveau d'expression élevé pour la protéine ABCD2-EGFP. Pour cela, nous avons choisi de sous-cloner le clone 28 par dilution limite. Cette technique permet d'isoler plusieurs cellules qui redonneront chacune une population clonale sur laquelle sera testée l'expression de la protéine ABCD2-EGFP. Le clone 28 a été dilué puisensemencé à trois concentrations de cellules différentes (0,05 ; 0,5 et 5 cellules/puits) dans des plaques 96 puits prétraitées avec des protéines de la matrice extracellulaire (poly-L-Lysine). Une quarantaine de sous-clones isolés ont ainsi été obtenus puis analysés par cytométrie en flux selon leur niveau de fluorescence émise par l'EGFP fusionnée à ABCD2.

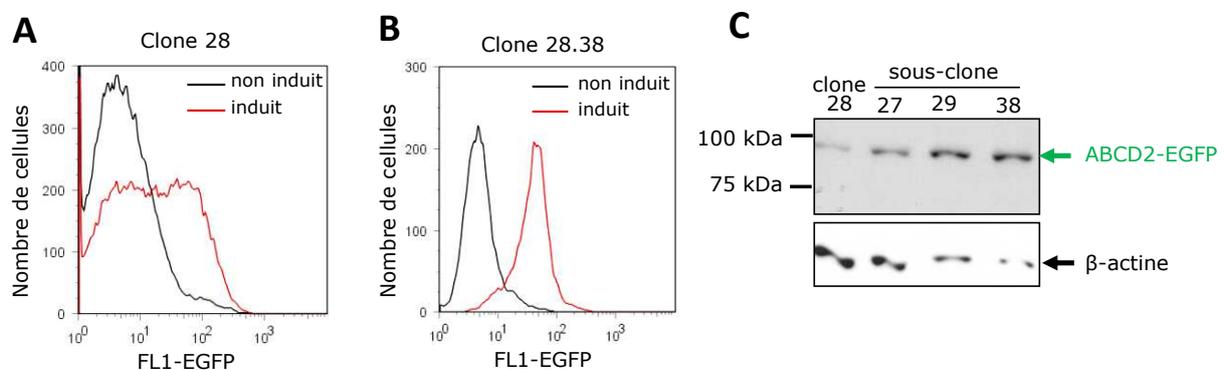


Figure 15 : Analyse des clones obtenus par sous-clonage du clone 28. L'expression de la protéine recombinante ABCD2-EGFP est analysée en cytométrie en flux, après induction par la doxycycline (2µg/mL) du clone 28 avant (A) et après sous-clonage par dilution limite (clone 28.38) (B). Une quarantaine de clones isolés ont été analysés par cytométrie en flux, seulement trois ont été analysés par Western-blotting (clones 28.27, 28.29 et 28.38) avec un anticorps anti-GFP (C). Vingt µg de lysats totaux ont été déposés et un contrôle de charge avec un anticorps anti-β actine a été effectué.

Sur les 40 sous-clones, 3 présentaient des décalages importants de fluorescence lorsque l'expression d'ABCD2-EGFP est induite par la doxycycline, 10 présentaient des décalages intermédiaires et 27 présentaient des décalages faibles voire nuls (données non présentées). Les 3 sous-clones présentant une population homogène et la fluorescence EGFP la plus élevée ont été sélectionnés (clone 28.27, clone 28.29 et clone 28.38 dont l'analyse en cytométrie est donnée Figure 15B) et les niveaux d'expression des trois sous-clones sélectionnés en ABCD2-EGFP ont été comparés par Western-blotting (Figure 15C). Le clone 28.38 présente le plus fort niveau d'expression d'ABCD2-EGFP après induction à la doxycycline et une population homogène (Figure 16). Il a donc été sélectionné puis mis en expansion et conservé dans l'azote liquide, pour les études ultérieures sur le statut oligomérique des transporteurs ABCD peroxysomaux et la caractérisation fonctionnelle d'ABCD2.

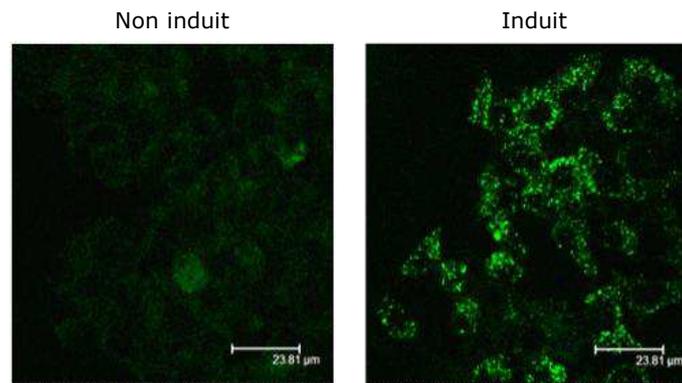


Figure 16 : Visualisation de la fluorescence de l'EGFP en microscopie confocale dans le clone 28.38, surexprimant ABCD2-EGFP seulement après induction à la doxycycline (2µg/mL)

Suite au succès de ce sous-clonage, le clone 19 qui surexprime la protéine ABCD2 mutée fusionnée à l'EGFP, a également été sous-cloné. Le clone 19.55 obtenu, présentant une population homogène et une forte expression du transgène (résultats non montrés), a été utilisé lors de la caractérisation fonctionnelle d'ABCD2.

Il est important de noter que la plupart du temps mais pas systématiquement, la révélation de la protéine ABCD2-EGFP en immunoblot aboutit à l'obtention de deux bandes à approximativement 100 kDa et 80 kDa, la masse moléculaire théorique d'ABCD2-EGFP étant de 110 kDa (Figure 17). Ces deux bandes apparaissent seulement lorsque le clone 28.38 est induit à la doxycycline et surexprime ABCD2 fusionnée à l'EGFP. Ces deux bandes sont donc spécifiques de la présence d'ABCD2-EGFP.

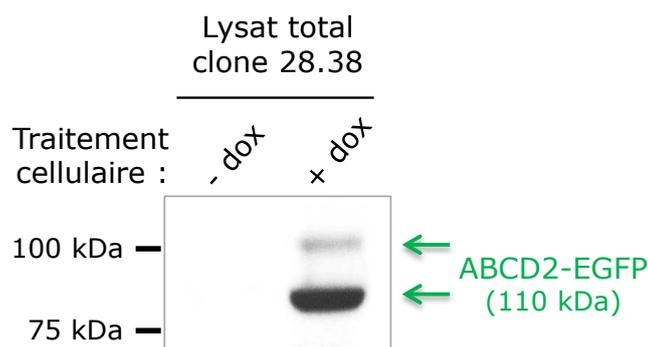


Figure 17 : Détection de la protéine recombinante ABCD2-EGFP en immunoblot, avant et après induction du clone 28.38 à la doxycycline (2µg/mL).

Afin d'expliquer l'apparition de deux bandes lors de la révélation d'ABCD2-EGFP en immunoblot, nous avons émis et tenté de vérifier plusieurs hypothèses.

La séquence ARNm d'ABCD2 de rat présente un site d'initiation de traduction secondaire AUG en position 643, dans un contexte Kozak favorable (séquence consensus Kozak :

CCACCAUGG). L'utilisation de ce site d'initiation est susceptible d'induire la synthèse d'une protéine ABCD2, plus courte de 214 acides aminés à son extrémité N-terminale. L'analyse du produit de traduction *in vitro* de la séquence ADNc (ADN complémentaire) d'ABCD2 de rat, permet d'observer une bande majoritaire à environ 75 kDa, mais également une seconde bande à environ 55 kDa (Figure 18). La bande minoritaire à 55 kDa pourrait correspondre à la protéine ABCD2 synthétisée à partir du second site d'initiation de traduction. La différence de 20 kDa observée entre ces deux bandes (75 kDa contre 55 kDa), est proche de la différence de taille observée entre les deux bandes correspondant à ABCD2-EGFP (100 kDa contre 80 kDa ; Figure 17). Cependant, la révélation d'ABCD2-EGFP en immunoblot aboutit parfois uniquement à l'apparition de la bande inférieure, parfois uniquement à l'apparition de la bande supérieure. Or si les deux sites d'initiation étaient utilisés, les deux bandes apparaîtraient à chaque révélation d'ABCD2-EGFP. De plus, l'utilisation du second site d'initiation aboutirait à la synthèse d'un demi-transporteur ABCD2 délesté de ses 3 premières hélices transmembranaires et de sa séquence d'adressage au peroxysome¹²... Or la protéine ABCD2-EGFP est toujours retrouvée dans la membrane du peroxysome. Il est donc peu probable que l'apparition d'une bande supplémentaire lors de la révélation d'ABCD2-EGFP en immunoblot soit liée à l'utilisation d'un site d'initiation secondaire.

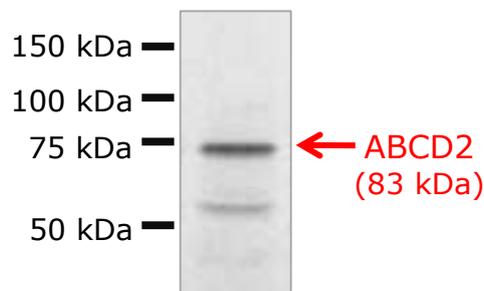


Figure 18 : Autoradiogramme du produit de traduction *in vitro* de la séquence ADNc d'ABCD2 de rat, en présence de méthionine radiomarquée au 35S. Le produit de traduction a été déposé sur SDS-PAGE, puis révélé par autoradiographie.

La bande à 80 kDa correspondant à ABCD2-EGFP dans le lysat du clone 28.38 (Figure 17) et la bande à 55 kDa correspondant à ABCD2 dans le produit de traduction *in vitro* (Figure 18), pourraient également être liées à la dégradation par protéolyse des protéines ABCD2-EGFP et ABCD2. Cette protéolyse pourrait avoir lieu malgré la présence d'inhibiteurs de protéases utilisés lors de la lyse cellulaire, et pourrait avoir lieu même dans les expériences de traduction *in vitro*. En effet, il n'est pas exclu que le lysat de réticulocytes nécessaire pour la

¹² Voir page 20 : Synthèse et importation des protéines membranaires

transcription/traduction *in vitro* contienne des protéases. Afin de tester l'hypothèse de la protéolyse, le lysat du clone 28.38 a été incubé avec ou sans inhibiteurs de protéases, à 4°C ou à température ambiante, durant 7 heures. Les échantillons ont ensuite été analysés en immunoblot avec l'anticorps anti-GFP (« Green Fluorescent Protein »). Les deux bandes correspondant à ABCD2-EGFP présentaient la même intensité, quelles que soient les conditions de préparation des échantillons nous amenant à conclure que les bandes de 80 kDa et de 55 kDa ne correspondent pas à des produits de dégradation.

Il est également possible que l'apparition de deux bandes soit due à un effet de migration. En effet, le même lysat protéique du clone 28.38, déposé dans plusieurs puits d'un gel d'acrylamide et analysé en immunoblot, présente des variations d'intensité des deux bandes correspondant à ABCD2-EGFP. Dans certaines pistes, seule la bande à 100 kDa apparaît, alors que dans d'autres pistes seule la bande à 80 kDa apparaît. Ce problème de double bande a déjà été décrit sur SDS-PAGE et peut être expliqué par le pouvoir oxydant du gel d'acrylamide dû à la présence de persulfate d'ammonium résiduel et de ses produits de réaction. Une autre explication serait que le tampon de charge ne contiendrait pas suffisamment d'agents réducteurs (« Gel Electrophoresis of Proteins ; A Practical Approach » third edition ; Edited by B.D. Hames). Malheureusement, ni la préparation d'un tampon de charge frais, ni la pré-migration à vide du gel d'électrophorèse n'a permis de résoudre le problème.

Enfin, nous nous sommes rendu compte qu'une double bande est également obtenue lors de la migration sur SDS-PAGE de la protéine EGFP seule (Figure 19).

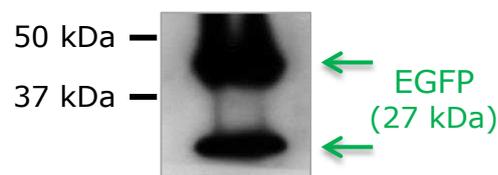


Figure 19 : Détection de la protéine EGFP en immunoblot dans le lysat de fibroblastes cutanés issus d'un patient atteint d'*X-ALD*, transfectés par un plasmide codant la protéine EGFP.

La protéine EGFP est décrite pour être une protéine robuste. Pour la dénaturer complètement, il est nécessaire non seulement de la mettre en présence d'urée, de SDS et d'agent(s) réducteur(s), mais également de chauffer quelques minutes l'échantillon à 95°C. Sans chauffage, la dénaturation de la protéine est partielle, ce qui explique la présence d'une bande à 30 kDa (protéine dénaturée) et d'une bande à 40 kDa (protéine partiellement dénaturée). Or

nos échantillons protéiques déposés sur SDS-PAGE ne subissent pas d'étape de chauffage à 95°C. En effet, cette étape renforce les interactions hydrophobes et aboutit à la formation d'agrégats qui ne pénètrent pas dans le gel d'électrophorèse. L'absence de chauffage est valable pour toutes les protéines membranaires et notamment pour les protéines membranaires à plusieurs passages, comme c'est le cas pour les transporteurs ABCD peroxysomaux.

Au final, la double bande correspondant à ABCD2-EGFP dans le lysat du clone 28.38 est très probablement due au fait que nos échantillons protéiques ne sont pas totalement dénaturés, mais également à la présence de la protéine EGFP. Par conséquent, il faut toujours prendre en compte les deux bandes visualisées à 100 et 80 kDa lors de l'analyse de la protéine ABCD2-EGFP en immunoblot.

II. LES ANTICORPS

Les études sur le statut oligomérique des transporteurs ABCD peroxysomaux de rat nécessitent bien entendu des anticorps spécifiques qui soient réactifs en condition native (expériences de Duolink et d'immunoprécipitation) et/ou dénaturante (immunoblot).

Pour le transporteur ABCD1, le laboratoire dispose d'une petite quantité d'anticorps polyclonal de lapin anti-ABCD1 de souris (peptide localisé à l'extrémité C-terminale d'ABCD1 de souris : ⁷⁰⁰EQQLAGIPKMQGRLQELRQILGEAAAPVQPLVPGVPT⁷³⁶), réactif en immunoblot et en immunofluorescence sur la protéine de rat fournit par le Pr Aubourg et le Dr Cartier (Fouquet *et al.* 1997) (Tableau 4). Tous les anticorps anti-ABCD1 commercialisés et testés au laboratoire en immunoblot, se sont révélés inefficaces.

En ce qui concerne le transporteur ABCD2, des anticorps polyclonaux de lapin réactifs en immunoprécipitation dirigés contre ABCD2 de rat (peptide ⁴⁴⁴VTQEPENNSKSGGGL⁴⁵⁸) ont été obtenus via la société Eurogentec (Seraing, Belgique) et caractérisés au laboratoire (Tableau 4). En revanche, tous les anticorps anti-ABCD2 commercialisés se sont révélés inefficaces en immunoblot (Santa Cruz, #sc-20972 #sc-21380). L'EGFP ajoutée à la partie C-terminale d'ABCD2 dans le clone 28.38 permet tout de même de détecter la protéine ABCD2.

Quant au transporteur ABCD3, l'anticorps polyclonal de lapin anti-ABCD3 de rat (peptide localisé à l'extrémité C-terminale ⁶³⁸MDGRGNIEFKKITEDTVEFGS⁶⁵⁹) commercialisé par la société Life Technologies (Ref 718300) est réactif en immunoblot mais donne un bruit de fond important. Un anticorps polyclonal de lapin dirigé contre ABCD3 de rat (immunisation de lapins par la protéine ABCD3 de rat, purifiée sur gel SDS-PAGE à partir de membranes peroxysomales) obtenu et caractérisé au laboratoire, est réactif à la fois en immunoblot et en immunoprécipitation mais nous arrivons à la fin du stock (Albet *et al.* 1997) (Tableau 4).

Le manque d'anticorps constitue un frein à l'étude de l'agencement moléculaire d'ABCD1, ABCD2 et ABCD3. C'est pourquoi nous avons initié plusieurs programmes visant à obtenir les anticorps qui nous manquaient, à savoir des anticorps polyclonaux de lapin dirigés contre ABCD1, ABCD2 et ABCD3 qui soient réactifs en immunoblot. Chaque anticorps a été testé avec différentes dilutions, simultanément sur une même membrane, à l'aide du système « Deca-Probe Incubation Manifolds ».

II.1. Anticorps polyclonal de lapin dirigé contre ABCD1

Etant donné que l'anticorps anti-ABCD1 de souris (anti-peptide ⁷⁰⁰EQQLAGIPKMQGRLQE LRQILGEAAAPVQPLVPGVPT⁷³⁶), fourni par le Pr Aubourg et le Dr Cartier nous donne entière satisfaction, à savoir une très bonne spécificité et une très bonne réactivité en immunoblot et en immunoprécipitation, nous nous sommes basés sur une méthodologie similaire afin de produire notre propre anticorps (Fouquet *et al.* 1997).

Deux lapins (N°925002 et N°925029) ont été immunisés (Animalerie Centrale du Centre de Zootechnie de Dijon) avec un peptide de 37 acides aminés correspondant à l'extrémité C-terminale de la protéine ABCD1 de souris (Figure 20), préalablement couplé à la protéine porteuse KLH (« Keyhole Limpet Hemocyanin ») via une cystéine rajoutée à l'extrémité N-terminale du peptide. La protéine porteuse utilisée dans l'article de référence (Fouquet *et al.* 1997) était également la KLH. L'agent de couplage utilisé, différent de celui utilisé dans l'article de référence et recommandé par la société Covalab (Villeurbanne, France) pour notre protocole, est le m-Maleimidobenzoyl-N-Hydroxysuccinimide ester puisque le peptide initial de 37 acides aminés ne contenait pas de résidus cystéine. Etant donné l'identité de séquence élevée existant entre les protéines murines et humaine, l'anticorps polyclonal produit devrait être réactif non seulement chez la souris, mais également chez le rat (100 % d'identité de séquence au sein du peptide) et l'Homme (76 % d'identité de séquence).

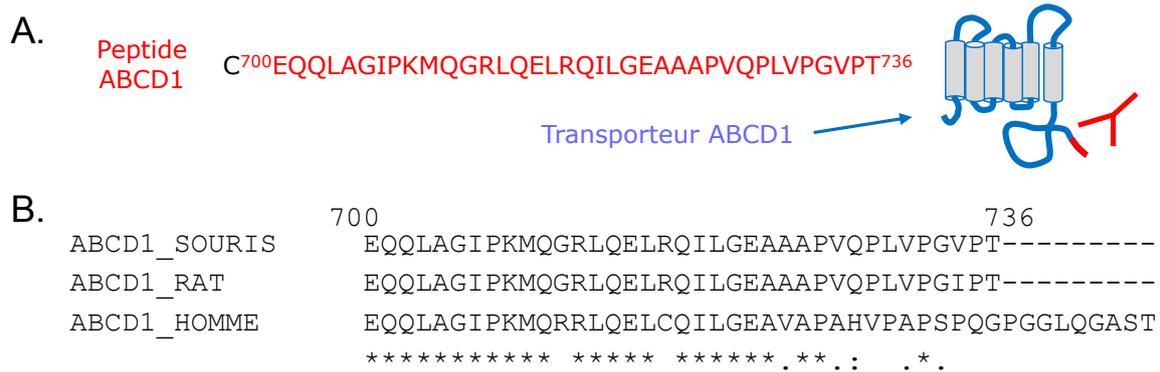


Figure 20 : Séquence du peptide utilisé lors de l'immunisation des lapins au cours du programme d'obtention d'un anticorps polyclonal dirigé contre le transporteur ABCD1 de souris.

(A.) La séquence du peptide (écrite en rouge) correspond à l'extrémité C-terminale de la protéine. Le résidu cystéine (écrit en noir) ajouté à l'extrémité N-terminale du peptide permet le couplage sur la protéine porteuse KLH, grâce à l'agent de couplage *m*-Maleimidobenzoyl-*N*-Hydroxysuccinimide ester. A droite de la figure est représenté le transporteur ABCD1 ainsi que la zone reconnue par l'anticorps. (B.) Alignement des séquences protéiques d'ABCD1 de souris, de rat et d'Homme au niveau de leurs extrémités C-terminales (ClustalW).

Les lapins ont été immunisés à 5 reprises : aux jours 0, 10, 21, 39 et 70. J'ai ensuite analysé la réactivité des sérums des lapins récupérés aux jours 39, 70 et au jour 79 (correspondant au jour de la saignée finale) en immunoblot sur un lysat de foie de souris. Le contrôle négatif correspond à un lysat de foie de souris ABCD1 « knock out » n'exprimant pas la protéine ABCD1. Les sérums ont également été testés sur un lysat d'hépatome de rat (cellules H4IIEC3). Aucun contrôle négatif n'était disponible pour le test des sérums sur lysat de rat.

Dès le jour 70, les sérums des deux lapins présentaient une réactivité en immunoblot envers la protéine ABCD1 de souris avec un très faible bruit de fond. Au jour 79, seul le sérum du lapin N°925029 a été testé en immunoblot avec une dilution allant du 1/500^{ème} au 1/15 000^{ème}, en gardant comme contrôle positif le sérum du même lapin au jour 70 (Figure 21). Les résultats par immunoblot montrent la présence d'une bande à la taille attendue (masse moléculaire théorique de 82 kDa) pour les lysats de souris et de rat qui expriment ABCD1. Le signal obtenu est bien spécifique puisque cette bande disparaît pour le lysat de souris n'exprimant pas la protéine. Ainsi, le sérum du lapin N°925029 est réactif en condition dénaturante et permet de détecter la protéine ABCD1 de souris mais également de rat en immunoblot et ce avec une très forte spécificité. Cet anticorps polyclonal est également réactif en condition native puisqu'il permet de mettre en évidence la protéine ABCD1 au niveau cellulaire par immunofluorescence (Tableau 5).

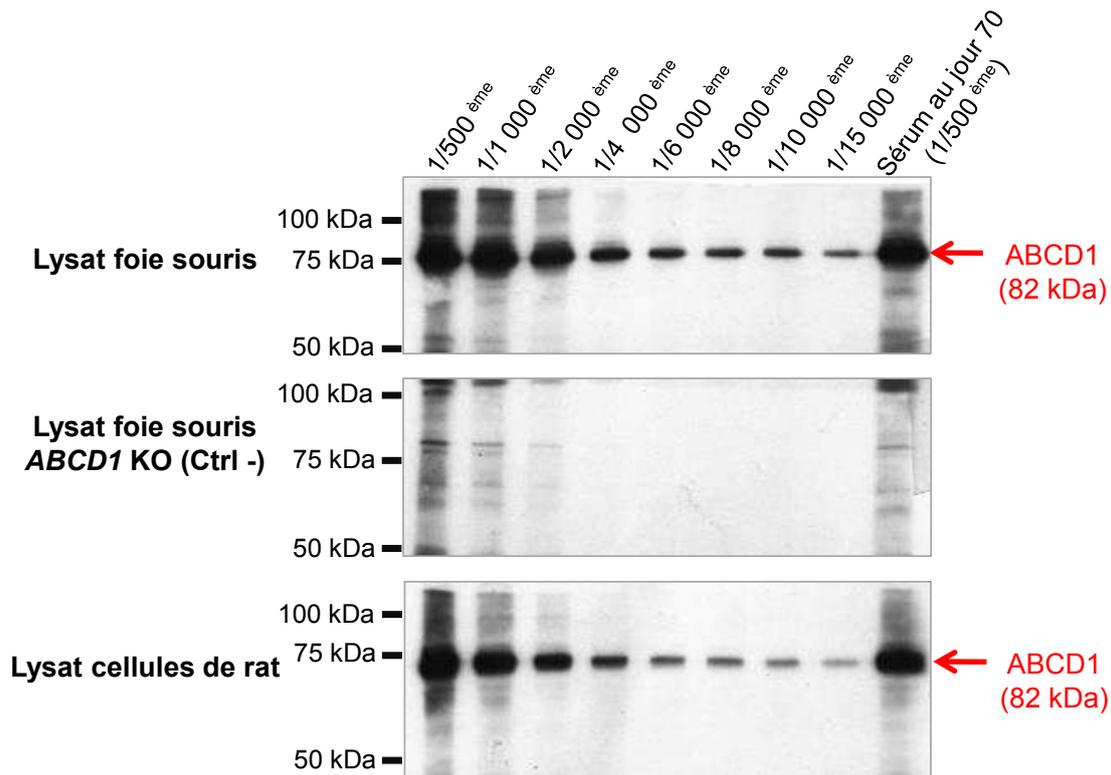


Figure 21 : Réactivité en immunoblot de l'anticorps polyclonal anti-ABCD1 (sérum du lapin N°925029) à J79.

L'anticorps a été testé sur lysat de souris (« wild type » et *Abcd1* « knock out ») et lysat de rat (cellules H4IIEC3), avec différentes dilutions (de 1/500ème au 1/15 000ème). Le sérum à J70 constitue le contrôle positif de réactivité. La masse moléculaire théorique d'ABCD1 est de 82 kDa.

II.2. Anticorps polyclonal de lapin dirigé contre ABCD2

Deux programmes visant à obtenir un anticorps polyclonal de lapin dirigé contre ABCD2 ont été initiés lors de ma thèse. Dans les deux cas, le peptide servant à immuniser les lapins correspondait à l'extrémité C-terminale de la protéine ABCD2 de souris.

Dans le premier programme, la méthodologie suivie afin d'obtenir un anticorps polyclonal de lapin dirigé contre ABCD2 a été la même que celle utilisée pour obtenir l'anticorps polyclonal dirigé contre ABCD1, adaptée de la publication (Fouquet *et al.* 1997). Lors de ce programme, deux lapins (N°925001 et N°925003) ont été immunisés avec un peptide de 17 résidus aminoacyl correspondant à l'extrémité C-terminale de la protéine ABCD2 de souris (Figure 22). Ce peptide a été préalablement couplé à la protéine porteuse KLH via une cystéine rajoutée à l'extrémité N-terminale du peptide. Etant donné l'identité de séquence élevée existant entre les protéines murines (94 %) et humaine (71 %), l'anticorps polyclonal produit devrait être efficace non seulement chez la souris, mais également chez le rat et l'Homme.

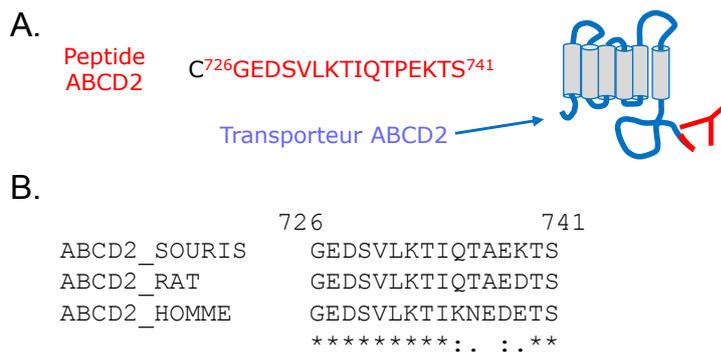


Figure 22 : Séquence du peptide utilisé lors de l'immunisation des lapins au cours du premier programme d'obtention d'un anticorps polyclonal dirigé contre le transporteur ABCD2 de souris.

(A.) La séquence du peptide (écrite en rouge) correspond à l'extrémité C-terminale de la protéine. Le résidu cystéine (en noir sur la figure) ajouté à l'extrémité N-terminale du peptide permet le couplage sur la protéine porteuse KLH, grâce à l'agent de couplage *m*-Maleimidobenzoyl-*N*-Hydroxysuccinimide ester. A droite de la figure est représenté le transporteur ABCD2 ainsi que la zone reconnue par l'anticorps. (B.) Alignement des séquences protéiques d'ABCD2 de souris, de rat et d'Homme au niveau de leurs extrémités C-terminales (ClustalW).

Les lapins ont été immunisés à 5 reprises : aux jours 0, 10, 21, 39 et 70. Les sérums ont été testés aux jours 39, 70 et au jour 79 (qui correspond à la saignée des lapins), par immunoblot sur un lysat de foie de souris surexprimant *Abcd2* suite au traitement par le 4-phénylbutyrate. Le contrôle négatif provenait de foie de souris invalidées pour les gènes *Abcd1* et *Abcd2* (*Abcd1/Abcd2* « double knock out »). Les sérums ont également été testés sur un lysat d'hépatome de rat surexprimant la protéine ABCD2 fusionnée à l'EGFP après induction à la doxycycline (clone 28.38). Le contrôle négatif correspond au lysat du clone 28.38 non induit et n'exprimant donc pas la protéine ABCD2.

Au jour 70, les sérums des deux lapins présentaient une réactivité en immunoblot envers la protéine ABCD2 de souris et de rat, bien que très faible (Figure 23A et C). Avec le sérum anti-ABCD2 du lapin N°925003, les résultats par immunoblot montrent la présence d'une bande à environ 70 kDa dans le lysat de souris (Figure 23A, piste 1/500ème), qui est certes absente du contrôle négatif (Figure 23B), mais qui n'est pas majoritaire. Cette bande pourrait donc correspondre à ABCD2 même si la taille attendue (82 kDa) diffère. Le test de ce même sérum sur lysat de rat permet de détecter ABCD2 fusionnée à l'EGFP seulement lorsque les cellules sont induites et surexpriment la protéine (Figure 23C). Ce résultat est conforté par la révélation avec l'anticorps anti-GFP (Figure 23C, piste de droite) qui permet de visualiser une bande à la même hauteur dans le lysat du clone 28.38 induit. En revanche la révélation des membranes avec le sérum du lapin N°925001 indique que ce sérum n'est pas réactif sur la protéine ABCD2. D'après ces premiers résultats obtenus, seul le sérum du lapin N°925003 a

été testé par immunoblot au jour 79, jour de la saignée finale. Cependant, la réactivité obtenue avec le sérum à J70, bien que faible, n'a pas été retrouvée avec le sérum à J79, malgré plusieurs essais.

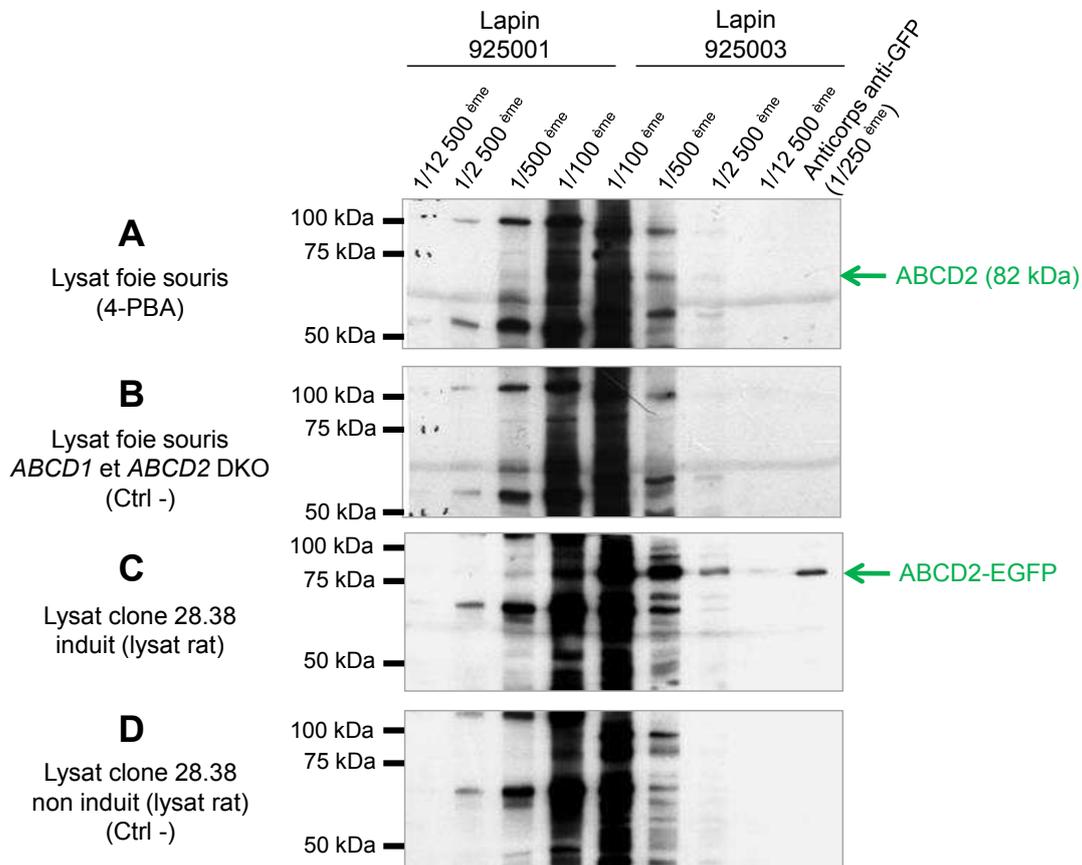


Figure 23 : Réactivité en immunoblot de l'anticorps polyclonal anti-ABCD2 (sérums des lapins N°925001 et 925003) à J70.

L'anticorps a été testé sur lysat de foie de souris (A- « wild type » surexprimant ABCD2 suite au traitement par le 4-PBA et B- *Abcd1/Abcd2* « double knock out ») et lysat de rat (C- clone 28.38 induit à la doxycycline $2\mu\text{g}/\mu\text{L}$ et D- clone 28.38 non induit), à différentes dilutions (de 1/100ème au 1/12 500ème). Les dernières pistes (à droite) ont été révélées par l'anticorps anti-GFP, qui permet de détecter la protéine ABCD2-EGFP uniquement lorsque le clone 28.38 a été traité à la doxycycline.

Un second programme d'obtention d'anticorps polyclonal dirigé contre la protéine ABCD2 a été lancé en 2012 avec la société ThermoFisher. Lors de ce programme (QML57), deux lapins (PA4958 et PA4959) ont été immunisés avec un peptide de 13 résidus aminoacyl proche de l'extrémité C-terminale de la protéine ABCD2 de souris (Figure 24). Le peptide a été choisi dans le but d'obtenir un anticorps spécifique de la protéine ABCD2 et présentant une réactivité croisée entre différentes espèces. En effet, sa séquence est parfaitement conservée entre la souris, le rat et l'Homme. L'anticorps produit devrait donc être efficace non seulement chez la souris, mais également chez le rat et l'Homme.

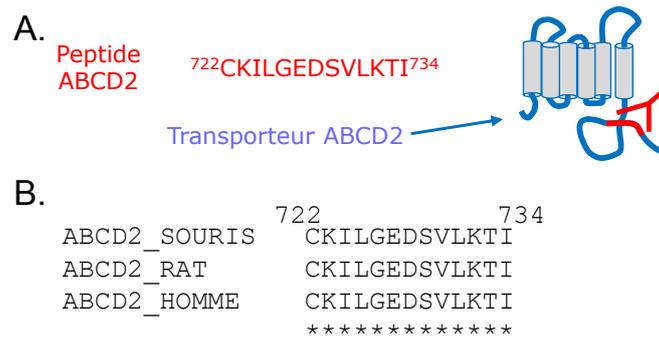


Figure 24 : Séquence du peptide utilisé lors de l'immunisation des lapins au cours du second programme (QML57, ThermoFisher) d'obtention d'un anticorps polyclonal dirigé contre le transporteur ABCD2.

(A.) La séquence du peptide (écrite en rouge) est localisée à proximité de l'extrémité C-terminale de la protéine. (B.) Alignement des séquences protéiques d'ABCD2 de souris, de rat et d'Homme (ClustalW) situées à proximité de l'extrémité C-terminales des protéines.

Le protocole a été établi sur 90 jours. Deux lapins (PA4958 et PA4959) ont été immunisés à 4 reprises : aux jours 1, 14, 42 et 56. Des échantillons de sang ont été prélevés aux jours 0, 28, 56 et 72, afin d'évaluer le niveau de production d'anticorps anti-ABCD2 par ELISA (« Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay »). Au jour 72, les sérums des deux lapins présentaient un titre équivalent. Seules les IgG (Immunoglobulines G) du sérum du lapin PA4958 ont été purifiées par affinité sur des billes de sépharose couplées au peptide antigénique « ⁷²²CKILGEDSVLKTI⁷³⁴ ». Après purification, les immunoglobulines présentaient un faible titre par ELISA, laissant présager une faible concentration en anticorps dirigé contre ABCD2 et/ou une faible réactivité de l'anticorps. La réactivité du sérum du lapin PA4958 et des IgG purifiées a été évaluée en immunoblot sur un lysat d'hépatome de rat surexprimant la protéine ABCD2 fusionnée à l'EGFP (clone 28.38), à une dilution allant du 1/100^{ème} au 1/10000^{ème} (Figure 25A). Le contrôle négatif correspond à un lysat cellulaire du clone 28.38 non induit, c'est-à-dire n'exprimant pas la protéine ABCD2-EGFP (Figure 25B).

Concernant le sérum anti-ABCD2 non purifié du lapin PA4958, aucune réactivité n'est observée (Figure 25). Avec les IgG purifiées à partir du sérum du lapin PA4958, les résultats par immunoblot montrent la présence de deux bandes au niveau du lysat du clone 28.38 induit qui sont identiques à celles obtenues avec l'anticorps anti-GFP (Figure 25A). Ces deux bandes, bien que de faible intensité par rapport aux bandes aspécifiques, semblent donc correspondre à la protéine de fusion ABCD2-EGFP. Cependant, le même anticorps utilisé sur le lysat du clone 28.38 non induit, n'exprimant pas ABCD2-EGFP, révèle 2 bandes contaminantes exactement à la même taille qu'ABCD2-EGFP, mais tout de même de plus

faible intensité. Ces résultats ne sont pas étonnant au vu du faible titre obtenu par ELISA pour les IgG purifiés.

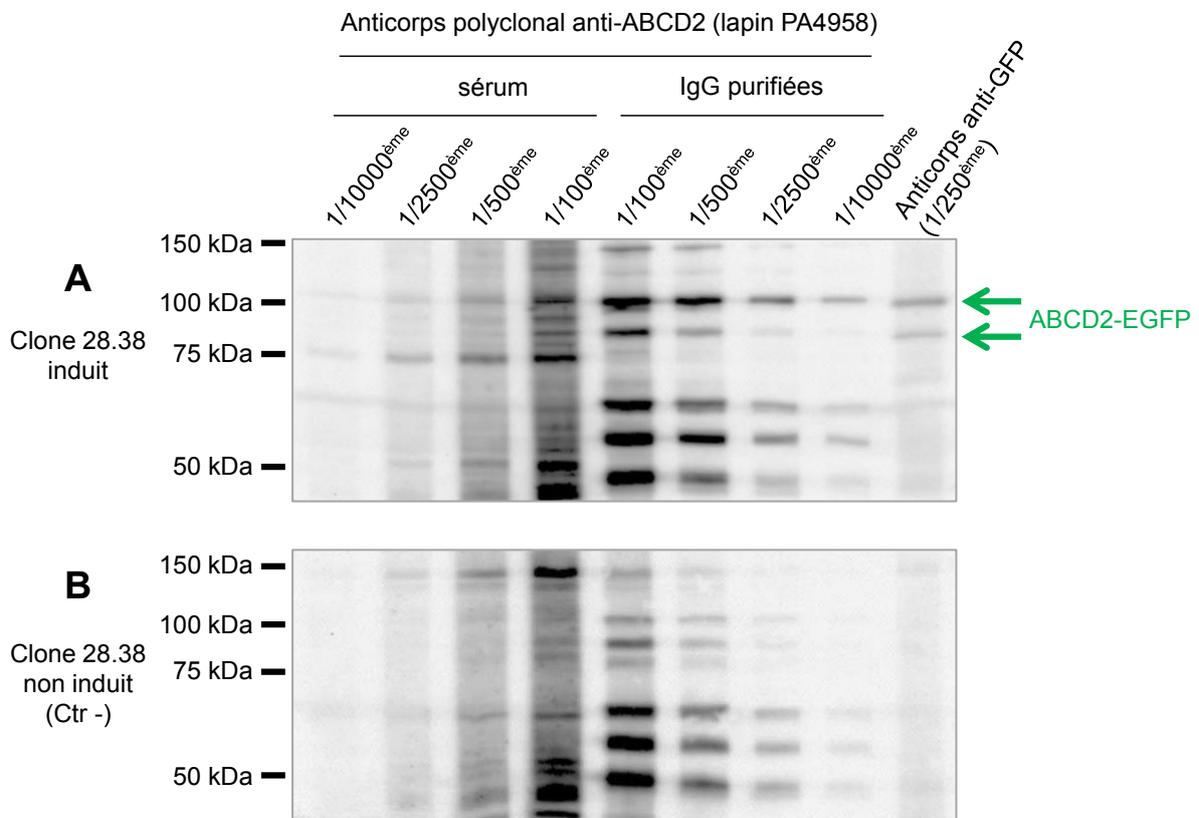


Figure 25 : Réactivité en immunoblot de l'anticorps polyclonal anti-ABCD2 (sérum du lapin PA4958 au jour 72 et IgG purifiées à partir de ce même sérum). L'anticorps a été testé sur lysat de rat : (A) clone 28.38 induit à la doxycycline $2\mu\text{g}/\mu\text{L}$ et (B) non induit (contrôle négatif, Ctr-), à différentes dilutions allant de $1/100^{\text{ème}}$ à $1/10\,000^{\text{ème}}$. L'utilisation de l'anticorps anti-GFP permet de détecter la protéine ABCD2-EGFP surexprimée par le clone 28.38 après traitement à la doxycycline.

L'anticorps polyclonal anti-ABCD2 de souris permettrait donc de détecter la protéine ABCD2 de rat en condition dénaturante, avec cependant une faible réactivité et une faible spécificité (Tableau 5). Le peptide antigénique utilisé pour l'immunisation du lapin, présentant une séquence parfaitement conservée entre ces trois espèces, l'anticorps devrait être réactif envers la protéine ABCD2 de souris et humaine. La réactivité de l'anticorps a donc également été testée en immunoblot sur lysat de souris et sur lysat cellulaire humain (Figure 26), en gardant comme contrôle positif le lysat du clone 28.38 exprimant la protéine ABCD2 de rat fusionnée à l'EGFP.

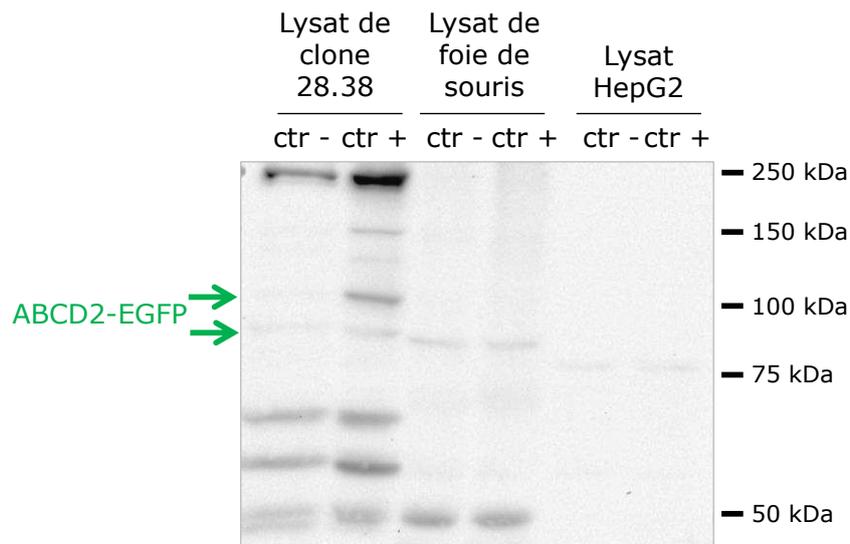


Figure 26 : Réactivité en immunoblot de l'anticorps polyclonal anti-ABCD2 (IgG purifiées à partir du sérum du lapin PA4958 au jour 72).

L'anticorps a été testé à une dilution de 1/2500^{ème}, sur lysat de cellules hépatiques de rat : clone 28.38 induit à la doxycycline 2µg/µL (=contrôle positif, ctr+) et non induit (=contrôle négatif, ctr-); sur lysat de souris : foie de souris « wild type » surexprimant ABCD2 après traitement au 4-PBA (ctr+) et foie de souris ABCD1/ABCD2 « double knock out »(ctr-); et sur lysat de cellules hépatiques humaines : cellules HepG2 (lignée cellulaire hépatique issue d'un carcinome humain) n'exprimant pas la protéine ABCD2 (ctr-) et la surexprimant après traitement à l'hormone thyroïdienne T3 (ctr+).

Aucun signal susceptible de correspondre à la protéine ABCD2 n'est observé. L'anticorps est donc peu, ou pas réactif envers la protéine ABCD2 de souris et envers la protéine ABCD2 humaine. Cependant, cette absence de signal pourrait être liée à la variation de l'expression d'ABCD2 selon les espèces et les types cellulaires. C'est pourquoi j'ai cherché à enrichir mes échantillons protéiques en protéine ABCD2 dans le but d'augmenter le signal en immunoblot et d'éliminer les signaux non spécifiques. L'enrichissement en protéine ABCD2 a été réalisé en purifiant les membranes de cellules hépatiques humaines. Les cellules ont été éclatées dans un homogénéisateur de type Dounce (Dounce A), puis les membranes totales ont été culotées par ultracentrifugation.

Les fractions membranaires ont été préparées à partir de cellules HepG2 (lignée cellulaire hépatique issue d'un carcinome humain) non traitées qui n'expriment pas ABCD2 et à partir de cellules HepG2 traitées 4 jours à l'hormone thyroïdienne T3, induisant l'expression du gène ABCD2 dans ces cellules visualisée par RT-QPCR (« Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction ») (Genin *et al.* 2009). Ce test n'a pas été concluant (résultats non montrés) et ne nous permet pas d'affirmer que l'anticorps polyclonal anti-ABCD2 est réactif sur ABCD2 d'Homme.

L'anticorps anti-ABCD2 a également été testé par un membre de l'équipe du Pr Berger (Vienne, Autriche) sur un lysat de bactéries *E. coli* transformées par un plasmide codant la protéine GST (Glutathion-S-Transférase) fusionnée au domaine cytoplasmique de la protéine ABCD2 humaine. L'anticorps anti-ABCD2 reconnaît une protéine à la taille attendue d'environ 70 kDa seulement lorsque les bactéries sont induites et expriment la protéine de fusion (Figure 27). Ces résultats nous laissent penser que finalement, l'anticorps anti-ABCD2 est réactif sur la protéine ABCD2 humaine mais que sa réactivité est faible puisque la détection n'est obtenue que lorsque la protéine est fortement surexprimée.

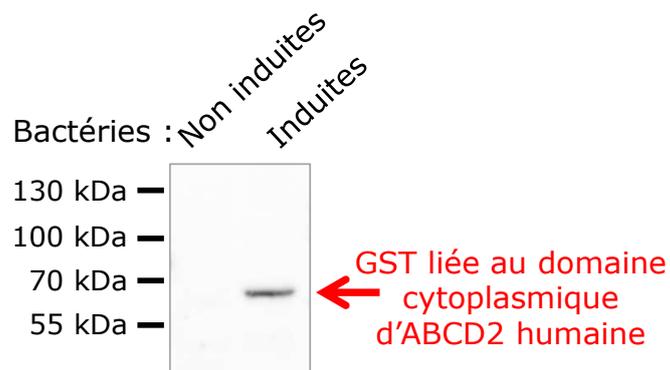


Figure 27 : Réactivité en immunoblot de l'anticorps polyclonal anti-ABCD2 (IgG purifiées à partir du sérum du lapin PA4958 au jour 72).

L'anticorps a été testé à une dilution de $1/3000^{\text{ème}}$, sur un lysat de bactéries exprimant la protéine GST fusionnée au domaine cytoplasmique d'ABCD2 d'Homme, seulement après induction à l'IPTG (IsoPropyl β -D-1-ThioGalactopyranoside). L'IPTG est utilisé pour induire l'expression de la protéine recombinante qui est placée sous le contrôle du promoteur lac.

II.3. Anticorps polyclonal de lapin dirigé contre ABCD3

Un programme d'obtention d'anticorps polyclonal dirigé contre la protéine ABCD3 a également été lancé en 2012 avec la société ThermoFisher, simultanément au programme d'obtention de l'anticorps polyclonal anti-ABCD2 décrit ci-dessus. Lors de ce programme (QML58), deux lapins (PA4960 et PA4961) ont été immunisés avec un peptide de 18 résidus aminoacyl localisé à l'extrémité C-terminale de la protéine ABCD3 de souris (Figure 28). Le peptide a été choisi dans le but d'obtenir un anticorps spécifique de la protéine ABCD3 et présentant une réactivité croisée entre différentes espèces. Vu que sa séquence est parfaitement conservée entre la souris et le rat et diffère seulement d'un acide-aminé chez l'Homme, l'anticorps attendu devrait être réactif non seulement chez la souris, mais également chez le rat et l'Homme.

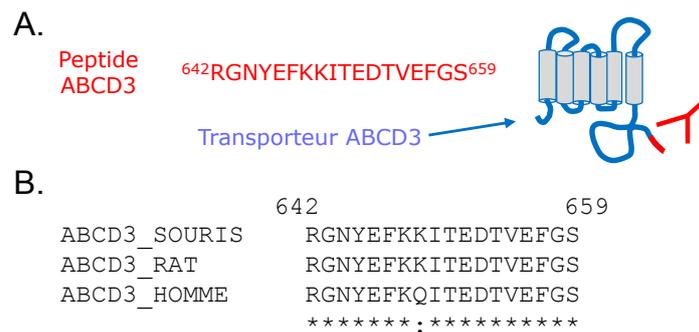


Figure 28 : Séquence du peptide utilisé lors de l'immunisation des lapins au cours du programme (QML58, ThermoFisher) d'obtention d'un anticorps polyclonal dirigé contre le transporteur ABCD3. (A.) La séquence du peptide (écrite en rouge) est localisée à l'extrémité C-terminale du transporteur. (B.) Alignement des séquences protéiques d'ABCD3 de souris, de rat et d'Homme (ClustalW) situées à l'extrémité C-terminales des protéines.

Après 4 immunisations successives (J1, J14, J42, J56) des deux lapins du programme, le sérum du lapin PA4961 à J72 présentait le titre le plus élevé par ELISA, et les IgG contenues dans ce sérum ont été purifiées par affinité (billes de sépharose couplées au peptide antigénique « ⁶⁴²RGNYEFKKITEDTVEFGS⁶⁵⁹ »). Après purification, les IgG présentaient un titre élevé, laissant présager une concentration élevée en anticorps dirigé contre ABCD3 et/ou une bonne réactivité de l'anticorps. La réactivité du sérum du lapin PA4961 ainsi que des IgG purifiées à partir de ce sérum a été évaluée en immunoblot sur un lysat d'hépatome de rat exprimant la protéine ABCD3 au niveau basal (cellules H4IIEC3), à une dilution allant du 1/100^{ème} au 1/10000^{ème} (Figure 29). La dernière piste de la membrane est révélée avec l'anticorps polyclonal anti-ABCD3 réactif en immunoblot précédemment obtenu au laboratoire (Albet *et al.* 1997).

Les résultats par immunoblot montrent la présence d'une bande à une taille légèrement inférieure à celle attendue (masse moléculaire théorique de 75 kDa) pour le lysat de rat. De plus, cette bande est à la même hauteur que celle révélée avec l'anticorps polyclonal anti-ABCD3 du laboratoire. Ainsi, les IgG purifiées à partir du sérum du lapin PA4961 sont réactives en condition dénaturante et permettent de détecter la protéine ABCD3 de rat en immunoblot et ce avec une forte spécificité. Cependant, il faudra l'utiliser à très faible dilution afin de détecter un signal (au 1/100^{ème}). Le sérum du lapin PA4961 possède quant à lui une bonne réactivité mais une spécificité plus faible (Figure 29).

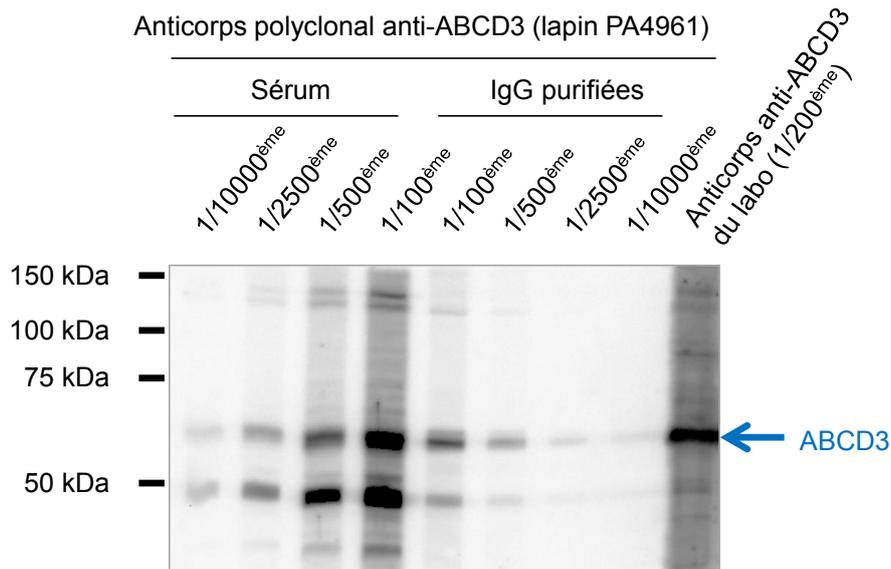


Figure 29 : Réactivité en immunoblot de l'anticorps polyclonal anti-ABCD3 (sérum du lapin PA4961 au jour 72 et IgG purifiées à partir de ce même sérum). L'anticorps a été testé à différentes dilutions allant de 1/100ème au 1/10 000ème, sur lysat de cellules H4IIEC3 exprimant la protéine ABCD3 au niveau basal. L'anticorps polyclonal anti-ABCD3 obtenu il y a quelques années au laboratoire et réactif en immunoblot au 1/200ème, constitue le contrôle positif de réactivité.

Etant donné que la séquence du peptide antigénique utilisé pour l'immunisation du lapin est conservée chez la protéine de rat et de souris, et que seul un acide-aminé diverge sur la séquence de l'Homme (**Erreur ! Source du renvoi introuvable.**), l'anticorps devrait être éactif envers la protéine ABCD2 de souris et humaine. La réactivité de l'anticorps polyclonal anti-ABCD3 (IgG purifiées à partir du sérum du lapin PA4961) a donc été évaluée sur la protéine ABCD3 de souris et d'Homme (Figure 30).

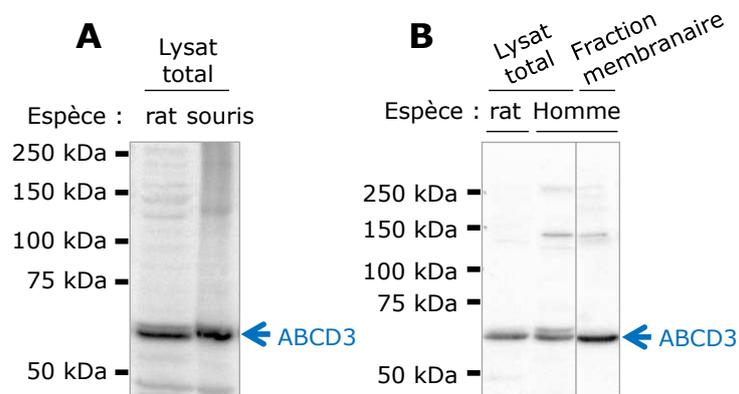


Figure 30 : Réactivité en immunoblot de l'anticorps polyclonal anti-ABCD3 (IgG purifiées à partir du sérum du lapin PA4961 au jour 72). L'anticorps dilué au 1/100ème, a été testé sur un lysat total de souris (foie de souris WT) (A.) ; ainsi que sur un lysat total et une fraction membranaire de cellules hépatiques humaines (HepG2) (B.). Dans les deux cas, l'anticorps est également testé sur un lysat total de rat (cellules H4IIEC3) dans lequel il permet de détecter la protéine ABCD3 (=contrôle positif).

RESULTATS

CHAP 1 : LES OUTILS

Comme nous l'attendions, les IgG purifiées à partir du sérum anti-ABCD3 du lapin PA4961 sont non seulement réactives sur ABCD3 de rat mais également sur la protéine ABCD3 de souris et d'Homme (Tableau 5).

Pour conclure, sur les 4 programmes d'obtention d'anticorps polyclonal de lapin initiés durant ma thèse, deux ont abouti avec succès à la production d'anticorps anti-ABCD1 et anti-ABCD3. Ces deux anticorps présentent une réactivité croisée entre espèces, accompagnée d'une très bonne spécificité. Les résultats des deux programmes d'obtention d'anticorps polyclonal anti-ABCD2 sont plus mitigés. Toutefois, il semble que l'anticorps produit lors du second programme soit réactif sur la protéine ABCD2 de rat et d'Homme, mais avec peu de réactivité.

| | IMMUNOGENE | REACTIVITE | SOURCE / ETAT DES STOCKS |
|---------------------|--|------------------------------|--|
| Anti-ABCD1 | | | |
| Polyclonal de lapin | Peptide de souris 700aa-aa ⁷³⁶ | Souris Rat WB IF | Fouquet, Zhou et al. 1997 Petit stock |
| Anti-ABCD2 | | | |
| Polyclonal de lapin | Peptide de rat 444aa-aa ⁴⁵⁸ | Rat IP | Laboratoire BioPeroX-IL (Eurogentec) Stock important |
| Anti-ABCD3 | | | |
| Polyclonal de lapin | Peptide de rat ⁶³⁸ aa-aa ⁶⁵⁹ | Rat Homme Souris WB | Commercialisé par Life Technologies |
| Polyclonal de lapin | ABCD3 de rat purifiée | Rat WB IP | Laboratoire BioPeroX-IL Albet, Causeret et al. 1997 Stock quasiment épuisé |

Tableau 4 : Récapitulatif des anticorps disponibles au laboratoire au début de ma thèse

| | IMMUNOGENE | REACTIVITE | SOURCE / ETAT DES STOCKS |
|---------------------|---|------------------------------|---|
| Anti-ABCD1 | | | |
| Polyclonal de lapin | Peptide de souris 700aa-aa ⁷³⁶ | Souris Rat WB IF | Laboratoire BioPeroX-IL (Animalerie Centrale du Centre de Zootechnie, Dijon) Stock important |
| Anti-ABCD2 | | | |
| Polyclonal de lapin | Peptide de souris 726aa-aa ⁷⁴¹ | Rat Souris WB | Laboratoire BioPeroX-IL (Animalerie Centrale du Centre de Zootechnie, Dijon) Stock important |
| Polyclonal de lapin | Peptide de souris 722aa-aa ⁷³⁴ | Rat Homme WB | Laboratoire BioPeroX-IL (ThermoFisher) Stock important |
| Anti-ABCD3 | | | |
| Polyclonal de lapin | Peptide de rat ⁶³⁸ aa-aa ⁶⁵⁹ | Rat Homme Souris WB | Laboratoire BioPeroX-IL (ThermoFisher) Stock important |

Tableau 5 : Récapitulatif des anticorps produits au cours de ma thèse

**CHAPITRE 2 :
CARACTERISATION
FONCTIONNELLE D'ABCD2**

A mon arrivée en thèse, la caractérisation fonctionnelle d'ABCD2 était une problématique déjà étudiée au sein de l'équipe. L'objectif était d'identifier le ou les substrats pris en charge par le transporteur ABCD2, mais également de mieux comprendre le phénomène de redondance fonctionnelle entre ABCD2 et ABCD1.

Le travail était mené sur deux modèles cellulaires stables obtenus au laboratoire et exprimant de manière inductible la protéine ABCD2 couplée à l'EGFP : le clone 28.38 que j'ai moi-même utilisé lors de l'étude du statut oligomérique des transporteurs ABCD peroxysonaux, et le clone 19 qui surexprime une protéine ABCD2-EGFP non fonctionnelle (Gueugnon *et al.* 2006). Ces deux modèles devaient permettre d'établir une corrélation entre le niveau d'expression cellulaire d'ABCD2-EGFP (fonctionnelle ou non) et les taux d'AGTLC (saturés, mono- ou poly-insaturés) contenus dans les phospholipides, mais également d'établir une corrélation entre le niveau d'expression d'ABCD2-EGFP (fonctionnelle ou non) et le niveau de β -oxydation de certains AGTLC (C26:0, C24:0, C22:6 n-3). Ainsi, il a été observé que la surexpression d'ABCD2-EGFP (fonctionnelle) permettait de réduire la quantité d'AGTLC saturés (C26:0 et C24:0) et monoinsaturés (C26:1, C24:1) contenus dans les phospholipides, ainsi que d'augmenter la β -oxydation des AGTLC saturés et du C22:6 n-3 (DHA).

D'après ces résultats, le transporteur ABCD2 serait donc impliqué dans le transport d'AGTLC saturés et monoinsaturés, et dans le transport du DHA. Il n'a pas été possible de préciser si ABCD2 était sous forme d'homo- ou d'hétérodimère lors du transport du C26:0 ou encore, du DHA. Cependant de manière très intéressante, les résultats obtenus avec le clone 19 ont montré un effet transdominant négatif d'ABCD2-EGFP non fonctionnelle sur ABCD1, suggérant qu'ABCD2 et ABCD1 peuvent s'hétérodimériser *in vivo*. Cette interaction entre la protéine ABCD2-EGFP non fonctionnelle et le transporteur ABCD1 a été confirmée par deux co-immunoprécipitations croisées.

L'ensemble de ces résultats a fait l'objet d'une publication en 2011 dans « The Journal of Biological Chemistry », à laquelle j'ai participé au niveau des expériences de co-immunoprécipitation (Genin *et al.* 2011).

Substrate Specificity Overlap and Interaction between Adrenoleukodystrophy Protein (ALDP/ABCD1) and Adrenoleukodystrophy-related Protein (ALDRP/ABCD2)*

Received for publication, December 14, 2010, and in revised form, January 5, 2011. Published, JBC Papers in Press, January 5, 2011, DOI 10.1074/jbc.M110.211912

Emmanuelle C. Genin^{‡§}, Flore Geillon^{‡§}, Catherine Gondcaille^{‡§}, Anne Athias[¶], Philippe Gambert[¶], Doriane Trompier^{‡§}, and Stéphane Savary^{‡§1}

From the [‡]INSERM, UMR866, Centre de Recherche Lipides, Nutrition, Cancer, Dijon F-21000, the [§]Université de Bourgogne, Laboratoire de Biochimie Métabolique et Nutritionnelle (LBMN), GDRCNRS 2583, 6 Bd Gabriel, Dijon F-21000, and [¶]Plateforme de Lipidomique-IFR100, Hôpital du Bocage, Dijon F-21000, France

X-linked adrenoleukodystrophy (X-ALD) is a neurodegenerative disorder caused by mutations in the *ABCD1* gene, which encodes a peroxisomal member of the ATP-binding cassette (ABC) transporter subfamily D called ALDP. ALDP is supposed to function as a homodimer allowing the entry of CoA-esters of very-long chain fatty acids (VLCFA) into the peroxisome, the unique site of their β -oxidation. ALDP deficiency can be corrected by overexpression of ALDRP, its closest homolog. However, the exact nature of the substrates transported by ALDRP and its relationships with ALDP still remain unclear. To gain insight into the function of ALDRP, we used cell models allowing the induction in a dose-dependent manner of a wild type or a mutated non-functional ALDRP-EGFP fusion protein. We explored the consequences of the changes of ALDRP expression levels on the fatty acid content (saturated, monounsaturated, and polyunsaturated fatty acids) in phospholipids as well as on the levels of β -oxidation of 3 suspected substrates: C26:0, C24:0, and C22:6n-3 (DHA). We found an inverse correlation between the fatty acid content of saturated (C26:0, C24:0) and monounsaturated (C26:1, C24:1) VLCFA and the expression level of ALDRP. Interestingly, we obtained a transdominant-negative effect of the inactive ALDRP-EGFP on ALDP function. This effect is due to a physical interaction between ALDRP and ALDP that we evidenced by proximity ligation assays and coimmunoprecipitation. Finally, the β -oxidation assays demonstrate a role of ALDRP in the metabolism of saturated VLCFA (redundant with that of ALDP) but also a specific involvement of ALDRP in the metabolism of DHA.

X-linked adrenoleukodystrophy (X-ALD)² (OMIM 300100) is a very complex neurodegenerative disorder whose pathogenesis remains to be clarified (1). X-ALD is caused by

mutations in the *ABCD1* gene located in Xq28, which encodes a peroxisomal member of the ATP-binding cassette (ABC) transporter subfamily D called ALDP (adrenoleukodystrophy-protein) (2). This protein has the structure of a half ABC transporter, which is supposed to function as a homodimer (3, 4). However, heterodimerization with one of the other members of the ABCD subfamily (*i.e.* ALDRP (encoded by the *ABCD2* gene (5)), PMP70 (*ABCD3* (6)), and PMP69 (*ABCD4* (7, 8))) cannot be excluded especially in the situation where these proteins are overexpressed. Although a mirror expression pattern is often observed between ALDP and ALDRP when specific cell types are analyzed (9), peroxisomal ABC transporters have overlapping expression patterns rendering possible such interactions (5, 10). Coimmunoprecipitation experiments or FRET analysis have demonstrated heterodimerization in cells overexpressing the peroxisomal ABC transporters (11, 12). Although the peroxisomal localization of ALDP, ALDRP, and PMP70 is clearly demonstrated, PMP69 has recently been described to be localized in the endoplasmic reticulum and was found to be absent in the peroxisome. This excludes a possible interaction at the peroxisomal membrane with the other ABC transporters (13). Based on the model of the transport of pigment precursors in *Drosophila* (14), differences in the relative expression level of each peroxisomal ABC transporter in a single cell type could lead to alternative dimerization and consequently to a change in substrate specificity.

Defective peroxisomal β -oxidation and accumulation of saturated and monounsaturated very-long-chain fatty acids (VLCFA) are the main biochemical features of X-ALD. This observation as well as recent work in yeast (3) let suppose that ALDP participates in the entry of CoA-esters of VLCFA into the peroxisome, the unique site of their β -oxidation. In fibroblasts, the β -oxidation defect due to ALDP deficiency is partially corrected by overexpression of PMP70 and fully restored by overexpression of ALDRP (15, 16). Moreover, this partial functional gene redundancy is also recognized *in vivo* because reversion of the adrenomyeloneuropathy-like phenotype has been observed in *Abcd1* null mice overexpressing *Abcd2* in an ubiquitous manner (17). Overexpression of ALDRP has been demonstrated to prevent VLCFA accumulation and the onset of a neurological phenotype. Therefore, both *ABCD2* and *ABCD3* genes constitute potential therapeutic targets for X-ALD in a strategy aimed at inducing their expression through

* This work was supported by grants from the European Association Against Leukodystrophies (ELA Foundation, Nancy, France) and grants from the regional council of Burgundy.

¹ To whom correspondence should be addressed: LBMN, UMR866 INSERM-Université de Bourgogne, 6 Bd Gabriel, Dijon F-21000, France. Tel.: 33-0-380396273; Fax: 33-0-380396250; E-mail: stsavary@u-bourgogne.fr.

² The abbreviations used are: X-ALD, X-linked adrenoleukodystrophy; ABC, ATP-binding cassette; ALDP, adrenoleukodystrophy protein; ALDRP, adrenoleukodystrophy-related protein; DHA, docosahexaenoic acid; IF, immunofluorescence; PLA, proximity ligation assay; PMP, peroxisomal membrane protein; PUFA, polyunsaturated fatty acids; VLCFA, very-long-chain fatty acids; PC, phosphatidylcholine.

Substrate Specificity of ALDRP

pharmacological treatments. Concerning the substrates, an overlap in the substrate specificity of ALDP, ALDRP, and PMP70 is likely. Nevertheless, lessons from the different knock-out mice models suggest that PMP70 would preferentially be dedicated to the transport of branched-chain fatty acids and bile acid precursors (18), whereas ALDRP would play a role in the catabolism of long-chain saturated and monounsaturated fatty acids and in the synthesis of DHA (C22:6n-3) (19). However, the exact nature of the substrates transported by ALDRP and PMP70, their relationship with ALDP, and their state of dimerization (homo- or heterodimerization) absolutely needs further investigations particularly in situations of induced over-expression, a situation found in pharmacological induction based therapies.

In this study, we focused on the role of ALDRP and its capability to influence the function of ALDP. We used previously described cell models that allow to induce the expression of a wild type or a mutated non-functional ALDRP-EGFP (enhanced green fluorescent protein) fusion protein in a dose-dependent manner (20). These cells are derived from H4IIEC3 hepatoma cells in which ALDRP is almost not expressed in normal conditions, whereas ALDP and PMP70 are highly expressed. We explored the consequences of changes of the ALDRP expression level on fatty acid content in phospholipids (PL) as well as on the levels of β -oxidation of 3 suspected substrates: C26:0, C24:0, and C22:6n-3. We also explored the dimeric status of ALDRP by coimmunoprecipitation and proximity ligation assay.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Cell Culture—H4IIEC3 cells (rat hepatoma cells, ATCC: CRL-1600) were cultured in DMEM/Ham's F-12 (1/1) supplemented with 5% FCS at 37 °C in a humidified atmosphere of 5% CO₂ in the absence of antibiotics. WT (clone 28) and D207H (clone 19) ALDRP-EGFP Tet-on cell clones were established as described previously (20), and cultured in the presence of 200 μ g/ml of G418 (InvivoGen) and 200 μ g/ml of hygromycin B (InvivoGen). Initial cell clones 19 and 28 have been subcloned by limiting dilution in poly-L-lysine-coated 96-well plates in tissue culture medium conditioned by H4IIEC3 cells. Cell clones 19 and 28 were seeded (0.05, 0.5, or 5 cells/well) in 96-well plates in conditioned culture medium supplemented with 200 μ g/ml of G418 and 200 μ g/ml of hygromycin B. The medium was changed weekly. Approximately 3 weeks later, cells from single-colony containing wells were transferred to 24-well plates prior to subsequent analysis. To further select subclones expressing the highest expression levels of WT or D207H Abcd2-EGFP, cells were incubated or not for 24 h with 2 μ g/ml of doxycycline (Clontech). Then, cells were fixed in 1% paraformaldehyde and the level of doxycycline-induced EGFP fluorescence was analyzed by fluorescence-activated cell sorting (FACS) and Western blotting. Finally, subclones 28.38 and 19.55 were selected.

Cell Treatment with Solubilized VLCFA—The desired amounts of C26:0 (Larodan Fine Chemicals AB) and 1,2-dipalmitoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine (PC) (Sigma) dissolved in CHCl₃ were incubated together (1/4, w/w). The solvent was further evaporated under a stream of dry nitro-

gen. The C26:0/PC mixture was hydrated with H₂O and sonicated for 30 min at 4 °C with a sonifier tip (Vibra Cell, Bio-block). The PC vesicles containing C26:0 fatty acid were centrifuged for 5 min at 20,000 \times g and then gently mixed at 37 °C with aqueous bovine serum albumin (BSA, dissolved in 0.9% NaCl) to achieve 2 mol of fatty acid/mol of BSA. 4.3×10^6 cells were seeded in 21.5-cm² culture flasks and cultured in DMEM/Ham's F-12 (1/1) supplemented with 5% FCS, 200 μ g/ml of G418 and hygromycin B for 48 h. Then, cells were washed twice in PBS and deprived of FCS, preincubated for 3 h in the presence or absence of various doses of doxycycline (0.1, 0.5, or 1 μ g/ml) and cultured in the same conditions for the following 15 h in the presence or absence of 25 μ M C26:0 (C26:0/PC mixture). Each point was performed in quadruplicate to allow RT-qPCR, protein (Western blotting and fluorescence microscopy), and lipid analysis.

GC-MS Analysis—After treatment of cell clones with or without doxycycline and or a specific fatty acid, cell nuclei were removed by centrifugation at 1,000 \times g for 10 min at 4 °C. Cellular lipids were extracted with chloroform/methanol (2/1, v/v) according to the method of Folch (35). Dihenarachidoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine (Avanti Polar Lipids) was added as an internal standard. Phospholipids were separated from other lipid classes by HPLC (HP1100, Agilent Technologies) on a 200 \times 2.1-mm, 5- μ m Hypersil Silica column (Thermo) with a binary gradient of chloroform/methanol (8/2, v/v) and chloroform/methanol/H₂O (6/3.4/0.6, v/v/v). Phospholipids containing fractions were collected, evaporated under nitrogen, and hydrolyzed with methanolic potassium hydroxide. Fatty acids were analyzed as pentafluorobenzyl esters by gas chromatography/negative chemical ionization mass spectrometry as previously described (30) using a HP7890A gas chromatograph equipped with an HP7683 injector and a HP5975C mass selective detector (Agilent Technologies). Chromatography was performed using an HP5MS fused silica capillary column (30 m \times 0.25-mm inner diameter, 0.25- μ m film thickness, Agilent Technologies).

Fatty Acid β -Oxidation Assays—H4IIEC3 cell clones were seeded in sterile glass vials at 4×10^5 cells in 3 ml of culture medium supplemented with 200 μ g/ml of G418, 200 μ g/ml of hygromycin B, and 2 μ g/ml of doxycycline or not. After 48 h at 37 °C in a humidified atmosphere of 5% CO₂, the culture medium was removed, cell clones were washed twice with PBS, and β -oxidation analysis was performed, as described previously (21). C26:0, C24:0 and C22:6n-3 were purchased from Larodan Fine Chemicals AB and dissolved in CHCl₃. The solvent was evaporated under a stream of dry nitrogen. Then, VLCFA were incubated with α -cyclodextrin (Sigma) to achieve 85 mol of α -cyclodextrin/mol of C26:0, C24:0, or C22:6n-3. The solubilized VLCFA were sonicated with a sonifier bath for 1 h. The assay was initiated by the addition on the cells of 4 μ M [1-¹⁴C]docosahexaenoic acid (C22:6n-3), [1-¹⁴C]tetracosanoic acid (C24:0), or [1-¹⁴C]hexacosanoic acid (C26:0) with 8 μ M of the corresponding non-radiolabeled fatty acid. Radiolabeled fatty acids were purchased from American Radiolabeled Chemicals. The sum of radioactive [¹⁴C]CO₂ and ¹⁴C-labeled acid-soluble products was taken as a measure of fatty acid oxidation and rates were expressed as picomole/h per mg of pro-

Substrate Specificity of ALDRP

tein. Total proteins were quantified according to the Bradford protein assay (usually between 200 and 300 mg/vial).

Immunofluorescence (IF) and in Situ Proximity Ligation Assay (PLA)—H4IIEC3 cell clones were seeded at 2×10^5 per well in 16-well Lab-Tek chambers slides (Nunc) pre-coated with 0.1 mg/ml of poly-L-lysine. After an attachment period of 24 h, cells were treated or not with doxycycline (2 μ g/ml) and incubated during 48 h at 37 °C. Then, they were washed with PBS, fixed in 4% paraformaldehyde, pH 7.5, for 10 min at RT, rinsed in PBS, and incubated two times in PBS, 0.1 M glycine for 5 min. Cells were permeabilized for 10 min at RT with FACS permeabilizing solution (BD Biosciences), rinsed three times in PBS, 0.05% saponin and incubated during 20 min at RT with PBS, 0.05% saponin, 5% rat serum to saturate Fc receptors.

The following antibodies were used in IF detection or in PLA assay: 1/500 diluted mouse anti-GFP antibody (Roche Applied Science), 1/1,000 diluted rabbit polyclonal anti-ALDP antibody (22), 1/200 diluted rabbit anti-PEX14 (gift from M. Fransen), and 1/100 diluted rabbit polyclonal anti-PMP22. In IF assays, cells were incubated in the presence of primary antibodies in PBS, 0.05% saponin for 20 min, washed 3 times in PBS, 0.05% saponin, incubated 20 min with the 1/1,000 diluted Alexa 594 goat anti-mouse or anti-rabbit secondary antibody (Invitrogen) and finally washed 3 times in PBS before mounting in fluorsave (Merck). In PLA assays, cells were incubated in the presence of a convenient couple of primary antibodies diluted in PBS, 0.05% saponin, 2% rat serum for 20 min at RT. Incubation with appropriate PLA probe (anti-mouse or anti-rabbit antibody), hybridization, amplification, development, and slide preparation were done using the DuoLink kit (Olink Biosciences) following the manufacturer's instructions. Negative control experiments (either one or both primary antibodies were omitted) were performed in parallel and checked to result in the absence of PLA signal.

Finally, the samples were mounted with DuoLink Mounting Medium. IF and PLA slides were analyzed in confocal microscopy using TCS SP2 AOBs confocal laser microscope (Leica Microsystems SA) and a $\times 40$ oil immersion objective. Image processing and analysis were done using the Leica confocal software.

Coimmunoprecipitation Assays and Western Blotting—H4IIEC3 cells stably expressing D207H-ALDRP-EGFP after overnight induction with 2 μ g/ml of doxycycline or not were homogenized in solubilization buffer (100 mM Tris-HCl, pH 8, 100 mM NaCl, 10 mM EDTA, 1% Triton X-100, 1% PMSF and protease inhibitor mixtures (Roche Applied Science)). Nuclei were removed by centrifugation for 10 min at 4 °C and $1,000 \times g$. The cell lysate was incubated twice with agarose beads for 1 h at 4 °C with gentle rotation. After this pre-clearing step, lysate was incubated with rabbit polyclonal anti-ALDP antibody (22) cross-linked to agarose beads via dimethyl pimelimidate (protocol adapted from Ref. 23) or mouse monoclonal anti-GFP antibody covalently immobilized on agarose beads (MBL) for 1 h at 4 °C with gentle rotation. The beads were washed three times with wash buffer (100 mM Tris-HCl, pH 8, 100 mM NaCl, 10 mM EDTA, and 1% Triton X-100), and bound proteins were released with Laemmli buffer. Immunoprecipitated proteins or proteins from total cell lysate were separated on a 7.5% SDS-PAGE and transferred onto a PVDF membrane. The membrane

was first incubated in 5% skimmed milk dissolved in PBS, 0.1% Tween 20 (PBS/T) for 1 h at room temperature. The membrane was probed with 1/500 diluted mouse anti-GFP antibody (Roche Applied Science) or with rabbit polyclonal anti-ALDP (1/5,000) antibody (22) and then with the appropriate secondary antibody coupled to horseradish peroxidase (1/5,000 Santa Cruz Biotechnology), before being revealed by ECL (Santa Cruz Biotechnology).

RT-qPCR—Total RNA was extracted using RNeasy Mini kit (Qiagen) following the manufacturer's instructions. cDNA was generated using Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase enzyme (Promega). Quantification of cDNA expression was carried out using the SYBR Green real time PCR technology and an iCycler iQ Real Time Detection System (Bio-Rad) as previously described (24). The primers 5'-GGCATCACCACTAAATCTCC-3' (rat *36b4* forward), 5'-GCTCCACC-TTGTCTCCA-3' (rat *36b4* reverse), 5'-CAGCGTCCACTTACCACATAG-3' (rat *Abcd2* forward), and 5'-CGTC-CAGCAATGCGTACTTCG-3' (rat *Abcd2* reverse) were chosen using the Beacon Designer Software (Bio-Rad). Quantitative analysis of *Abcd2* expression was performed using cycle to threshold (C_t) values and normalized by the *36b4* reference gene encoding for the acidic ribosomal phosphoprotein P0.

Statistical Analyses—Statistical analyses were performed by Mann-Whitney test using the StatView statistical software. The differences between the treated and the control groups are indicated as significant ($p < 0.05$) or highly significant ($p < 0.01$).

RESULTS

Induction Level of ALDRP-EGFP Fusion Protein in the Cell Clones—To gain insight into the function of ALDRP, we used specific cell models specifically engineered to express a mutant (clone 19) or a wild type (clone 28) ALDRP-EGFP fusion protein depending on the dose of doxycycline added in the culture medium. The WT ALDRP-EGFP fusion protein was proven to be functional, at least concerning the capability to restore the β -oxidation of C26:0 in X-ALD fibroblasts (20). The mutant ALDRP-EGFP corresponds to a single change of the amino acid sequence (D207H) mimicking a natural mutation occurring in the *ABCD1* gene (D196H ALDP), which results in a non-functional protein still able to dimerize and to be targeted at the peroxisomal membrane (25).

As seen at the mRNA level quantified by RT-qPCR (Fig. 1A) and at the protein level observed by Western blotting (Fig. 1B), both cell clones respond to doxycycline treatment (18 h) in a dose-dependent manner. It is noteworthy that treatment with doxycycline results in the induction of *Abcd2-EGFP* and does not modify ALDP or PMP70 expression in clones 28 (Fig. 1C) and 19 (data not shown). Although the basal level of the fusion protein is quasi null in clone 19 (not different from H4IIEC3 control cells), a leaky expression of ALDRP-EGFP was observed in clone 28. Therefore, the relative induction appears to be stronger in clone 19 than in clone 28.

Inverse Correlation between the Level of Expression of the WT ALDRP-EGFP Fusion Protein and Saturated VLCFA Content in Phospholipids—Changes in lipid composition and fatty acid metabolism have been largely described in

Substrate Specificity of ALDRP

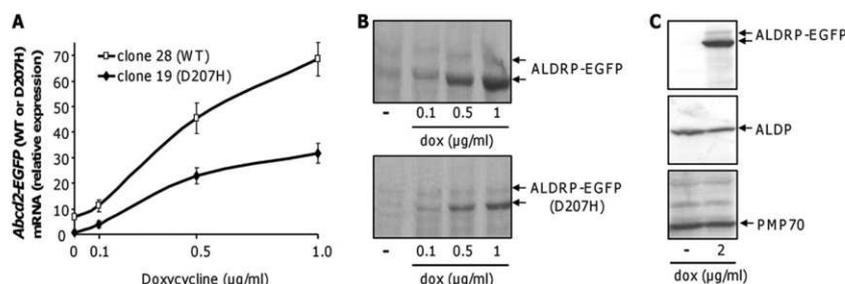


FIGURE 1. Doxycycline-dependent expression of the WT or D207H *Abcd2*-EGFP gene in stable transfectant cell clones 28 and 19, respectively. Cell clones were cultivated 18 h in the presence of various doses of doxycycline. Expression was quantified at the mRNA level by RT-qPCR (A) and at the protein level by Western blotting analysis with anti-GFP antibody (B). ALDRP-EGFP expression does not modify ALDP nor PMP70 expression (C). Clone 28 cell lysates were separated on 7.5% SDS gels, blotted, and probed with anti-GFP, anti-ALDP, or anti-PMP70 antibodies.

several models of peroxisomal alterations, in particular in ALDP-deficient cells. These modifications are perfectly visible in PL.

Peroxisomes, but especially mitochondria, participate in degradation of fatty acids. Therefore, the consequences of the alterations of peroxisomal import, if any, were expected to be underestimated for most of the fatty acids with the exception of VLCFA, which are β -oxidized only into the peroxisome. Moreover, because the alteration of ALDRP (WT or D207H) expression was unlikely to result in strong modifications in normal conditions (ALDP and PMP70 are quite well expressed in H4IEC3 cells), we challenged the cells with C26:0, the supposed preferential substrate of ALDP, and compared the different situations. Fatty acid supplementation of hepatoma cells have been demonstrated to result in rapid modification of the membrane content (26). The kinetic of such a supplementation being compatible with the kinetic of doxycycline-dependent induction, we decided to analyze the fatty acid content in PL after an 18-h incubation with doxycycline and in the presence or not of C26:0 for 15 h. It is important to notice that the ALDRP-EGFP expression level was not modified by fatty acid supplementation.

GC-MS analysis of the fatty acid content in PL was performed in triplicate from 5 independent experiments. We first quantified saturated fatty acids (C18:0, C20:0, C22:0, C24:0, and C26:0). We observed a dose-dependent decrease of the relative level of C26:0 (reaching a maximum of 0.79-fold) and C24:0 (maximum of 0.78-fold) in clone 28 (Fig. 2). A clear inverse correlation was thus observed between the level of expression of the WT ALDRP-EGFP protein and the saturated VLCFA content in PL. No significant variation was seen for shorter fatty acids, C18:0-C22:0 (Fig. 2). Incubation of the cells with C26:0 resulted in a 1.66-fold increase of the C26:0 content in PL but no significant changes for the other fatty acids. In the presence of C26:0, a significant doxycycline-dependent decrease was observed only for the C26:0 and C24:0 levels (Fig. 2).

Transdominant Negative Effect of D207H-ALDRP-EGFP—Parallel experiments were conducted with cell clone 19 expressing the mutant non-functional D207H-ALDRP-EGFP protein. As shown in Fig. 2, no significant variation was observed for C24:0, C20:0, and C18:0. However, whereas induction of ALDRP-EGFP in clone 28 resulted in a decreased content of C26:0 and C24:0, doxycycline-dependent induction of D207H-ALDRP-EGFP resulted in a dose-dependent increase

of the level of C26:0 (Fig. 2). Because the basal level of expression of the endogenous ALDRP in cell clones is quasi null, this result may be the consequence of a transdominant-negative effect of D207H-ALDRP-EGFP on ALDP function.

D207H-ALDRP-EGFP Interacts with ALDP—To evidence the interaction between D207H-ALDRP-EGFP and ALDP, we used two complementary approaches. First, we used a proximity ligation assay (PLA duolink) to analyze *in situ* the proximity of D207H-ALDRP-EGFP with ALDP. The technique is based on the use of primary antibodies obtained in different species. Secondary antibodies targeting either rabbit or mouse antibodies are coupled to oligonucleotides, which serve as proximity probes. If the distance between the proteins is less than 40 nm, probes can hybridize with subsequently added connector oligonucleotides and guide the formation of a circular DNA template, which is amplified and detected by fluorescence hybridization. This technique was successfully used to detect the dimerization of receptor tyrosine kinase (27). As a first step, we validated the primary antibodies used in the PLA experiment. For each antibody, a peroxisomal punctuate labeling colocalizing with the EGFP signal was obtained from immunofluorescence experiments performed on clone 19 cultivated in the presence of doxycycline (Fig. 3A). PLA experiments resulted in a positive labeling only in the presence of doxycycline and with the couple of antibodies directed against ALDP and GFP (Fig. 3B) demonstrating the proximity between ALDP and D207H-ALDRP-EGFP. This labeling does not result from the overabundance of proteins in a membrane context because no PLA labeling was obtained between D207H-ALDRP-EGFP and proteins PEX14 or PMP22, PMP22 being the most represented protein of the peroxisomal membrane (28).

To confirm that proximity between D207H-ALDRP-EGFP and ALDP is due to a physical interaction, cross-coimmunoprecipitation experiments were carried out from cell lysates obtained from clone 19 cultivated in the presence of doxycycline. As shown in Fig. 4A, D207H-ALDRP-EGFP was coimmunoprecipitated with ALDP by anti-ALDP antibody only in the doxycycline-treated cell clone 19. In the cross-experiment, ALDP was coimmunoprecipitated with D207H-ALDRP-EGFP by anti-GFP antibody only in doxycycline-treated cell clone 19 (Fig. 4B) demonstrating interaction. Similar results were obtained with the WT ALDRP-EGFP fusion protein and ALDP,

Substrate Specificity of ALDRP

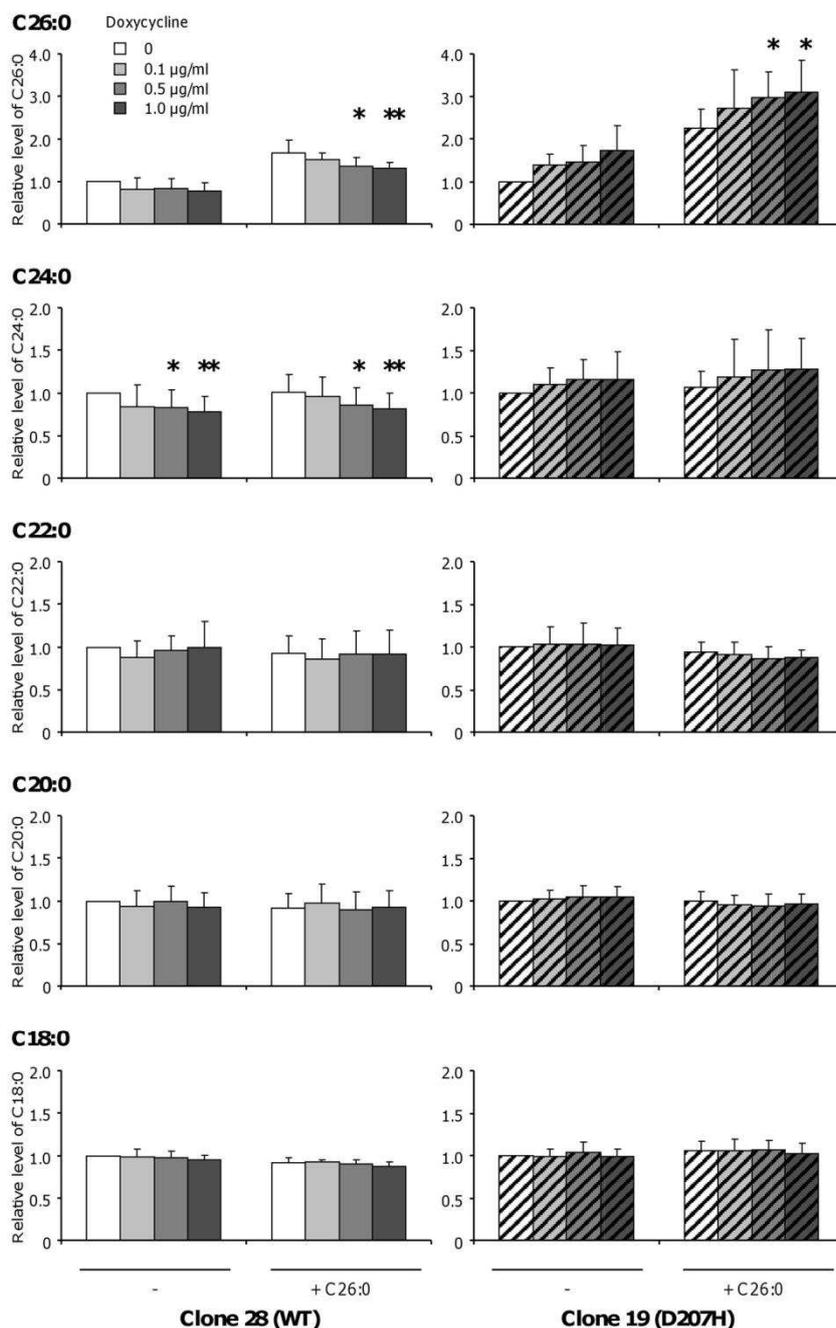


FIGURE 2. GC-MS analysis of the saturated fatty acid content in phospholipids of cell clones 28 (WT ALDRP-EGFP) and 19 (D207H-ALDRP-EGFP) cultivated in the presence of various doses of doxycycline and in the absence or presence of C26:0. Results of 5 independent experiments performed in triplicate are presented normalized to the percentage of fatty acid in the absence of doxycycline and C26:0 arbitrary taken equal to 1. Statistically significant variations are indicated by asterisks (*, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$).

indicating that interaction can occur independently of the mutation.³

Inverse Correlation between the Level of Expression of the ALDRP-EGFP Fusion Protein and n-9 VLCFA Content in Phospholipids—By GC-MS analysis, we further explored the fatty acid content in PL for *n*-7 and *n*-9 monounsaturated fatty

acids (18:1, 20:1, 22:1, 24:1, and 26:1) and polyunsaturated fatty acids (PUFA: C18:3, C20:3, C20:4, C20:5, C22:5, C22:6, and C24:6*n*-3; and C18:2, C18:3, C20:3, C20:4, C22:4, and C22:5*n*-6). Although we did not notice any change in the PUFA content nor in the *n*-7 monounsaturated fatty acid content whatever the conditions and the cell clones, the *n*-9 monounsaturated fatty acid content demonstrated alteration depending on the expression level of WT or D207H-ALDRP-EGFP protein (Fig. 5).

³ F. Geillon, D. Trompier, C. Gondcaille, and S. Savary, manuscript in preparation.

Substrate Specificity of ALDRP

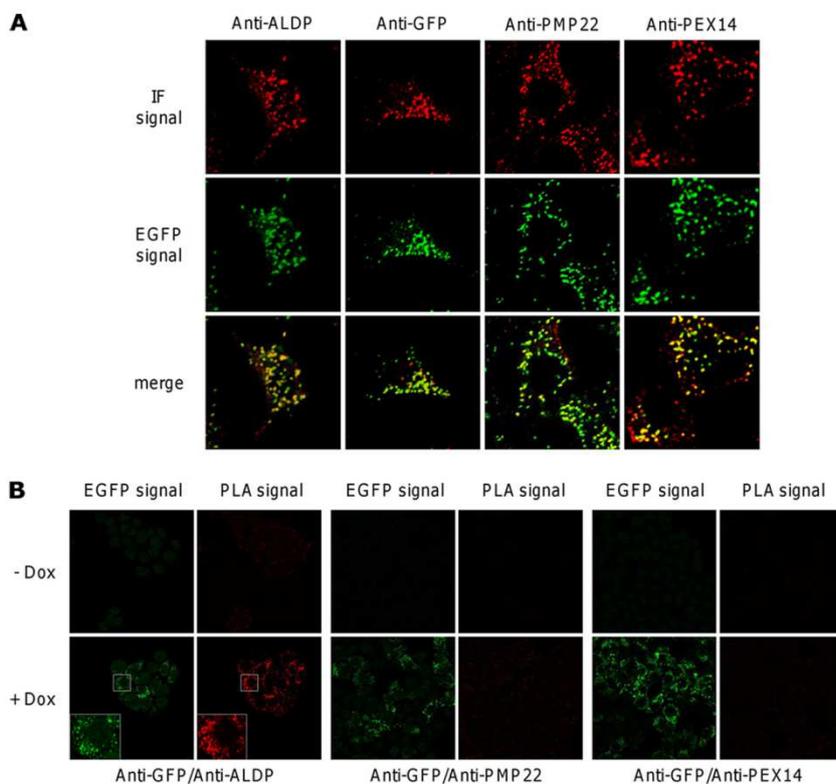


FIGURE 3. *In situ* analysis of the proximity of ALDRP-EGFP with other peroxisomal proteins. A, immunofluorescence detection (IF signal) of D207H-ALDRP-EGFP, ALDP, PEX14, and PMP22 observed by confocal microscopy in clone 19 (D207H-ALDRP-EGFP) induced by doxycycline (DOX) (2 μ g/ml for 48 h). B, Duolink proximity ligation assay between D207H-ALDRP-EGFP and ALDP, PEX14, and PMP22 in clone 19 induced by doxycycline observed by confocal microscopy.

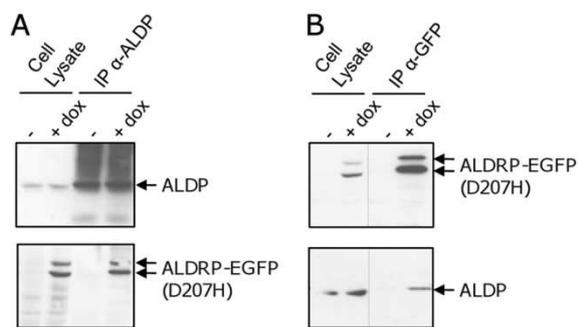


FIGURE 4. Coimmunoprecipitation of ALDP and D207H-ALDRP-EGFP demonstrating interaction. Cell lysates from cell clone 19 (D207H-ALDRP-EGFP) treated or not with doxycycline (dox) (2 μ g/ml) for 18 h were used for anti-ALDP (A) or anti-GFP (B) immunoprecipitation. Aliquots of cell lysates and eluted fractions were separated on 7.5% SDS gels, blotted, and probed with anti-ALDP or anti-GFP antibodies.

Incubation in the presence or absence of C26:0 yielded quite similar results (Fig. 5). C26:1*n*-9 levels followed the same pattern as saturated VLCFA. In the WT cell clone, we observed a significant doxycycline-dependent decrease of the C26:1*n*-9 content either in the absence or presence of C26:0 in the culture medium (Fig. 5). On the contrary, doxycycline-dependent induction of D207H-ALDRP-EGFP resulted in a dose-dependent increase of the level of C26:1*n*-9, although non-statistically significant. Thus, a transdominant-negative effect seems to be observed for C26:1. Interestingly, induction of ALDRP-EGFP resulted in a decreased content of C24:1*n*-9 but we did not

observe a transdominant-negative effect for this fatty acid in clone 19 (Fig. 5). No significant variation was observed for the shorter fatty acids analyzed (C18:1, C20:1, and C22:1*n*-9) (Fig. 5).

Induction of ALDRP-EGFP Expression Leads to Increased β -Oxidation Levels of C26:0, C24:0, and C22:6*n*-3—As induction of ALDRP-EGFP expression influence the cellular VLCFA content, we analyzed the β -oxidation level of commercially available ¹⁴C-labeled fatty acids: C26:0, C24:0, and C22:6*n*-3. Due to a relatively long delay between the first GC-MS analyses and these experiments of β -oxidation measurement, experiments were carried out in subclones of clones 19 and 28, respectively, clones 19.55 and 28.38. Indeed, the original clones demonstrated a progressive tendency to gene inactivation and subcloning by limited dilution was necessary. The obtained subclones displayed similar levels of induction as checked by flow cytometry and Western blotting. The β -oxidation levels in both cell clones were compared in the absence or presence of 2 μ g/ml of doxycycline. As shown in Fig. 6, doxycycline treatment of clone 28.38 resulted in a significant increase of the β -oxidation level of the 3 tested fatty acids. Concerning saturated VLCFA, this result was in agreement with results as mentioned before (Fig. 2) suggesting that induction of ALDRP-EGFP improves the peroxisomal entry of these fatty acids into the peroxisome, and therefore, leads to a decreased level of their contents in PL. However, the increased level of β -oxidation of DHA was unexpected because the levels of PUFA in PL appeared to be insensitive to the level of expression of ALDRP-

Substrate Specificity of ALDRP

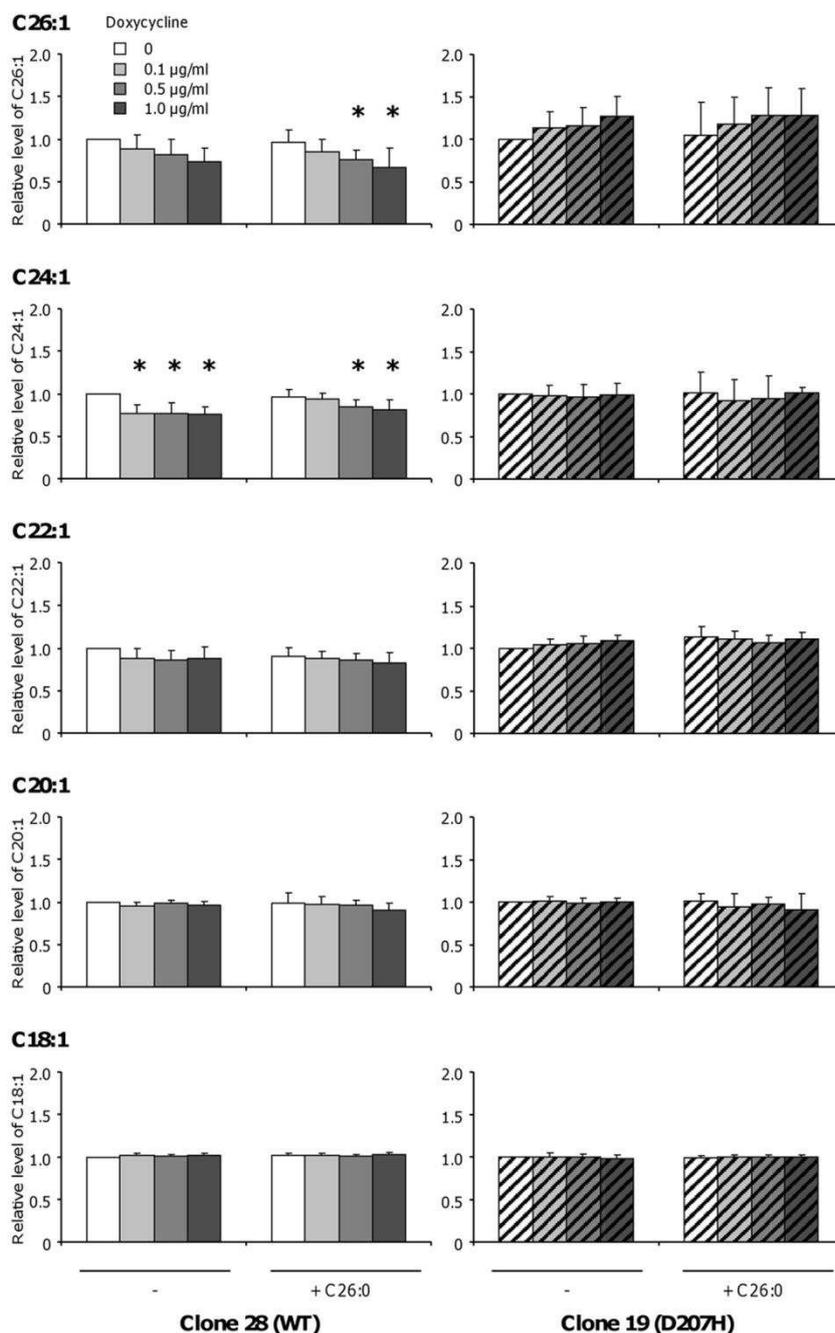


FIGURE 5. GC-MS analysis of the *n*-9 monounsaturated fatty acid content in phospholipids of cell clones 28 (WT ALDRP-EGFP) and 19 (D207H-ALDRP-EGFP) cultivated in the presence of various doses of doxycycline and in the absence or presence of C26:0. Results of 5 independent experiments performed in triplicate are presented normalized to the percentage of fatty acid in the absence of doxycycline and C26:0 arbitrary taken equal to 1. Statistically significant variations are indicated by asterisks (*, *p* < 0.05).

EGFP. Induction of D207H-ALDRP-EGFP resulted in a weak but significant decrease of the β -oxidation level of C26:0. However, we did not observe any influence on the C24:0 and C22:6 *n*-3 β -oxidation levels.

DISCUSSION

Pharmacological induction of *ABCD2* could represent an alternative therapeutic strategy for X-ALD patients. To develop

such a therapeutic approach, it is crucial to understand the exact function of ALDRP in normal or overexpressed conditions and compare its function to that of ALDP.

Although a defective transport is thought to trigger fatty acid accumulation, expression of ALDP or ALDRP in X-ALD fibroblasts restores the transport and then the degradation of the fatty acids accumulated (15, 16). The modified H4IEC3 cell clones cultivated in the absence or presence of increasing doses

Substrate Specificity of ALDRP

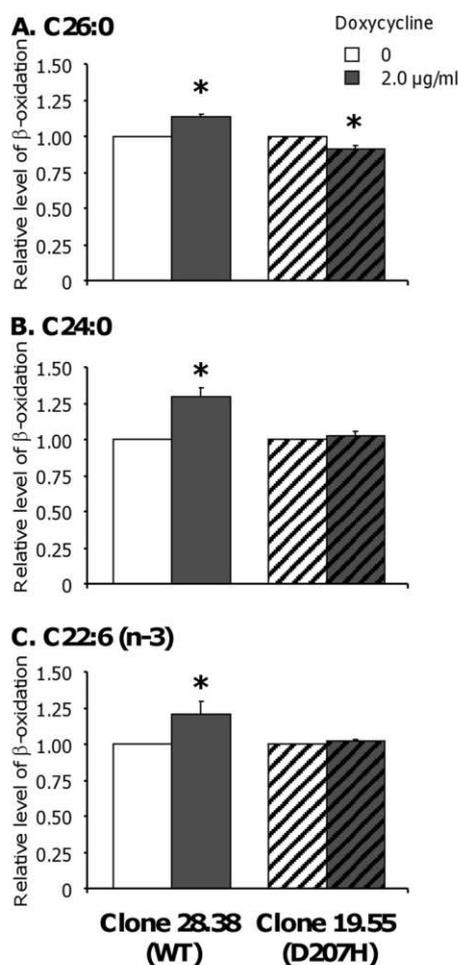


FIGURE 6. β -Oxidation levels of ^{14}C -C26:0 (A), C24:0 (B), and C22:6n-3 (C) in clones 28.38 (WT ALDRP-EGFP) and 19.55 (D207H-ALDRP-EGFP) cultivated in the absence or presence of doxycycline (2 $\mu\text{g}/\text{ml}$). Results of 3 independent experiments performed in quadruplicate are presented normalized to the result obtained in the absence of doxycycline taken equal to 1. Statistically significant variations are indicated by asterisks (*, $p < 0.05$).

of doxycycline were expected to represent different situations in which the entry of specific substrates into the peroxisome is altered. The induction of the WT ALDRP-EGFP protein was expected to boost the entry of some fatty acids and their subsequent degradation and then trigger a decrease in the membrane content for these substrates. On the contrary, induction of the D207H-ALDRP-EGFP protein was expected not to modify the fatty acid content of PL and serve as a control.

β -Oxidation levels of ^{14}C -labeled C26:0 and C24:0 were found increased in doxycycline-treated cells expressing the WT ALDRP-EGFP fusion protein. Moreover, we found an inverse correlation between the expression level of ALDRP-EGFP and the fatty acid content in PL of VLCFA (C26:0, C24:0, C26:1, and C24:1). These findings are consistent with the observed accumulation of C26:0 and C24:0 in tissues rich in ALDRP in *Abcd2* null mice (19, 29). Altogether, these results suggest a role of ALDRP in the transport of these fatty acids and are in agreement with the recognized partial functional redundancy between ALDP and ALDRP toward these substrates.

ALDRP has been suggested to play a role in the transport of other saturated and monounsaturated fatty acids such as C20:0, C22:0, and C22:1 (19). The putative role of ALDRP toward these fatty acids has been suggested from the observed accumulation of such fatty acids in specific tissues (adrenals and sciatic nerve) of *Abcd2* null mice (19). In our experiments, we could not evidence any changes in the content of these fatty acids. This apparent contradiction could be explained by the short time window (18 h) and by the fact that the doxycycline-dependent variations of ALDRP-EGFP expression are probably not sufficient to drastically change the overall catabolism of these fatty acids. Indeed, LCFA are known to be mainly oxidized in mitochondria. Moreover, our experiments were performed in hepatoma cell models. In the liver of *Abcd2* null mice, a modification of the level of these fatty acids was observed only after a 12-month specific diet (19). Altogether, our results do not evidence a role of ALDRP in the transport of saturated and monounsaturated LCFA but do not exclude such a role.

Concerning PUFA, the analysis of the *n*-3 and *n*-6 PUFA content in PL did not show any variation depending on the expression level of ALDRP-EGFP. However, β -oxidation assays with radiolabeled DHA showed that ALDRP is involved in the transport of DHA. Induction of ALDRP-EGFP resulted in a significant increase of the β -oxidation level of DHA. PUFA content in cells is highly regulated and depends on complex metabolic pathways. Its synthesis from C18:3*n*-3 requires elongation/desaturation steps and one final cycle of peroxisomal β -oxidation, which forms DHA from its immediate precursor C24:6*n*-3 (30, 31). DHA is also β -oxidized in the peroxisome. Although ALDP is clearly not involved in DHA metabolism because there is no deficiency in DHA in X-ALD patients, ALDRP-EGFP could participate in the entry of DHA. This would fit with the fact that the hepatic expression of ALDRP is highly sensitive toward dietary PUFA (32). Moreover ALDRP was recently suspected to participate in the entry of C24:6*n*-3 (the immediate precursor of DHA) into the peroxisome as suggested from *Abcd2* null mice (19). This dual involvement of ALDRP in the synthesis and degradation of DHA would explain in part the apparent discrepancy between the results from β -oxidation assays and GC-MS analysis in PL. Further explorations of the role of ALDRP in *n*-3 and *n*-6 PUFA metabolism are required but depend on the availability of radiolabeled fatty acids.

The cell clone expressing a mutated ALDRP-EGFP fusion protein was first used to validate the results obtained with the cell clone expressing the WT ALDRP-EGFP fusion protein. The direct correlation between the level of C26:0 and C26:1 in PL and the expression level of the D207H-ALDRP-EGFP fusion protein demonstrated a transdominant-negative effect of the mutant protein. This effect was also found in β -oxidation assays as a decreased β -oxidation activity of C26:0 was observed upon induction of D207H-ALDRP-EGFP. Duolink and coimmunoprecipitation experiments have evidenced interactions between D207H-ALDRP-EGFP and ALDP. The formation of a non-functional heterodimer D207H-ALDRP-EGFP/ALDP would deprive the cell of functional ALDP/ALDP homodimers and then result in the accumulation of C26:0 and C26:1 mimicking a deficiency on ALDP. Surprisingly, we did not observe

such a transdominant-negative effect on the ALDP function toward C24:0. The deprivation in functional ALDP/ALDP homodimers is maybe insufficient to see an accumulation in our cell model concerning this fatty acid. There are currently no clear data about differences in affinity toward C24:0 and C26:0 and/or transport efficiency, which could help to clarify this point. Altogether, we can conclude that D207H-ALDRP-EGFP has a transdominant-negative effect on ALDP function. This is the first demonstration that heterodimerization of peroxisomal half-transporters has functional consequences.

This transdominant-negative effect raises several points. The first one concerns therapeutic approaches aimed at overexpressing the *ABCD2* gene to compensate for ALDP deficiency. In the absence of the ALDP protein, this strategy remains pertinent. However, in patients in whom a non-functional ALDP is still present and capable to dimerize, pharmacological induction of the ALDRP expression would possibly result in the formation of a majority of non-functional heterodimers. Because a transdominant-negative effect of a mutated ALDP on ALDP function has already been demonstrated (25), one can speculate if restoring expression of ALDP in patients expressing a non-functional ALDP protein still able to dimerize would allow compensation for ALDP deficiency. Indeed, the successful results of gene therapy were recently obtained concerned two patients having an *ABCD1* gene mutation resulting in the absence of ALDP (33). A second point concerns the clear demonstration of the existence of heterodimers and their apparent specificity toward fatty acids substrates. Although the induction of the WT ALDRP-EGFP protein increases the β -oxidation of C26:0, C24:0, and C22:6n-3, and results in a decreased content of C26:0, C24:0, C26:1, and C24:1 in PL, the induction of the mutant ALDRP-EGFP protein has consequences only for C26:0 and C26:1. This would mean that ALDRP/ALDP heterodimers present a preferential substrate specificity toward C26:0 and C26:1, which would be different and more restricted than that of ALDP/ALDP or ALDRP/ALDRP homodimers. ALDP/ALDP homodimers would be dedicated to the transport of saturated and monounsaturated VLCFA (C26:0, C24:0, C26:1, and C24:1). ALDRP/ALDRP homodimers would be able to transport the same fatty acyl-CoA and be specifically dedicated to the transport of PUFA. During submission of this manuscript, functional complementation experiments in the yeast *pxa1/pxa2Δ* mutant with either *ABCD1* or *ABCD2* human genes were published (34). The main conclusions of this study conducted with a different experimental approach are in agreement with our conclusions. They confirmed the substrate specificity overlap between ALDP and ALDRP and demonstrated a preference of ALDP for saturated VLCFA (C24:0 and C26:0) and a preference of ALDRP for C22:0 and n-3 PUFA. In agreement with our results, a specific role of ALDRP in C22:6 β -oxidation was evidenced.

Even if our results together with lessons from *Abcd1* and *Abcd2* null mice are in agreement with the different hypotheses concerning the substrate specificity of homo- and heterodimers, such a model of transport remains speculative. Further studies will be needed to clarify the role of each dimer and see if alternative dimerization depends only on relative stoichiometry or is driven by the substrates.

Substrate Specificity of ALDRP

Acknowledgments—We thank M. Fransen and P. Aubourg for the gifts of anti-PEX14 and anti-ALDP antibodies, respectively. We are grateful to C. Arnould (CMAB Dijon) and D. Rageot (platform of lipid analysis, IFR100 Dijon) for technical assistance in confocal microscopy and lipid analysis, respectively.

REFERENCES

- Berger, J., and Gärtner, J. (2006) *Biochim. Biophys. Acta* **1763**, 1721–1732
- Mosser, J., Douar, A. M., Sarde, C. O., Kioschis, P., Feil, R., Moser, H., Poustka, A. M., Mandel, J. L., and Aubourg, P. (1993) *Nature* **361**, 726–730
- van Roermund, C. W., Visser, W. F., Ijlst, L., van Cruchten, A., Boek, M., Kulik, W., Waterham, H. R., and Wanders, R. J. (2008) *EASEB J.* **22**, 4201–4208
- Guimarães, C. P., Domingues, P., Aubourg, P., Fouquet, F., Pujol, A., Jimenez-Sanchez, G., Sá-Miranda, C., and Azevedo, J. E. (2004) *Biochim. Biophys. Acta* **1689**, 235–243
- Lombard-Platet, G., Savary, S., Sarde, C. O., Mandel, J. L., and Chimini, G. (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **93**, 1265–1269
- Kamijo, K., Taketani, S., Yokota, S., Osumi, T., and Hashimoto, T. (1990) *J. Biol. Chem.* **265**, 4534–4540
- Holzinger, A., Kammerer, S., Berger, J., and Roscher, A. A. (1997) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **239**, 261–264
- Shani, N., Jimenez-Sanchez, G., Steel, G., Dean, M., and Valle, D. (1997) *Hum. Mol. Genet.* **6**, 1925–1931
- Troffer-Charlier, N., Doerflinger, N., Metzger, E., Fouquet, F., Mandel, J. L., and Aubourg, P. (1998) *Eur. J. Cell Biol.* **75**, 254–264
- Berger, J., Albet, S., Bentejac, M., Netik, A., Holzinger, A., Roscher, A. A., Bugaut, M., and Forss-Petter, S. (1999) *Eur. J. Biochem.* **265**, 719–727
- Hillebrand, M., Verrier, S. E., Ohlenbusch, A., Schäfer, A., Söling, H. D., Wouters, F. S., and Gärtner, J. (2007) *J. Biol. Chem.* **282**, 26997–27005
- Liu, L. X., Janvier, K., Berteaux-Lecellier, V., Cartier, N., Benarous, R., and Aubourg, P. (1999) *J. Biol. Chem.* **274**, 32738–32743
- Kashiwayama, Y., Seki, M., Yasui, A., Murasaki, Y., Morita, M., Yamashita, Y., Sakaguchi, M., Tanaka, Y., and Imanaka, T. (2009) *Exp. Cell Res.* **315**, 190–205
- Ewart, G. D., Cannell, D., Cox, G. B., and Howells, A. J. (1994) *J. Biol. Chem.* **269**, 10370–10377
- Netik, A., Forss-Petter, S., Holzinger, A., Molzer, B., Unterrainer, G., and Berger, J. (1999) *Hum. Mol. Genet.* **8**, 907–913
- Flavigny, E., Sanhaj, A., Aubourg, P., and Cartier, N. (1999) *FEBS Lett.* **448**, 261–264
- Pujol, A., Ferrer, I., Camps, C., Metzger, E., Hindelang, C., Callizot, N., Ruiz, M., Pàmols, T., Giròs, M., and Mandel, J. L. (2004) *Hum. Mol. Genet.* **13**, 2997–3006
- Visser, W. F., van Roermund, C. W., Ijlst, L., Waterham, H. R., and Wanders, R. J. (2007) *Biochem. J.* **401**, 365–375
- Fourcade, S., Ruiz, M., Camps, C., Schlüter, A., Houten, S. M., Mooyer, P. A., Pàmols, T., Dacremont, G., Wanders, R. J., Giròs, M., and Pujol, A. (2009) *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **296**, E211–E221
- Gueugnon, F., Volodina, N., Taouil, J. E., Lopez, T. E., Gondcaille, C., Grand, A. S., Mooijer, P. A., Kemp, S., Wanders, R. J., and Savary, S. (2006) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **341**, 150–157
- Wanders, R. J., Denis, S., Ruiter, J. P., Schutgens, R. B., van Roermund, C. W., and Jacobs, B. S. (1995) *J. Inher. Metab. Dis.* **18**, Suppl. 1, 113–124
- Fouquet, F., Zhou, J. M., Ralston, E., Murray, K., Troalen, F., Magal, E., Robain, O., Dubois-Dalcq, M., and Aubourg, P. (1997) *Neurobiol. Dis.* **3**, 271–285
- Bons, J. A., Michielsen, E. C., de Boer, D., Bouwman, F. G., Jaeken, J., van Diejen-Visser, M. P., Rubio-Gozalbo, M. E., and Wodzig, W. K. (2008) *Clin. Chim. Acta* **387**, 59–65
- Genin, E. C., Gondcaille, C., Trompier, D., and Savary, S. (2009) *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **116**, 37–43
- Unterrainer, G., Molzer, B., Forss-Petter, S., and Berger, J. (2000) *Hum. Mol. Genet.* **9**, 2609–2616

Substrate Specificity of ALDRP

26. Araseki, M., Kobayashi, H., Hosokawa, M., and Miyashita, K. (2005) *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **69**, 483–490
27. Gajadhar, A., and Guha, A. (2010) *BioTechniques* **48**, 145–152
28. Hashimoto, T., Kuwabara, T., Usuda, N., and Nagata, T. (1986) *J. Biochem.* **100**, 301–310
29. Ferrer, I., Kapfhammer, J. P., Hindelang, C., Kemp, S., Troffer-Charlier, N., Broccoli, V., Callyzot, N., Mooyer, P., Selhorst, J., Vreken, P., Wanders, R. J., Mandel, J. L., and Pujol, A. (2005) *Hum. Mol. Genet.* **14**, 3565–3577
30. Ferdinandusse, S., Denis, S., Dacremont, G., and Wanders, R. J. (2003) *J. Lipid Res.* **44**, 1992–1997
31. Ferdinandusse, S., Denis, S., Mooijer, P. A., Zhang, Z., Reddy, J. K., Spector, A. A., and Wanders, R. J. (2001) *J. Lipid Res.* **42**, 1987–1995
32. Leclercq, S., Skrzypski, J., Courvoisier, A., Gondcaille, C., Bonnetain, F., André, A., Chardigny, J. M., Bellenger, S., Bellenger, J., Narce, M., and Savary, S. (2008) *Biochimie* **90**, 1602–1607
33. Cartier, N., Hacein-Bey-Abina, S., Bartholomae, C. C., Veres, G., Schmidt, M., Kutschera, I., Vidaud, M., Abel, U., Dal-Cortivo, L., Caccavelli, L., Mahlaoui, N., Kiermer, V., Mittelstaedt, D., Bellesme, C., Lahlou, N., Le-frère, F., Blanche, S., Audit, M., Payen, E., Leboulch, P., l'Homme, B., Bougnères, P., Von Kalle, C., Fischer, A., Cavazzana-Calvo, M., and Aubourg, P. (2009) *Science* **326**, 818–823
34. van Roermund, C. W., Visser, W. F., Ijlst, L., Waterham, H. R., and Wanders, R. J. (2010) *Biochim. Biophys. Acta Mol. Cell Biol. Lipids* **1811**, 148–152
35. Folch, J., Lees, M., and Sloane-Stanley, G. (1957) *J. Biol. Chem.* **226**, 497–509

**CHAPITRE 3 : LIEN ENTRE
AGENCEMENT DIMERIQUE ET
FONCTION DES
TRANSPORTEURS ABCD
PEROXYSSOMIAUX**

Lors de ma thèse, j'ai travaillé sur la caractérisation fonctionnelle d'ABCD2 et plus généralement des transporteurs ABCD peroxysomaux, en étudiant le lien entre l'agencement dimérique et la fonction de ces transporteurs. L'objectif de ce travail était de déterminer quels substrats sont pris en charge et par quels dimères. L'originalité du projet reposait sur l'utilisation de constructions plasmidiques codant pour des dimères chimériques de demi-transporteurs ABCD peroxysomaux. Un transporteur chimérique entier correspond donc à l'enchaînement covalent de 2 demi-transporteurs (ABCD2-ABCD1, ABCD2-ABCD2, ABCD1-ABCD1...), liés via 3 acides aminés (alanine) (Figure 31).

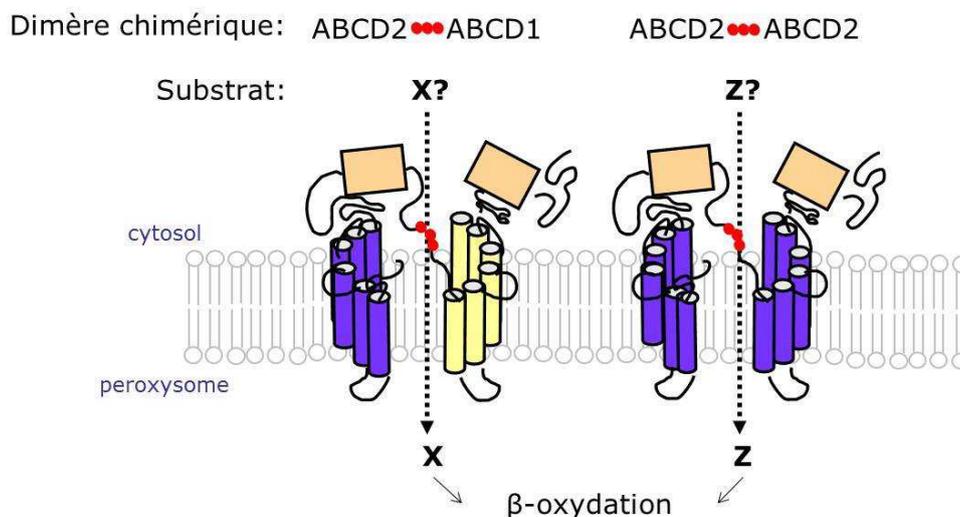


Figure 31 : Transporteurs chimériques entiers à la membrane peroxysomale.

Deux demi-transporteurs ABC peroxysomaux sont liés de manière covalente via 3 résidus alanine (représentés en rouge sur la figure). Sur le modèle des demi-transporteurs ABC White, Brown et Scarlett présents chez la *Drosophile*, les transporteurs ABC peroxysomaux pourraient alternativement s'homo- et s'hétéro-dimériser et ainsi permettre l'importation de différents substrats selon les dimères formés. Ainsi, en présence d'un transporteur chimérique à la membrane du peroxysome, le substrat (X ou Z...) serait transporté, et un test de β -oxydation nous permettra indirectement de définir le type de substrat qui a été pris en charge par le transporteur chimérique.

Les protéines chimériques avaient déjà été expérimentées avec l'homodimérisation forcée d'ABCG2, un demi-transporteur ABC impliqué notamment dans la résistance multiple aux drogues. D'après les travaux publiés en 2005 (Bhatia *et al.* 2005), la fusion directe de deux séquences d'ADNc d'ABCG2 au sein d'une même séquence nucléotidique, n'entrave ni la formation du dimère chimérique produit, ni son adressage membranaire, ni sa fonctionnalité. Le dimère chimérique ABCG2-ABCG2 ainsi obtenu est donc supposé avoir une conformation correcte. De plus, l'ajout d'une séquence de liaison (« linker region » correspondant à la séquence ⁶³³aa-aa⁶⁸⁹ retrouvée dans le transporteur entier ABCB1, entre le NBD1 et le TMD2)

entre les deux demi-transporteurs n'a pas été nécessaire pour obtenir un dimère chimérique ABCG2-ABCG2 fonctionnel.

C'est en se basant sur ces observations que le projet a été lancé. Etant donné que l'insertion d'une séquence de liaison entre les deux demi-transporteurs n'est pas nécessaire à la bonne conformation du transporteur entier chimérique ABCG2-ABCG2, les deux demi-transporteurs ABCD covalamment liés seront seulement séparés de 3 acides aminés neutres (alanine). Les 3 résidus insérés entre les deux demi-transporteurs correspondent en fait au site de restriction faisant la jonction entre les deux séquences nucléotidiques ABCD à cloner dans les vecteurs (Figure 32). Ces transporteurs chimériques entiers ont été surexprimés par transfection transitoire dans deux modèles cellulaires différents :

- des fibroblastes cutanés issus d'un patient atteint d'X-ALD et totalement déficients en transporteur ABCD1,
- des levures mutantes, déficientes pour les deux transporteurs ABC peroxysomaux Pxa1 et Pxa2, orthologues d'ABCD1.

La capacité des différents transporteurs entiers chimériques à transporter différents AGTLC radiomarqués a été évaluée de manière indirecte, soit par mesure de β -oxydation, soit en analysant la quantité d'AGTLC accumulée dans les lipides membranaires.

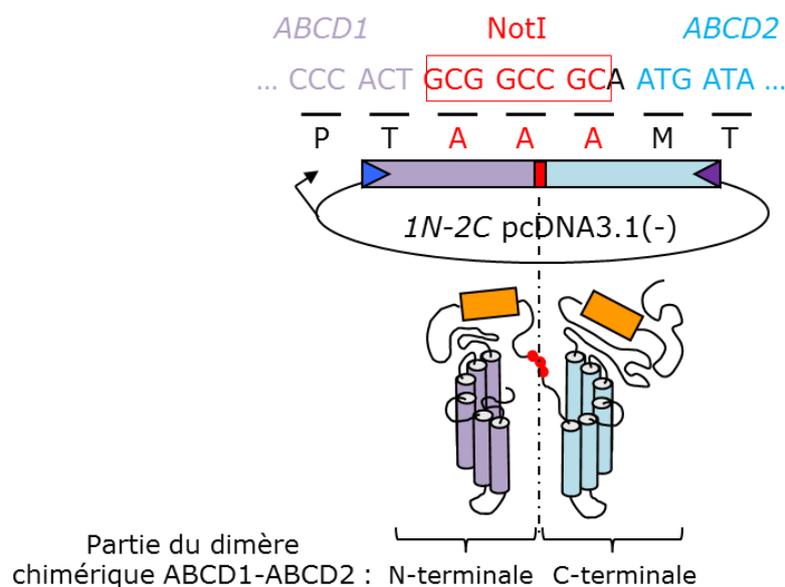


Figure 32 : Dimère chimérique ABCD1-ABCD2.

Les deux demi-transporteurs ABCD1 et ABCD2 sont covalamment liés par 3 acides aminés alanine qui correspondent au site de restriction faisant la jonction entre les deux séquences nucléotidiques ABCD1 et ABCD2 clonées dans le vecteur (ici pcDNA3.1(-)).

I. ANALYSE STRUCTURE/FONCTION DANS DES FIBROBLASTES CUTANES ISSUS D'UN PATIENT ATTEINT D'X-ALD, VIA L'UTILISATION DE TRANSPORTEURS ENTIERS CHIMERIQUES

La lignée de fibroblastes cutanés issue d'un patient masculin âgé de 32 ans atteint d'X-ALD et présentant le phénotype AMN (Coriell, # GM17819), est totalement déficiente en transporteur ABCD1. Des analyses par Southern-blot ont montré que chez le patient donneur, le gène *ABCD1* présente une délétion des exons 8 à 10. En lien avec la déficience d'*ABCD1*, ces cellules présentent une diminution de la β -oxydation peroxysomale des AGTLC et accumulent des AGTLC saturés (C26:0 et C24:0) dans leurs membranes. Les fibroblastes X-ALD expriment ABCD2 à un très faible niveau, tandis qu'ABCD3 est relativement bien exprimé.

I.1. Création des plasmides codant des transporteurs ABCD entiers chimériques

Plusieurs personnes sont intervenues dans la création des plasmides, dont Soëli Charbonnier, étudiante en Master EPHE, et le Dr Catherine Gondcaille. Dans un premier temps, les séquences ADNc d'*ABCD1*, *ABCD2* et *ABCD3* de rat, ont été amplifiées par PCR puis clonées dans le plasmide pGemTeasy, avant d'être vérifiées par séquençage. Lors de cette étape d'amplification, des sites de restriction ont été ajoutés de part et d'autre de chaque séquence afin de permettre leur clonage directionnel dans les vecteurs d'expression. Les constructions plasmidiques permettant l'expression des transporteurs chimériques entiers, ont été réalisées dans deux vecteurs d'expression en système eucaryote : le pcDNA3.1(-) et le pEGFP-N3. Ce dernier permet la synthèse de dimères chimériques fusionnés à l'EGFP à leur extrémité C-terminale, ce qui permet de détecter l'homodimère ABCD2 en immunoblot même en absence d'anticorps dirigé contre la protéine ABCD2. Les jonctions entre les partenaires ont été vérifiées par séquençage et la capacité des constructions à permettre l'expression d'une protéine chimérique a été évaluée par traduction *in vitro* (résultats non montrés). La Figure 33 illustre la stratégie de construction du plasmide *ABCD1N-ABCD2C* pcDNA3.1(-), codant le transporteur chimérique entier ABCD1-ABCD2. Une stratégie similaire a été utilisée pour toutes les autres constructions plasmidiques, qu'elles soient intégrées dans le vecteur d'expression pcDNA3.1(-) ou pEGFP-N3. Les constructions plasmidiques achevées sont recensées dans le Tableau 6.

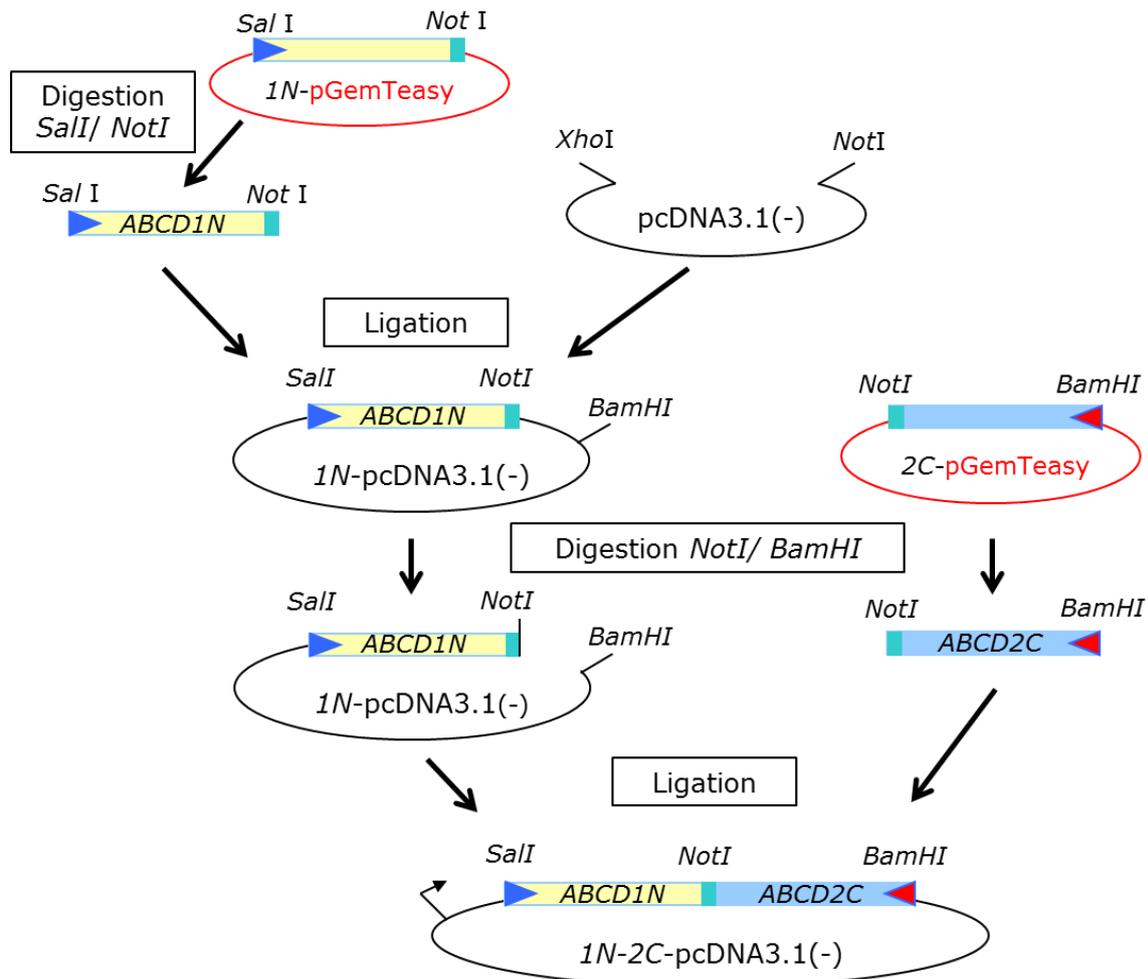


Figure 33 : Stratégie utilisée pour la construction du plasmide ABCD1N-ABCD2CpcDNA3.1(-), codant le transporteur chimérique entier ABCD1-ABCD2.

La mention « ABCD1N » fait référence à la séquence ABCD1 codant le demi-transporteur situé en N-terminal. La mention « ABCD2C » fait référence à la séquence ABCD2 codant le demi-transporteur situé en C-terminal.

| Demi-transporteur en position | | Vecteur d'expression | | |
|-------------------------------|-------------|-------------------------------------|-------------------------------------|--|
| N-terminale | C-terminale | pcDNA3.1(-) | pEGFP.N3 | |
| ABCD1 | ABCD1 | <input checked="" type="checkbox"/> | <input checked="" type="checkbox"/> | |
| ABCD2 | ABCD2 | <input checked="" type="checkbox"/> | <input checked="" type="checkbox"/> | |
| ABCD1 | ABCD2 | <input checked="" type="checkbox"/> | <input checked="" type="checkbox"/> | |
| ABCD2 | ABCD1 | <input checked="" type="checkbox"/> | <input checked="" type="checkbox"/> | |
| ABCD3 | ABCD3 | <input checked="" type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | |
| ABCD2 | ABCD3 | <input checked="" type="checkbox"/> | <input checked="" type="checkbox"/> | |
| ABCD3 | ABCD2 | <input checked="" type="checkbox"/> | <input checked="" type="checkbox"/> | |
| ABCD1 | ABCD3 | <input checked="" type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | |
| ABCD3 | ABCD1 | <input checked="" type="checkbox"/> | <input checked="" type="checkbox"/> | |

Tableau 6 : Constructions plasmidiques obtenues codant des transporteurs ABCD chimériques entiers, disponibles dans les vecteurs d'expression pcDNA3.1(-) et pEGFP-N3.

Parmi les constructions codant les différents dimères chimériques, il ne manque à l'heure actuelle que deux constructions : une codant l'homodimère ABCD3 fusionné à l'EGFP, et l'autre codant l'hétérodimère ABCD1-ABCD3 fusionné à l'EGFP. En plus des séquences nucléotidiques codant les transporteurs ABCD chimériques entiers, les séquences nucléotidiques codant les demi-transporteurs seuls (ABCD1, ABCD2 et ABCD3), ont été clonées dans les vecteurs d'expression pcDNA3.1(-) et pEGFP-N3. Parmi ces constructions, il ne nous manque que la séquence codant ABCD3, clonée dans le pEGFP-N3.

I.2. Mise au point des conditions de transfection des fibroblastes cutanés issus d'un patient atteint d'X-ALD

Lors de l'étude sur le lien entre structure et fonction des transporteurs ABCD peroxysomaux, les transporteurs chimériques entiers ont été surexprimés par transfection transitoire dans des fibroblastes cutanés issus d'un patient atteint d'X-ALD. La transfection de ces cellules avec les agents de transfactions classiques (ExGen500, LipofectamineTM 2000) s'est révélée être inefficace et il nous a fallu avoir recours à la technologie "AmayaTM NucleofectorTM" commercialisée par la société Lonza.

La première mise au point des conditions de transfection des fibroblastes concerne la quantité d'ADN utilisée pour transfecter les cellules. Lors du test, les cellules ont été transfectées avec 0 (contrôle négatif), 2 ou 3 µg de plasmide *ABCD2N-ABCD2C*-pEGFP-N3, codant le transporteur chimérique ABCD2-ABCD2 fusionné à l'EGFP. Les cellules ont été analysées 48 heures après transfection par cytométrie en flux, en observant la fluorescence de l'EGFP (Figure 34). Le test révèle que l'utilisation de 2 µg d'ADN pour transfecter 500 000 cellules, est un bon compromis entre efficacité de transfection et faible mortalité cellulaire (Figure 34).

La deuxième mise au point des conditions de transfection des fibroblastes X-ALD concerne le programme utilisé lors de la transfection. En effet, l'appareil servant à transfecter les cellules propose deux programmes : le programme P-022 qui favorise la viabilité cellulaire et le programme U-023 qui favorise la transfection cellulaire. Lors du test, les fibroblastes ont donc été transfectés par 2 µg de plasmide codant le transporteur chimérique ABCD2-ABCD2 fusionné à l'EGFP, soit avec le programme P-022 (Figure 35A), soit avec le programme U-023 (Figure 35B). Les cellules ont été analysées 64 heures après transfection par cytométrie en flux, en observant la fluorescence de l'EGFP. Ces 64 heures correspondent au délai entre la transfection des cellules et le moment où la fonction des protéines chimériques sera testée.

Ce délai de 64 heures nous a été recommandé par le Pr Ronald Wanders (Amsterdam, Pays Bas) qui lors d'une étude sur la fonction d'ABCD1 et d'ABCD2 dans des fibroblastes X-ALD, a également utilisé le système Amaxa. Le test révèle que le programme U-023 présente un bon compromis entre efficacité de transfection et mortalité cellulaire (Figure 35).

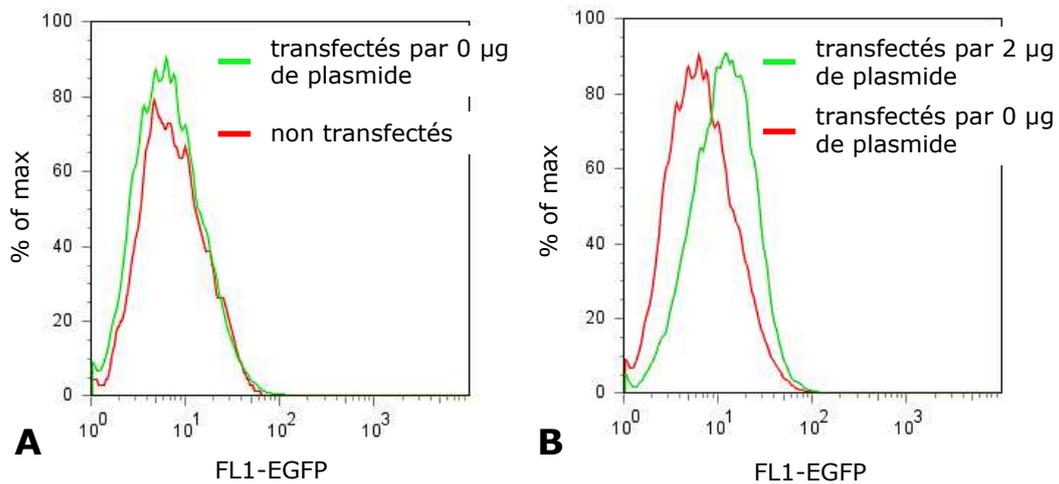


Figure 34 : Mise au point de la quantité de plasmide à utiliser lors de la transfection des fibroblastes X-ALD par les différents plasmides codant un transporteur ABCD chimérique entier. Les cellules sont transfectées par 0 µg (contrôle négatif) (A) ou 2 µg (B) de plasmide codant la protéine chimérique ABCD2-ABCD2 liée à l'EGFP. Après 48 heures de transfection, la fluorescence EGFP des cellules est mesurée par cytométrie en flux.

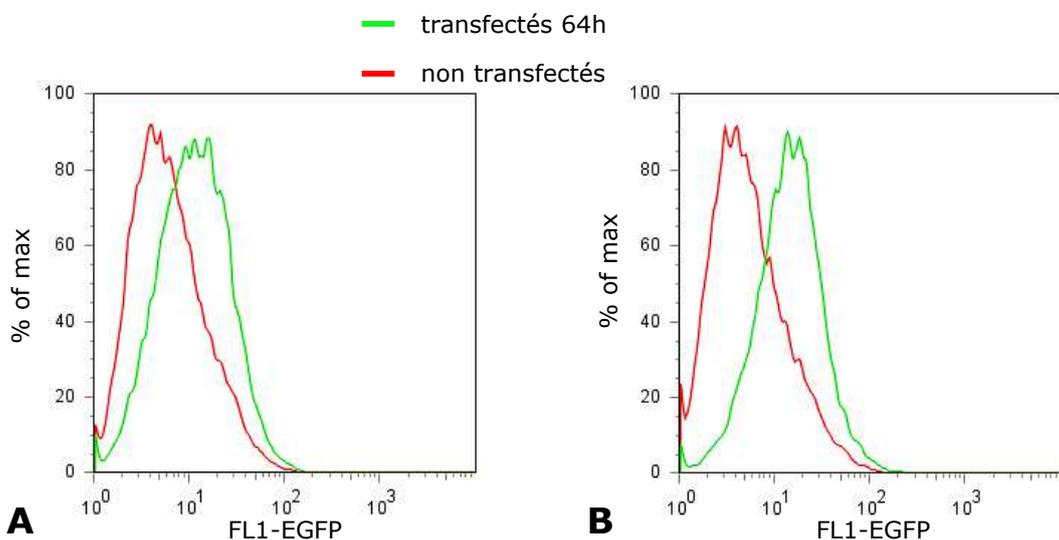


Figure 35 : Choix du programme à utiliser lors de la transfection des fibroblastes X-ALD par un plasmide codant un transporteur ABCD entier, avec l'appareil Amaxa. Lors du test, les cellules ont été transfectées par 2 µg de plasmide codant la protéine chimérique ABCD2-ABCD2 fusionnée à l'EGFP, soit avec le programme P-022 (A) qui favorise la viabilité cellulaire, soit avec le programme U-023 (B) qui favorise la transfection des cellules. Après 64 heures de transfection, la fluorescence EGFP des cellules est mesurée par cytométrie en flux.

A la suite de ces deux mises au point, nous avons donc décidé de transfecter nos fibroblastes par 2 µg de plasmide, avec le programme U-023.

I.3. Analyse de la β -oxydation peroxysomale des AGTLC

La capacité d'un transporteur ABCD entier chimérique à prendre en charge un AGTLC sera étudiée via la mesure de β -oxydation de cet AGTLC radiomarqué, dans les cellules transfectées. Autrement dit, si l'AGTLC radiomarqué est substrat du transporteur ABCD entier chimérique, il devrait s'accumuler dans le peroxysome, et donc nous devrions observer une augmentation de sa β -oxydation dans les cellules transfectées.

Mais avant de cribler un ensemble de substrats potentiels (AGTLC saturés, mono- ou poly-insaturés, branchés ou encore hydroxylés), plusieurs points doivent être vérifiés (Figure 36). En effet, il faut avant tout s'assurer :

- De la présence de la protéine chimérique produite dans les cellules,
- De la localisation peroxysomale de la protéine chimérique,
- Et enfin, de la fonctionnalité de la protéine chimérique.

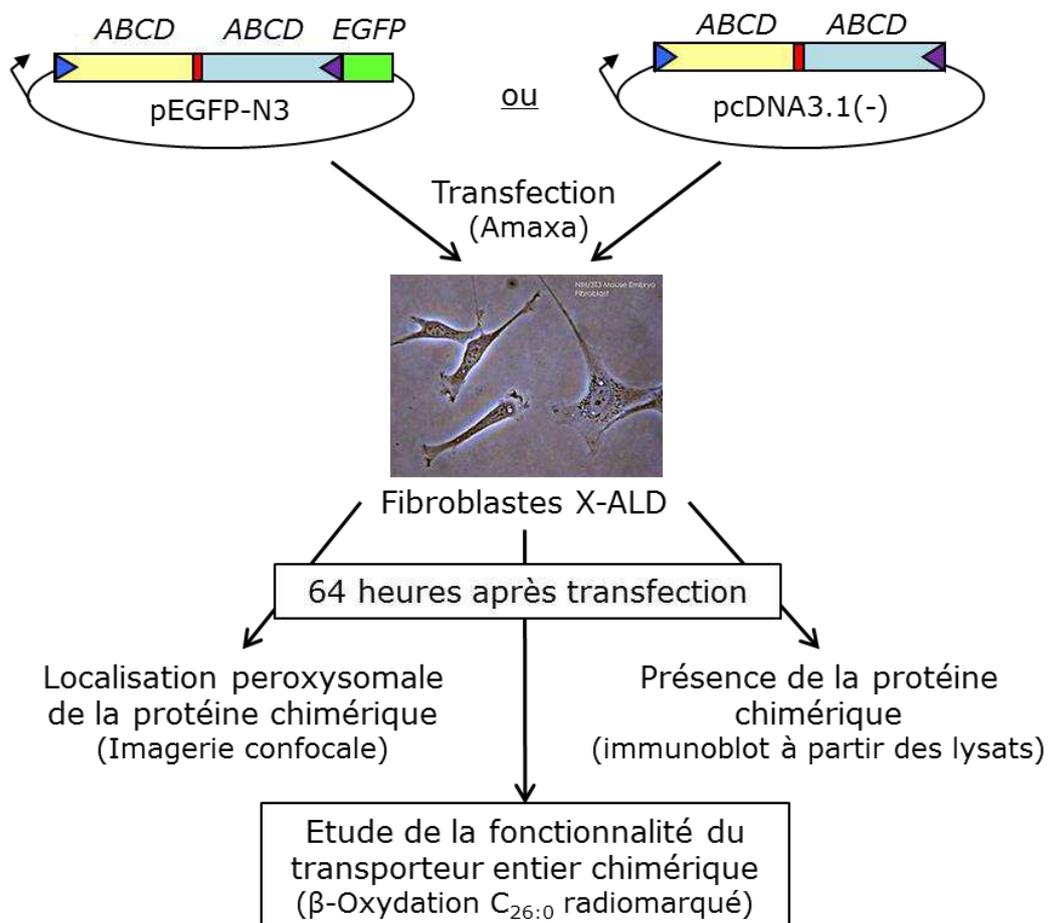


Figure 36 : Stratégie de validation de la fonctionnalité des transporteurs ABCD entiers chimériques, couplés ou non à l'EGFP, dans les fibroblastes cutanés déficients en ABCD1.

I.3.1. Présence des protéines chimériques

Seuls les monomères et les homodimères impliquant ABCD1 et ABCD2 fusionnés à l'EGFP, ont pu être détectés en immunoblot avec l'anticorps anti-GFP (Figure 37). Leur synthèse semble correcte puisque leur masse moléculaire apparente coïncidait approximativement avec leur masse moléculaire théorique. On peut remarquer que les niveaux d'expression des monomères sont plus importants que les niveaux d'expression des homodimères.

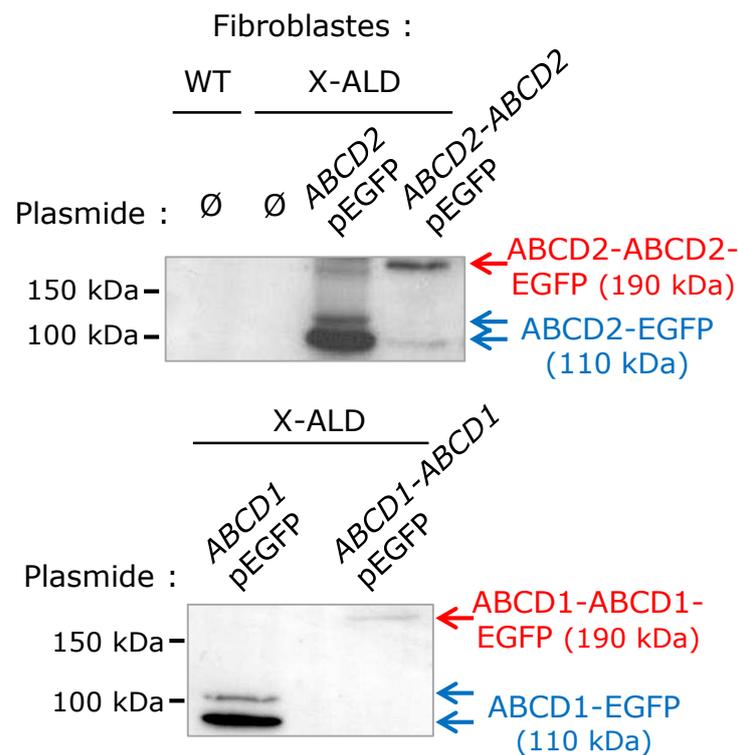


Figure 37 : Vérification de la présence des transporteurs ABCD entiers chimériques et des transporteurs ABCD1 et ABCD2, fusionnés à l'EGFP après transfection transitoire des fibroblastes X-ALD.

Les fibroblastes cutanés issus d'un patient atteint d'X-ALD ont été transfectés avec un des plasmides suivant : ABCD2pEGFP-N3, ABCD2-ABCD2pEGFP-N3, ABCD1pEGFP-N3 ou ABCD1-ABCD1pEGFP-N3. Après transfection, les lysats cellulaires sont déposés sur SDS-PAGE puis analysés en immunoblot avec l'anticorps anti-GFP. En plus des différents lysats de fibroblastes transfectés, sont également analysés le lysat de fibroblastes « Wild-Type » (WT) et de fibroblastes X-ALD non transfectés.

Etant donné que les protéines chimériques proviennent d'un enchainement forcé de deux demi-transporteurs, il est tout à fait possible qu'elles présentent une conformation anormale. Un problème de repliement pourrait entraîner leur dégradation par le protéasome, ce qui expliquerait que la quantité de dimères chimériques soit moins importante (voire nulle) dans les cellules transfectées, que la quantité de monomères. Afin d'optimiser la synthèse des protéines chimériques, nous avons décidé d'abaisser la température de culture des cellules (de

37°C à 30°C), pour donner plus de temps aux protéines de se replier correctement et passer ainsi le système contrôle qualité. D'après une publication récente, cette méthode permet d'améliorer l'expression de la protéine ABCD1 mutée dans des fibroblastes cutanés issus d'un patient atteint d'X-ALD et de restaurer sa fonctionnalité (Zhang *et al.* 2011). Nos résultats montrent que la culture des fibroblastes à 30°C au lieu de 37°C après transfection permet d'augmenter le niveau d'expression d'un facteur 4 à 5 des homodimères chimériques (Figure 38). Cela signifie que les homodimères chimériques ABCD1-ABCD1-EGFP et ABCD2-ABCD2-EGFP rencontrent des problèmes pour se replier correctement et qu'ils doivent être rejetés par le système contrôle qualité de la cellule. En revanche, un réel problème se pose pour les hétérodimères chimériques dont l'expression n'est pas visualisée par Western-Blot même lorsque les cellules sont cultivées à 30°C (Figure 38). Toutefois, il faut noter que les hétérodimères chimériques s'expriment dans la majorité des fibroblastes transfectés, mais à un très faible niveau. Seules quelques cellules expriment les hétérodimères chimériques à un niveau élevé (Figure 39).

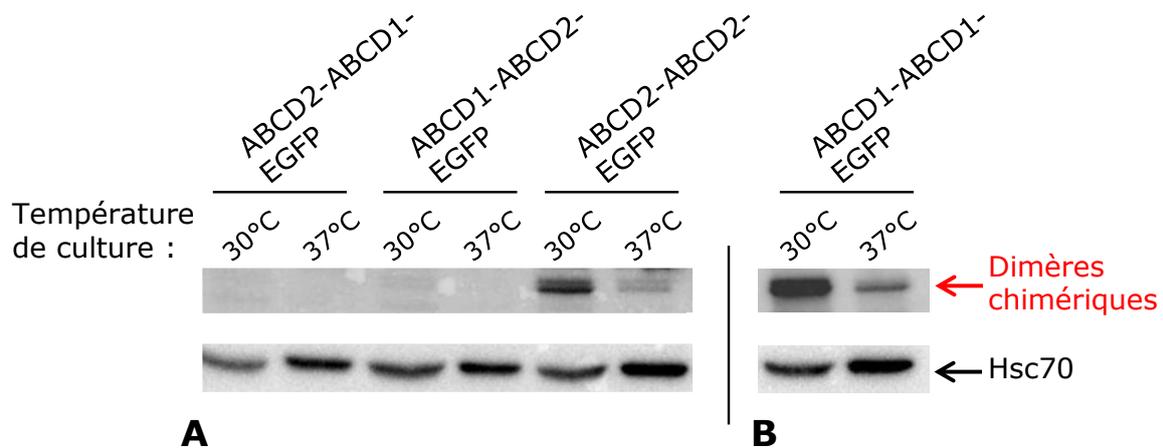


Figure 38 : Influence de la température de culture des fibroblastes X-ALD après transfection, sur le niveau d'expression des dimères chimériques produits dans les cellules.

Des fibroblastes cutanés issus d'un patient atteint d'X-ALD ont été transfectés avec différentes constructions plasmidiques codant les différents transporteurs ABCD entiers chimériques fusionnés à l'EGFP. Après transfection, les lysats cellulaires sont déposés sur SDS-PAGE puis analysés en immunoblot avec l'anticorps anti-ABCD2 (A) ou avec l'anticorps anti-ABCD1 (B). La révélation de la protéine Hsc70 dans les lysats cellulaires sert à normaliser la quantité de protéine analysée dans chaque piste.

I.3.2. Localisation peroxysomale des protéines chimériques.

La localisation peroxysomale des protéines chimériques est vérifiée par colocalisation avec la catalase, une protéine de la matrice peroxysomale, par microscopie confocale (Figure 39).

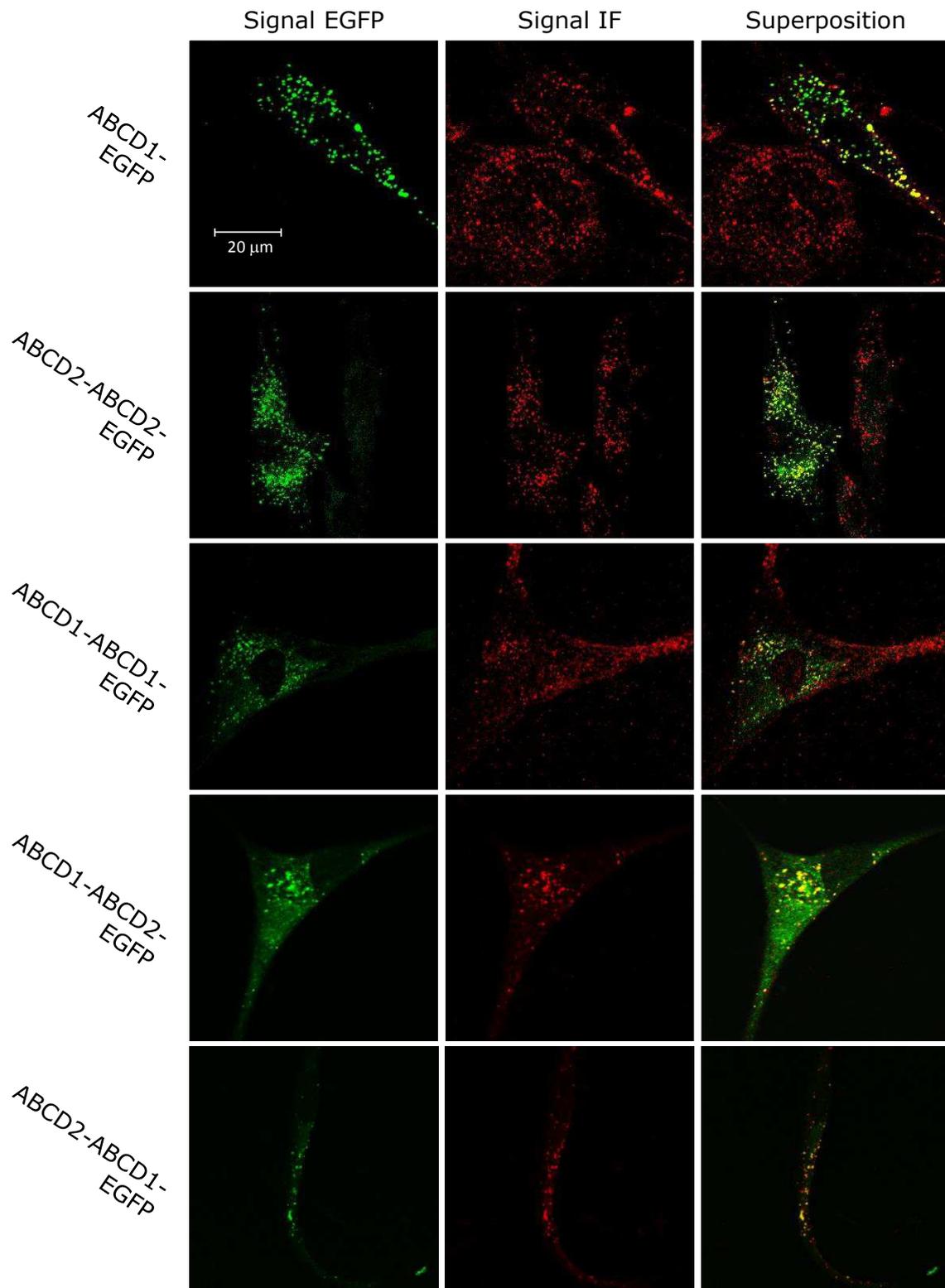


Figure 39 : Vérification de la localisation peroxysomale des transporteurs ABCD entiers chimériques et d'ABCD1, fusionnés à l'EGFP, dans des fibroblastes X-ALD transfectés de manière transitoire. Le signal EGFP correspond à la fluorescence des protéines de fusion (transporteurs ABCD entiers chimériques ou transporteurs ABCD1, fusionnés à l'EGFP), tandis que le signal IF correspond à l'immunomarquage de la catalase (anticorps secondaire couplé à l'Alexa 594). La localisation peroxysomale des transporteurs est validée par l'apparition d'un marquage ponctué jaune après superposition des deux signaux obtenus en microscopie confocale (objectif 63x).

Les résultats obtenus sont cohérents avec ceux obtenus précédemment en immunoblot : les niveaux d'expression des transporteurs chimériques sont très variables. En effet, les deux homodimères sont relativement bien exprimés, tandis que les hétérodimères ABCD1-ABCD2 et ABCD2-ABCD1 sont très peu exprimés dans les fibroblastes. Comme les homodimères, les monomères ABCD1 et ABCD2 fusionnés à l'EGFP sont bien exprimés. Au final, quel que soit leur niveau d'expression, toutes les protéines fusionnées à l'EGFP (dimères forcés ou monomères) sont correctement localisées dans la membrane peroxysomale.

I.3.3. Fonctionnalité des protéines chimériques

La fonctionnalité des transporteurs ABCD chimériques entiers a été vérifiée par une étude de complémentation. En effet, les demi-transporteurs ABCD peroxysomaux ne présentent pas une spécificité de substrat stricte et ils sont fonctionnellement redondants. Dans les fibroblastes X-ALD, la fonctionnalité des transporteurs chimériques est étudiée via leur capacité à remplacer fonctionnellement le transporteur ABCD1. On cherche à vérifier si les protéines chimériques sont capables de restaurer la β -oxydation peroxysomale du C26:0 (Figure 40).

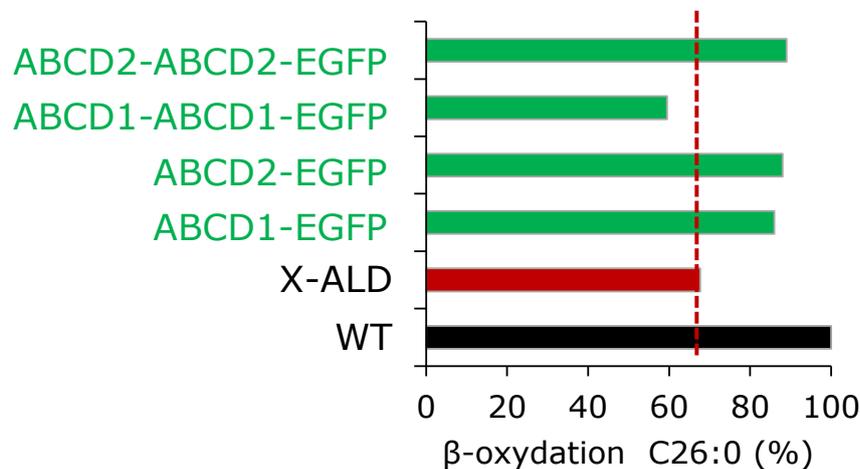


Figure 40 : Etude de complémentation fonctionnelle réalisée sur un modèle de fibroblastes cutanés issus de patients atteints d'X-ALD (cellules déficientes en ABCD1).

Les fibroblastes sont transfectés de façon transitoire par un plasmide codant soit un demi-transporteur, ABCD1 ou ABCD2 (protéines contrôles, fusionnées à la protéine EGFP), soit l'homodimère chimérique ABCD1 ou ABCD2, fusionné à la protéine EGFP. La fonctionnalité des transporteurs est ensuite vérifiée par mesure de la β -oxydation du C26:0.

Au niveau fonctionnel, nos expériences mettent en évidence que le demi-transporteur ABCD1 fusionné à la protéine EGFP ne restaure pas entièrement la β -oxydation du C26:0 dans les fibroblastes X-ALD. Ce problème pourrait tout simplement venir du fait que seuls 60 à 80%

des cellules sont transfectées. Le demi-transporteur ABCD2-EGFP restaure partiellement la β -oxydation du C26:0 dans les fibroblastes X-ALD, au même niveau que l'homodimère ABCD2-ABCD2-EGFP. Ceci suggère que l'homodimère chimérique ABCD2-ABCD2-EGFP est fonctionnel dans les fibroblastes X-ALD. En revanche, de manière tout à fait inattendue, l'homodimère chimérique ABCD1-ABCD1-EGFP ne restaure pas du tout la β -oxydation du C26:0 dans les fibroblastes déficients en *ABCD1*. Pourtant la protéine est bien exprimée dans les cellules et elle est correctement localisée.

Les points validés au cours de l'étude de la fonctionnalité des transporteurs ABCD entiers chimériques, sont répertoriés dans le Tableau 7.

| | Immunoblot | Imagerie confocale | β -oxydation C _{26:0} |
|------------|-------------------------|--------------------|--------------------------------------|
| D1-EGFP | ☒ | ☒ | ☒ |
| D2-EGFP | ☒ | ☒ | ☒ |
| D3-EGFP | Plasmide non disponible | | |
| D2-D2-EGFP | ☒ | ☒ | ☒ |
| D2-D1-EGFP | Non testé | ☒ | Non testé |
| D2-D3-EGFP | Plasmide non testé | | |
| D1-D1-EGFP | ☒ | ☒ | ∅ |
| D1-D2-EGFP | ∅ | ☒ | ∅ |
| D1-D3-EGFP | Plasmide non disponible | | |
| D3-D1-EGFP | ∅ | ☒ | ∅ |
| D3-D2-EGFP | Plasmide non testé | | |
| D3-D3-EGFP | Plasmide non disponible | | |

Tableau 7: Etude de la fonctionnalité des transporteurs ABCD entiers chimériques et des transporteurs ABCD1, 2 et 3, fusionnés à l'EGFP, dans des fibroblastes X-ALD.

La présence et la taille des protéines dans le lysat des cellules transfectées est évaluée en immunoblot avec un anticorps anti-GFP. La localisation peroxysomale des protéines fusionnées à l'EGFP est vérifiée par colocalisation avec la catalase (protéine peroxysomale) et observée en imagerie confocale. Enfin, la fonctionnalité des protéines est estimée par une étude de complémentation de β -oxydation du C26:0 dans les fibroblastes totalement déficients en *ABCD1*.

I.4. Analyse des AGTLC dans les phospholipides par GC/MS-NICI

La déconvenue obtenue avec la protéine chimérique ABCD1-ABCD1-EGFP n'est pas la seule qui est arrivée lors des mesures de β -oxydation du C26:0. En effet, nous avons rencontré quelques soucis de reproductibilité d'une étude à l'autre, surtout au niveau de la β -oxydation de base des fibroblastes non transfectés... Ces problèmes nous ont alors amené à réaliser un dosage du C26:0 contenu dans les lipides membranaires. En effet, les fibroblastes X-ALD accumulent du C26:0 dans leurs membranes. La complémentation de la déficience en *ABCD1* par un transporteur chimérique entier fonctionnel devrait permettre de diminuer, voire de normaliser les taux de C26:0 contenu dans les lipides. Le dosage a été effectué par GC-MS sur la plateforme de lipidomique de Dijon.

Dans cette étude, les fibroblastes ont été cultivés à 30°C après transfection, afin d'améliorer la synthèse des protéines chimériques. En plus du dosage du C26:0 (Figure 41) contenu dans les phospholipides membranaires, nous avons fait doser le C24:0, le C26:1 et le C24:1. Ces quatre AGTLC sont connus pour s'accumuler dans les tissus des patients atteints d'X-ALD. Dans les graphiques, la quantité d'AGTLC est normalisée par rapport à la quantité de C22:0.

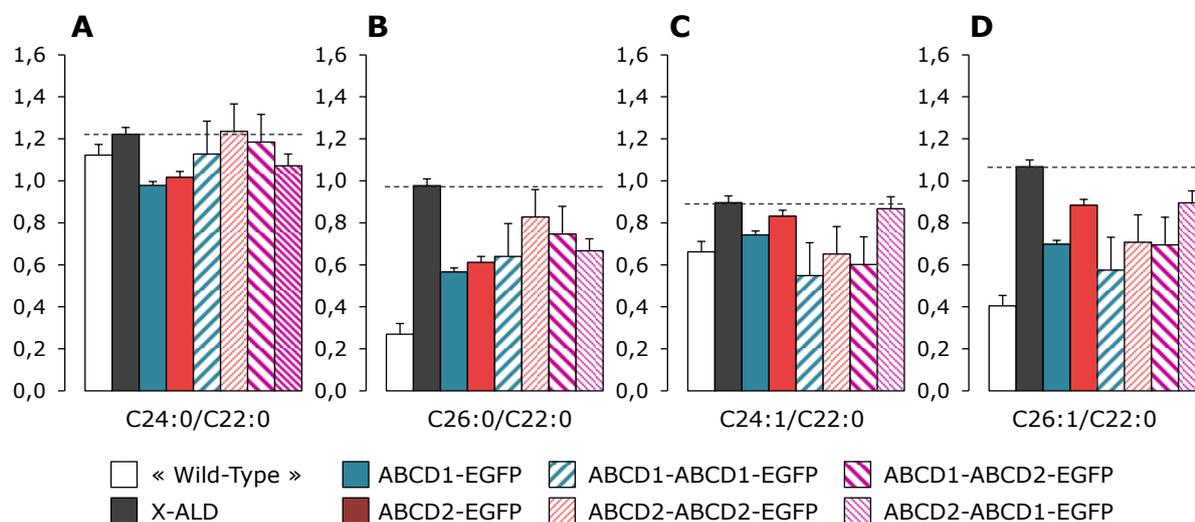


Figure 41 : Etude de complémentation fonctionnelle réalisée sur un modèle de fibroblastes cutanés issus de patients atteints d'X-ALD (cellules déficientes en *ABCD1*).

Les fibroblastes X-ALD sont transfectés de façon transitoire par un plasmide codant soit les demi-transporteur *ABCD1* ou *ABCD2*, fusionnés à l'EGFP, soit les transporteurs *ABCD* entiers chimériques *ABCD1-ABCD1*, *ABCD2-ABCD2*, *ABCD1-ABCD2*, ou *ABCD2-ABCD1*, fusionnés à l'EGFP. La fonctionnalité des transporteurs est ensuite vérifiée par dosage d'AGTLC saturés et monoinsaturés, contenus dans les phospholipides membranaires. Ces résultats préliminaires ont été obtenus à partir de trois expériences indépendantes pour chaque construction.

Avant d'analyser les résultats présentés ci-dessus, il faut noter que ceux-ci ne sont pas définitifs. En effet, l'expérience de complémentation fonctionnelle est en cours de répétition, afin de soutenir les résultats obtenus à l'heure actuelle à partir de trois expériences indépendantes pour chaque construction. De plus, les résultats ne sont pas normalisés par rapport à l'efficacité de transfection des cellules. Ainsi, les effets observés sont probablement sous-estimés car les cellules ne sont jamais transfectées à 100 %. D'après l'analyse des cellules après transfection par microscopie à fluorescence, les deux monomères et les deux homodimères sont relativement bien exprimés, tandis que les hétérodimères sont très peu exprimés dans les fibroblastes.

D'après les résultats obtenus, la lignée cellulaire de fibroblastes issus d'un patient atteint d'X-ALD accumule du C26:0, du C26:1 et du C24:1, dans ses lipides. En revanche, l'accumulation de C24:0 est anormalement faible (voire nulle) par rapport aux fibroblastes sains. Ainsi, il n'est pas surprenant de constater que les fibroblastes déficients en *ABCD1* et exprimant les dimères chimériques, présentent des quantités de C24:0 dans leurs lipides proches des quantités observées pour les fibroblastes déficients non transfectés. Aucune conclusion ne peut donc être tirée quant à la fonctionnalité des protéines chimériques vis-à-vis du C24:0.

Les cellules transfectées avec les monomères *ABCD1-EGFP* ou *ABCD2-EGFP* présentent une forte diminution de l'accumulation de C26:0 dans les lipides. Ces résultats coïncident parfaitement avec ceux obtenus par mesure de la β -oxydation du C26:0 dans les cellules transfectées (Figure 40). En effet, les monomères *ABCD1* et *ABCD2* fusionnés à l'EGFP transportent du C26:0 dans le peroxyosome des fibroblastes déficients en *ABCD1* (Figure 40 et Figure 41), mais également du C24:0, du C26:1, et probablement du C24:1 (Figure 41).

L'homodimère *ABCD2-ABCD2* fusionné à l'EGFP, permet également de diminuer l'accumulation de C26:0 dans les fibroblastes déficients en *ABCD1*, mais de façon moins importante que le monomère *ABCD2-EGFP* (Figure 41). Ce résultat est en accord avec celui obtenu précédemment par mesure de la β -oxydation du C26:0 dans les cellules transfectées (Figure 40). L'homodimère *ABCD2-ABCD2-EGFP* permettrait d'importer le C26:0 dans le peroxyosome des fibroblastes déficients en *ABCD1* et par conséquent de restaurer sa β -oxydation, et de diminuer son accumulation dans les cellules. En plus du C26:0, le transporteur entier chimérique transporterait du C24:1 et du C26:1. La mesure de β -oxydation du C26:0 dans les fibroblastes transfectés avec l'homodimère *ABCD1-ABCD1-EGFP* ne

nous a pas permis de conclure sur la fonctionnalité de la protéine chimérique (Figure 40). En revanche, d'après ces nouvelles expériences de complémentation fonctionnelle, l'homodimère ABCD1-ABCD1-EGFP serait tout à fait fonctionnel et permettrait de diminuer l'accumulation de C26:0 dans les fibroblastes déficients en *ABCD1*, mais de façon moins importante que le monomère ABCD1-EGFP (Figure 41). En plus du C26:0, le transporteur entier chimérique transporterait du C24:1 et du C26:1.

D'après les résultats obtenus, les deux hétérodimères semblent fonctionnels vis-à-vis du C26:0 et du C26:1 (Figure 41). En effet, malgré une expression très faible dans les cellules transfectées, ils permettent tout de même de diminuer l'accumulation de C26:0 et de C26:1 dans les fibroblastes issus de patients atteints d'X-ALD. En revanche, seul l'hétérodimère ABCD1-ABCD2-EGFP serait capable de transporter du C24:1. Il faut tout de même noter que cette expérience est la première à démontrer que les demi-transporteurs ABCD1 et ABCD2 sont fonctionnels non seulement sous forme d'homodimères, mais également d'hétérodimères.

Pour conclure, d'après les mesures de β -oxydation du C26:0 dans les fibroblastes X-ALD transfectés et d'après les dosages d'AGTLC dans les lipides, les transporteurs ABCD1 et ABCD2 fusionnés à l'EGFP, ainsi que les transporteurs ABCD entiers chimériques seraient fonctionnels.

II. ANALYSE STRUCTURE/FONCTION DANS UN MODELE DE LEVURES MUTANTES, VIA L'UTILISATION DE TRANSPORTEURS ENTIERS CHIMERIQUES

Durant l'étude sur le lien structure / fonction des transporteurs ABCD peroxysomaux, les transporteurs entiers chimériques ont non seulement été surexprimés dans des fibroblastes humains déficients en *ABCD1*, mais également dans un modèle de levures mutantes, déficientes pour les deux transporteurs ABC peroxysomaux Pxa1 et Pxa2. Ces levures mutantes sont incapables d'importer des AGTLC (saturés, mono-et poly-insaturés) dans leur peroxysome et donc de les β -oxyder. Une caractéristique importante de ces levures est qu'elles sont incapables de pousser sur un milieu contenant de l'oléate (C18:1). L'ensemble du travail sur la levure a été réalisé par le Dr van Roermund de l'équipe du Pr Wanders (Amsterdam, Pays Bas).

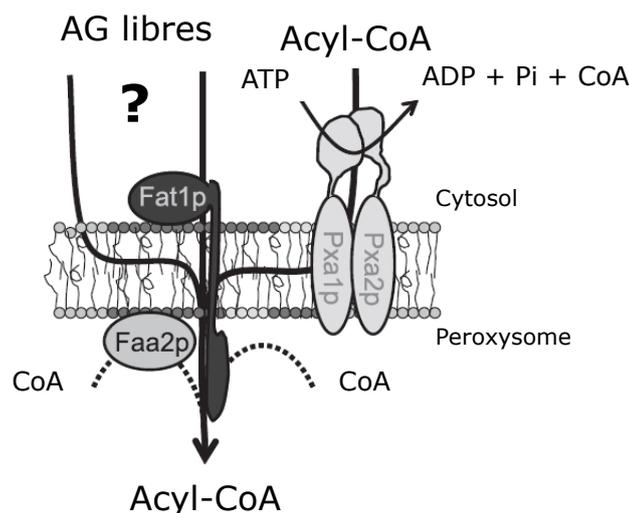


Figure 42 : Modèle de transport des AG à travers la membrane peroxysomale, chez la levure *S. cerevisiae*.

L'importation des AG dans le peroxysome fait intervenir deux voies : les AG à chaîne moyenne franchissent librement la membrane peroxysomale et sont activés une fois dans le peroxysome par une acyl-CoA synthétase (*Faa2p* et/ou *Fat1p*). La deuxième voie permet d'importer les AGLC ou les AGTLC. Elle fait intervenir les deux demi-transporteurs ABC peroxysomaux *Pxa1* et *Pxa2* qui transportent l'AG débarrassé du CoA dans le peroxysome. L'AG est ensuite réactivé par la *Faa2p* et/ou la *Fat1p*, avant d'être métabolisé par β -oxydation. [Adapté de (van Roermund et al. 2012)]

Bien que les levures constituent un modèle d'étude très éloigné de l'Homme, elles présentent un avantage certain par rapport aux cellules de mammifères. En effet, chez la levure, le peroxysome est le lieu unique de la β -oxydation des AG, contrairement aux cellules de mammifères où la β -oxydation des AG a lieu dans le peroxysome et dans la mitochondrie. Le transport des AG à travers la membrane peroxysomale suit deux voies différentes suivant la taille de la chaîne carbonée de l'AG (Figure 42) (van Roermund et al. 2012). *Pxa1* et *Pxa2*,

qui sont deux demi-transporteurs ABC peroxysomaux, orthologues d'ABCD1, ABCD2 et ABCD3, sont impliqués dans le transport d'acyl-CoA après hétérodimérisation (Hetteema *et al.* 1996; Shani *et al.* 1996).

Cette souche de levure mutante, déficiente pour les deux transporteurs peroxysomaux *Pxa1* et *Pxa2*, a déjà été utilisée lors de précédentes études sur la recherche de substrats spécifiques d'ABCD1 et d'ABCD2 humaines. La surexpression du transporteur ABCD1 chez les levures mutantes permet de restaurer leur croissance sur un milieu contenant de l'oléate et permet également de restaurer partiellement la β -oxydation du C22:0 (van Roermund *et al.* 2008). Cette étude a donc permis de montrer que la protéine ABCD1 humaine est tout à fait fonctionnelle chez la levure, et surtout, que le transporteur ABCD1 est fonctionnel sous forme d'homodimère, ce qui est un point tout à fait intéressant pour nous... D'après une seconde étude, la surexpression du transporteur ABCD2 chez les levures mutantes permet également de reverser leur phénotype (van Roermund *et al.* 2011). Ainsi, tout comme la protéine ABCD1 humaine, ABCD2 est fonctionnelle chez la levure, sous forme homodimérique. De plus, ces études chez la levure ont permis d'attribuer aux deux transporteurs ABCD peroxysomaux des spécificités de substrats. Ainsi, d'après des mesures de β -oxydation d'AGTLC radiomarqués chez les levures transfectées, ABCD2 transporterait préférentiellement des AGTLC insaturés et ABCD1 des AGTLC saturés.

C'est en se basant sur ces travaux que notre projet s'est construit. L'objectif était de surexprimer les transporteurs ABCD chimériques entiers dans les levures déficientes en *Pxa1* et *Pxa2*, pour ensuite tester la β -oxydation de différents AGTLC radiomarqués et déterminer quels substrats sont pris en charge par quels dimères. Mon travail a concerné l'élaboration des constructions plasmidiques codant les transporteurs chimériques, tandis que le Dr van Roermund a réalisé la transfection des levures déficientes en *Pxa1* et *Pxa2* et les mesures de β -oxydation.

II.1. Création des transporteurs ABCD entiers chimériques

A la différence des constructions plasmidiques codant les transporteurs entiers chimériques utilisés en transfection dans des fibroblastes humains, les constructions plasmidiques utilisés chez la levure ont été élaborées dans le vecteur d'expression pEL30. Ce vecteur nous a été fourni par le Dr van Roermund qui l'a utilisé lors de ses précédentes études chez la levure. La stratégie que j'ai suivie pour élaborer les constructions plasmidiques dans le vecteur pEL30

était relativement élémentaire. Les séquences nucléotidiques codant un transporteur entier, clonées dans le vecteur pcDNA3.1(-) ont été transférées dans le vecteur pEL30.

L'objectif était d'exprimer des protéines de rat chez la levure tout en sachant que la fréquence d'usage des codons chez le rat est très différente de chez la levure et que cette différence notable peut entraîner des difficultés d'expression du transgène. Il a donc été décidé de procéder à une optimisation de plusieurs codons. D'après la fréquence d'utilisation des codons chez la levure, présentée en partie dans le Tableau 8, ce sont surtout trois codons rares codant pour l'arginine et deux codant pour la leucine, qui sont susceptible de poser problème. La solution pour permettre une bonne expression de nos protéines chimériques de rat chez la levure, consiste à optimiser les séquences codantes, c'est-à-dire remplacer les codons rares par des codons fréquents d'usage, par mutagénèse dirigée.

| | | | | | | | | |
|-------|------|-------|------|-------|------|-------|------|------------------|
| CUU L | 0.13 | CCU P | 0.31 | CAU H | 0.64 | CGU R | 0.15 | |
| CUC L | 0.06 | CCC P | 0.15 | CAC H | 0.36 | CGC R | 0.06 | ← Codons rares |
| CUA L | 0.14 | CCA P | 0.42 | CAA Q | 0.69 | CGA R | 0.07 | |
| CUG L | 0.11 | CCG P | 0.12 | CAG Q | 0.31 | CGG R | 0.04 | |
| AUU I | 0.46 | ACU T | 0.35 | AAU N | 0.59 | AGU S | 0.16 | |
| AUC I | 0.26 | ACC T | 0.21 | AAC N | 0.41 | AGC S | 0.11 | |
| AUA I | 0.27 | ACA T | 0.30 | AAA K | 0.58 | AGA R | 0.48 | ← Codon fréquent |
| AUG M | 1.0 | ACG T | 0.14 | AAG K | 0.42 | AGG R | 0.21 | |

Tableau 8 : Fréquence d'utilisation des codons chez la levure

Sur les conseils du Dr van Roermund, nous avons optimisé la séquence nucléotidique codant la protéine ABCD1 de rat, en remplaçant les codons rares par des codons d'usage fréquent. D'après son expérience avec la protéine ABCD1 humaine, il suffisait d'optimiser les onze premiers codons de la séquence nucléotidique pour permettre une bonne expression du transgène (van Roermund *et al.* 2008). Les codons qui ont été optimisés sur la séquence nucléotidique codant la protéine ABCD1 de rat, sont présentés dans le Tableau 9.

| Séquence ADNc d'ABCD1 de rat | ATG | CCG | GTA | CTC | TCC | ACT | CCC | TCC | CGG | CCC | TCG | CGG |
|------------------------------------|-----|------|------|------|------|-----|-----|-----|------|-----|-----|------|
| Fréquence d'utilisation des codons | | 0.12 | 0.21 | 0.06 | 0.16 | | | | 0.04 | | | 0.04 |
| Codons optimisés | | CCA | GTT | TTG | TCT | | | | AGA | | | AGA |
| Fréquence d'utilisation des codons | | 0.42 | 0.39 | 0.29 | 0.26 | | | | 0.48 | | | 0.48 |
| Acides aminés codés | M | P | V | L | S | T | P | S | R | P | S | R |

Tableau 9 : Présentation des douze premiers codons de la séquence ADNc d'ABCD1 de rat et de leur fréquence d'utilisation chez la levure.

Parmi ces douze codons, six ont dû être optimisés afin de permettre une bonne expression de la protéine ABCD1 chez la levure.

D'après un logiciel d'analyse de la fréquence d'usage des codons (<http://gcu.schoedl.de/>), la protéine ABCD2 de rat présente peu de codons rares en son début (Figure 43). De plus, d'après l'expérience du Dr van Roermund, il n'y a pas de soucis d'expression de la protéine ABCD2 humaine chez la levure. Pour ces raisons, nous avons choisi de ne pas optimiser la séquence nucléotidique codant la protéine ABCD2 de rat, avant de l'exprimer dans le système de levure.

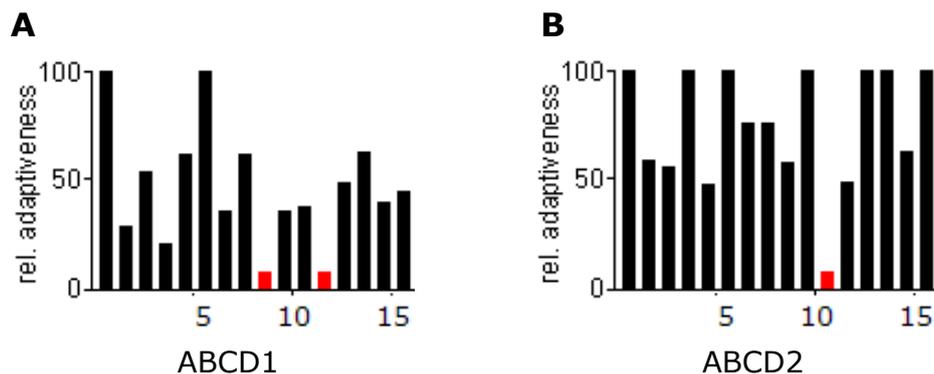


Figure 43 : Analyse de la fréquence d'usage chez la levure, des 16 premiers codons des séquences nucléotidiques codant les protéines ABCD1 (A) et ABCD2 (B), de rat.

Les codons indiqués en rouge présentent un pourcentage d'utilisation chez la levure inférieur à 10%. (<http://gcu.schoedl.de/>)

Les constructions plasmidiques achevées sont recensées dans le Tableau 10. En plus des séquences nucléotidiques codant les transporteurs ABCD entiers, j'ai également cloné les séquences nucléotidiques codant les transporteurs ABCD1 et ABCD2 de rat, dans le vecteur d'expression pEL30.

| Demi-transporteur en position | | Plasmide |
|-------------------------------|--------------------|----------|
| N-terminale | C-terminale | |
| | Séquence optimisée | |
| ABCD1 | ☒ | ABCD1 |
| ABCD2 | | ABCD2 |
| ABCD1 | ☒ | ABCD2 |
| ABCD2 | | ABCD1 |
| ABCD3 | | ABCD3 |
| ABCD2 | | ABCD3 |

Tableau 10 : Constructions plasmidiques codant des transporteurs ABCD chimériques entiers, disponibles dans le vecteur d'expression pEL30.

Les séquences nucléotidiques codant un transporteur ABCD entier avec la protéine ABCD1 en position N-terminale, ont dû être optimisées afin de permettre une bonne expression de la protéine chimérique de rat chez la levure.

II.2. Analyse de la β -oxydation peroxysomale des AGTLC

Avant de commencer les tests de substrats potentiels des dimères chimériques par mesure de β -oxydation, il fallait s'assurer de la fonctionnalité des transporteurs ABCD entiers chez la levure, par une étude de complémentation. En effet, les demi-transporteurs ABCD peroxysomaux ne présentent pas une spécificité de substrat stricte et ils sont fonctionnellement redondants. Chez les levures, l'objectif est d'observer si les chimères sont capables de compléter fonctionnellement la déficience en *Pxa1* et *Pxa2*, en restaurant la croissance des levures sur un milieu contenant de l'oléate et en restaurant la β -oxydation du C22:0. Il faut noter que chez l'Homme, la β -oxydation du C22:0 a essentiellement lieu dans la mitochondrie. D'ailleurs, les patients atteints d'X-ALD ne présentent pas d'accumulation du C22:0. Contrairement à l'Homme, chez la levure, la β -oxydation des AG n'a lieu que dans le peroxysome et l'importation du C22:0 nécessite alors l'intervention de transporteurs ABC (*Pxa1* et *Pxa2*) (voir Figure 42). Il a d'ailleurs été montré que chez la levure, les transporteurs ABCD1 et ABCD2 humains sont capables de restaurer la β -oxydation du C22:0 (van Roermund *et al.* 2008; van Roermund *et al.* 2011). C'est donc pour cette raison que dans un premier temps, la fonctionnalité des transporteurs ABCD entiers chimériques et des demi-transporteurs murins ABCD1 et ABCD2, a été testée par mesure de la β -oxydation du C22:0.

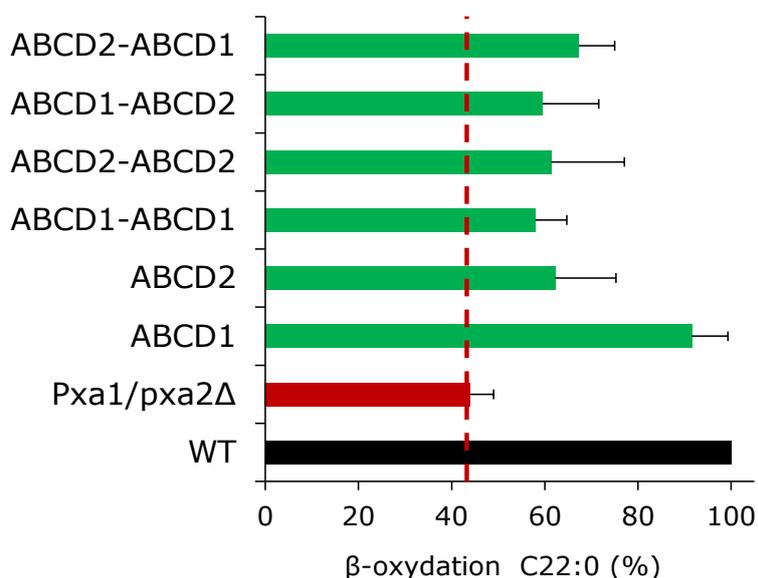


Figure 44 : Etude de complémentation fonctionnelle réalisée sur un modèle de levures déficientes en *Pxa1* et *Pxa2* (orthologues du transporteur ABCD1).

Les levures sont transfectées de façon transitoire par un plasmide codant soit un demi-transporteur, ABCD1 ou ABCD2 (contrôles), soit un transporteur ABCD chimérique entier (homo- ou hétéro-dimère d'ABCD1 et ABCD2). La fonctionnalité des transporteurs est ensuite vérifiée par mesure de la β -oxydation du C22:0.

En plus des demi-transporteurs ABCD1 et ABCD2, quatre transporteurs entiers ont été testés chez la levure : les homodimères ABCD1 et ABCD2, ainsi que les 2 hétérodimères (Figure 44). On peut constater que seule la surexpression d'ABCD1 dans les levures mutantes permet une restauration complète de la β -oxydation du C22:0. Une restauration partielle est obtenue lorsque les levures surexpriment ABCD2. C'est également le cas pour les homo- et hétérodimères d'ABCD1 et ABCD2. Ces résultats démontrent que les transporteurs ABCD entiers sont fonctionnels chez la levure et surtout qu'ABCD1 et ABCD2 sont fonctionnels autant sous forme d'homodimères que sous forme d'hétérodimères.

Pour conclure, qu'ils soient exprimés dans des fibroblastes cutanés issus d'un patient atteint d'X-ALD ou dans des levures mutantes déficientes en *Pxa1* et *Pxa2*, les transporteurs ABCD entiers chimériques sont fonctionnels. Ces résultats tendent à montrer que les demi-transporteurs ABCD peroxysomaux fonctionneraient aussi bien sous forme d'homodimères que d'hétérodimères, même si pour le moment il n'a pas été possible de déterminer une spécificité de substrat stricte pour chaque forme dimérique.

L'ensemble de ce travail basé sur l'utilisation de transporteurs ABCD entiers, dans des fibroblastes humains déficients en *ABCD1* et chez la levure, fera très prochainement l'objet d'une publication qui sera ciblée uniquement sur ABCD1 et ABCD2. Cependant, le travail continu et les dimères chimériques incluant la protéine ABCD3 vont prochainement être testés par complémentation fonctionnelle dans les fibroblastes déficients en *ABCD1*, mais également dans les levures.

III. DISCUSSION

III.1. Etude dans des fibroblastes cutanés issus d'un patient atteint d'X-ALD

La transfection transitoire de fibroblastes cutanés déficients en *ABCD1* avec différentes constructions codant un transporteur ABCD entier fusionné à l'EGFP, aboutit à la synthèse de protéines chimériques de masse moléculaire apparente attendue, et correctement localisées dans la membrane peroxysomale. Les homodimères ABCD1-ABCD1-EGFP et ABCD2-ABCD2-EGFP sont détectés dans la majeure partie de la population cellulaire transfectées ($\approx 60-70\%$), avec des niveaux d'expression variables. Les hétérodimères seraient également exprimés dans la majeure partie des cellules transfectées, mais très faiblement. Au niveau fonctionnel, les monomères ABCD1 et ABCD2 fusionnés à l'EGFP, mais également l'homodimère ABCD2-ABCD2 fusionné à l'EGFP, sont capables de restaurer partiellement la β -oxydation du C26:0 dans les fibroblastes déficients en *ABCD1*. De façon inattendue, l'homodimère ABCD1-ABCD1-EGFP ne permet pas de remplacer fonctionnellement le transporteur ABCD1. De la même façon, aucun résultat concluant n'est obtenu avec les hétérodimères entiers fusionnés à l'EGFP. Cependant, le problème semble davantage provenir de l'expérience de mesure de β -oxydation en elle-même, plutôt que de la fonctionnalité des protéines chimériques. En effet, la mesure de β -oxydation est basée sur l'utilisation de ^{14}C -C26:0, radiomarqué sur son atome de carbone α . Le point sensible des AGTLC concerne leur stabilité en solution, même lorsqu'ils sont stockés à -20°C . Ils sont facilement dégradés et leurs produits de dégradation sont susceptibles d'être à l'origine d'un bruit de fond important lors des mesures de β -oxydation. En effet, même en l'absence de cellules, un niveau de radioactivité élevé est mesuré dans la fraction acido-soluble qui recueille les intermédiaires du cycle du citrate. Malgré une purification du C26:0 radiomarqué, le bruit de fond obtenu lors des mesures de β -oxydation n'a été que faiblement diminué.

Afin d'expliquer les problèmes liés à la mesure de β -oxydation dans les fibroblastes déficients en *ABCD1*, il faut également tenir compte du faible niveau d'expression des hétérodimères, et du niveau d'expression très variable des homodimères. Les protéines chimériques correspondent à l'enchaînement forcé des deux demi-transporteurs ABC et pourraient donc rencontrer des difficultés à se replier correctement au moment de leur synthèse. Or, les protéines membranaires peroxysomales sont soumises à un système de contrôle qualité, qui est vraisemblablement très rigoureux (Takahashi *et al.* 2007). En effet, chez les patients

atteints d'X-ALD, plus de 60% des mutations faux-sens recensées, liées à la modification d'un seul acide-aminé, se traduisent par l'absence de détection d'ABCD1 en immunofluorescence (<http://www.x-ald.nl/>). Chez ces patients, l'absence de corrélation entre le niveau en ARNm et le niveau protéique d'ABCD1 muté appuie l'hypothèse que les mutations faux-sens affectent le repliement de la protéine, ce qui entraîne leur dégradation rapide par le système de contrôle qualité (Takahashi *et al.* 2007). Les transporteurs ABCD entiers chimériques pourraient suivre la même voie. D'après une publication récente, la culture à 30°C de fibroblastes cutanés, présentant une mutation faux-sens dans le gène *ABCD1*, permet dans certains cas d'augmenter le niveau protéique d'ABCD1, voir même de restaurer partiellement sa fonction (Zhang *et al.* 2011). Afin d'optimiser nos conditions expérimentales, nous avons décidé de suivre cette piste et de cultiver les fibroblastes transfectés à 30°C, jusqu'à la mesure de β -oxydation. D'après nos résultats, la culture à basse température des fibroblastes transfectés permet d'augmenter le niveau protéique des deux homodimères ABCD1 et ABCD2, fusionnés à l'EGFP, tandis que les deux hétérodimères restent très faiblement exprimés. Cela conforte l'hypothèse que les deux homodimères forcés présentent des difficultés à se replier correctement au moment de leur synthèse, mais qu'une diminution de la température de culture des cellules leur permet d'acquérir la bonne conformation. Les deux hétérodimères chimériques présentent vraisemblablement les mêmes difficultés à se replier, mais à la différence des homodimères forcés, la culture des cellules à 30°C n'améliore pas leur stabilité.

Malgré la culture à 30°C des fibroblastes déficients en *ABCD1*, exprimant les dimères chimériques fusionnés à l'EGFP, la mesure de β -oxydation du C26:0 ne donne toujours pas de résultat satisfaisant.

Cependant, les dimères chimériques fusionnés à l'EGFP permettent de diminuer l'accumulation d'AGTLC dans les lipides totaux des fibroblastes déficients en *ABCD1*, cultivés à basse température après transfection. Quel que soit leur agencement dimérique et malgré la fusion à l'EGFP, les transporteurs ABCD1 et ABCD2 semblent être fonctionnels sous forme homo- et hétérodimérique. Comme les monomères, les homodimères ABCD1 et ABCD2 fusionnés à l'EGFP, ainsi que les deux hétérodimères, seraient capables de transporter du C26:0, du C26:1 et du C24:1. Cependant, il est nécessaire de répéter les expériences afin d'augmenter la valeur de ces résultats et surtout de les évaluer par des tests statistiques.

La quantité de protéines chimériques dans les cellules ne semble pas influencer le niveau d'AGTLC contenu dans les lipides. En effet, les hétérodimères ABCD1-ABCD2 et ABCD2-ABCD1, fusionnés à l'EGFP, s'expriment à un très faible niveau dans les fibroblastes déficients en *ABCD1*, et pourtant, ils permettent de diminuer l'accumulation d'AGTLC quasiment au même niveau que les homodimères, ou même que les hétérodimères. De façon très intéressante, la faible recolonisation d'un cerveau de souris déficiente en *ABCD1*, par des cellules microgliales exprimant la protéine ABCD1 non mutée, permet de diminuer l'accumulation d'AGTLC dans l'ensemble du cerveau (Yamada *et al.* 2004). D'après la même étude, la co-culture (ratio 1:10) de cellules exprimant la protéine ABCD1 non mutée, avec des cellules déficientes en *ABCD1*, permet de diminuer l'accumulation d'AGTLC. Ainsi, on peut envisager qu'il suffit de seulement quelques fibroblastes déficients en *ABCD1* exprimant les hétérodimères chimériques à un haut niveau d'expression (comme c'est notre cas), pour diminuer l'accumulation d'AGTLC dans l'ensemble des cellules. La diminution de l'accumulation d'AGTLC pourrait se révéler indépendante de l'efficacité de transfection des cellules. Il paraît peu probable que nous réussissions à établir une spécificité de substrat stricte pour chacun des dimères chimériques. Au mieux, nous pourrions identifier les substrats pris en charge par un dimère, mais sans pouvoir préciser le niveau d'affinité pour chacun des substrats.

III.2. Etude dans un modèle de levure déficiente en Pxa1 et Pxa2

D'après l'étude de complémentation fonctionnelle des levures déficientes en *Pxa1* et *Pxa2*, réalisée en collaboration avec le Dr van Roermund, les deux homodimères ABCD1 et ABCD2, ainsi que les deux hétérodimères, sont capables de restaurer la croissance des levures sur un milieu contenant de l'oléate comme seule source de carbone, mais également de restaurer partiellement la β -oxydation du C22:0. Ces résultats supposent que les demi-transporteurs ABCD1 et ABCD2 sont fonctionnels sous forme d'homo- et d'hétérodimères, ce qui vient confirmer les résultats obtenus dans le modèle de fibroblastes déficients en *ABCD1*. Bien entendu, ces résultats ne sont pas définitifs et il sera nécessaire de réitérer les expériences afin d'augmenter leur valeur et surtout de les évaluer par des tests statistiques. Il sera également nécessaire de vérifier la localisation des protéines chimériques dans les levures transfectées, d'autant que nous disposons dorénavant d'un anticorps polyclonal dirigé contre la protéine ABCD2 de rat, réactif en immunoblot.

Un point important à prendre en compte lorsqu'on travaille dans un système d'expression hétérologue, est le problème lié à la fréquence d'usage des codons. En effet, la fréquence d'usage des codons chez le rat est très différente de chez la levure. C'est d'ailleurs pour permettre une bonne expression de la protéine ABCD1 que nous avons dû optimiser plusieurs codons localisés au début de sa séquence codante. Il faut pourtant noter que d'après plusieurs études, la séquence ARNm et la fréquence d'usage des codons, joueraient un rôle important dans la dynamique de repliement des protéines (Komar 2009). Les variations dans la fréquence d'usage des codons pourraient influencer le rythme de traduction des séquences ARNm, ce qui permettrait de moduler le temps disponible à la protéine pour se replier, et influencerait sa structure. D'après cette théorie, la même séquence ARNm traduite chez la levure et chez le rat pourrait aboutir à la synthèse de protéines avec des conformations différentes. Néanmoins, les levures étant cultivées à basse température, cela laisse plus de temps aux protéines chimériques de se replier correctement. Cette différence de fréquence d'usage des codons entre rat et levure risque pourtant de poser problème pour l'étude des dimères chimériques incluant ABCD3. En effet, la séquence ADNc d'*ABCD3* de rat présente de nombreux codons rares chez la levure, ce qui obligerait à optimiser sa séquence entière. Or, l'optimisation de la séquence entière d'*ABCD3* risque d'être laborieuse et couteuse en termes de temps. Ainsi, il est peu probable que nous nous lancions dans cette aventure. Pourtant, il serait dommage de ne pas tester l'expression d'*ABCD3* chez la levure, même non optimisé (ou seulement en partie). En effet, les séquences ADNc d'*ABCD1* et d'*ABCD2* aboutissent à l'expression de protéines fonctionnelles, malgré la présence de codons rares chez la levure, et un rythme de traduction probablement différent entre rat et levure. De plus, de la même façon que chez les plantes, le système de contrôle qualité des protéines peroxysomales chez la levure pourrait être plus tolérant que chez les mammifères (Zhang *et al.* 2011).

**CHAPITRE 4 : STATUT
OLIGOMERIQUE DES
TRANSPORTEURS ABCD
PEROXYSSOMAX**

I. INTERACTION ENTRE LES TRANSPORTEURS ABCD PEROXYSOMAUX

La première partie de mon travail sur l'oligomérisation des transporteurs ABCD peroxysomaux implique la mise en évidence des interactions entre transporteurs. Pour cela, deux approches complémentaires ont été utilisées : l'étude par « Duolink *in situ* Proximity Ligation Assay » (réalisée au sein de l'équipe par le Dr Catherine Gondcaille), ainsi qu'un travail plus courant de co-immunoprécipitation.

L'ensemble de ce travail a été mené sur le clone 28.38, qui pour rappel, est un transfectant stable obtenu à partir de cellules d'hépatomes de rats H4IIEC3, qui surexprime de manière inductible selon la dose de doxycycline ajoutée, la protéine ABCD2 fusionnée à l'EGFP (masse moléculaire théorique de 110 kDa). Ces cellules présentent l'avantage d'exprimer ABCD1 et ABCD3 mais pas (ou quasiment pas) ABCD2, au niveau basal.

I.1. Proximité des transporteurs ABCDs au sein de la membrane peroxysomale : étude par « Duolink *in situ* Proximity Ligation Assay »

L'étude par « Duolink *in situ* Proximity Ligation Assay » (technique PLA), permet de visualiser la proximité entre deux protéines (distance < 30-40 nm) à l'intérieur même de la cellule (Figure 45).

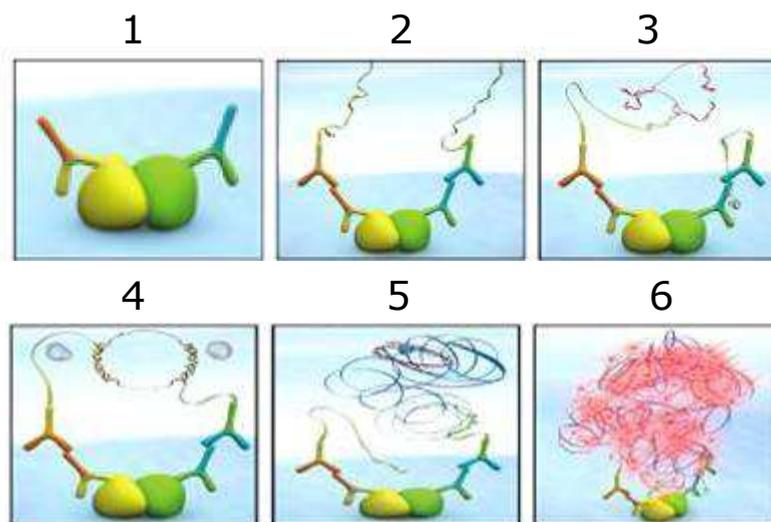


Figure 45 : Etude par « Duolink *in situ* Proximity Ligation Assay ».

Les cellules fixées sont incubées en présence des deux anticorps primaires obtenus dans deux espèces différentes (1). Si les protéines cibles des deux anticorps sont suffisamment proches (distance < 40 nm), les anticorps secondaires couplés à des sondes PLA (sondes ADN) (2) sont connectés après hybridation avec des oligonucléotides (3). L'ADN circulaire formé (4) est ensuite amplifié (5) puis hybridé avec une sonde fluorescente rouge qui révèle la proximité entre les deux protéines (6).

Elle a été développée en 2007 par la société Olink (Suède) afin de détecter, visualiser et même quantifier, des protéines, des protéines phosphorylées et des "interactions" protéine / protéine. Le terme d'"interaction" utilisé par la société Olink doit plutôt être remplacé par "proximité" car la technique PLA permet de mettre en évidence des distances protéine / protéine allant jusqu'à 40 nm. Cette technique est donc moins sensible qu'une étude par FRET et nécessite la mise en place d'étude(s) complémentaire(s), telle que la co-immunoprécipitation, afin de renforcer la valeur des résultats obtenus.

I.1.1. Validation des anticorps primaires

La technique PLA repose sur l'utilisation d'un couple d'anticorps primaires issus d'espèces différentes et chacun dirigé contre une des deux protéines dont on veut montrer la proximité. Avant de débiter l'étude par Duolink, il a d'abord fallu s'assurer de la réactivité en immunomarquage des anticorps primaires qui seront utilisés (Tableau 11).

| Anticorps anti- | Espèce d'origine |
|---|------------------|
| ABCD1 (fourni par le Pr Aubourg) (Fouquet, Zou et al. 1997) ABCD3 (obtenu au laboratoire) (Albet, Causeret et al. 1997) PMP22 | Lapin |
| GFP (Roche Applied Science) | souris |

Tableau 11 : Présentation des anticorps utilisés lors de l'étude par Duolink et des espèces animales dont ils sont issus.

Ceux-ci ont été testés en immunofluorescence sur le clone 28.38 induit à la doxycycline et surexprimant la protéine ABCD2-EGFP (Figure 46). Afin de vérifier la spécificité des anticorps, le signal rouge obtenu par immunofluorescence (anticorps secondaire couplé à l'Alexa 594) a été superposé au signal EGFP vert émis par la protéine de fusion peroxysomale ABCD2-EGFP. Lorsque l'anticorps détecte une protéine peroxysomale (ABCD1, ABCD2-EGFP, ABCD3 ou PMP22), la superposition des deux signaux donne un signal jaune.

Quel que soit l'anticorps testé, le marquage cellulaire ponctué obtenu, caractéristique du signal peroxysomal, se superpose avec le signal EGFP émis par la protéine membranaire peroxysomale ABCD2-EGFP. Les anticorps anti-ABCD1, anti-GFP, anti-ABCD3 et anti-PMP22 testés sont donc réactifs en conditions natives et pourront donc être utilisés lors des études par Duolink.

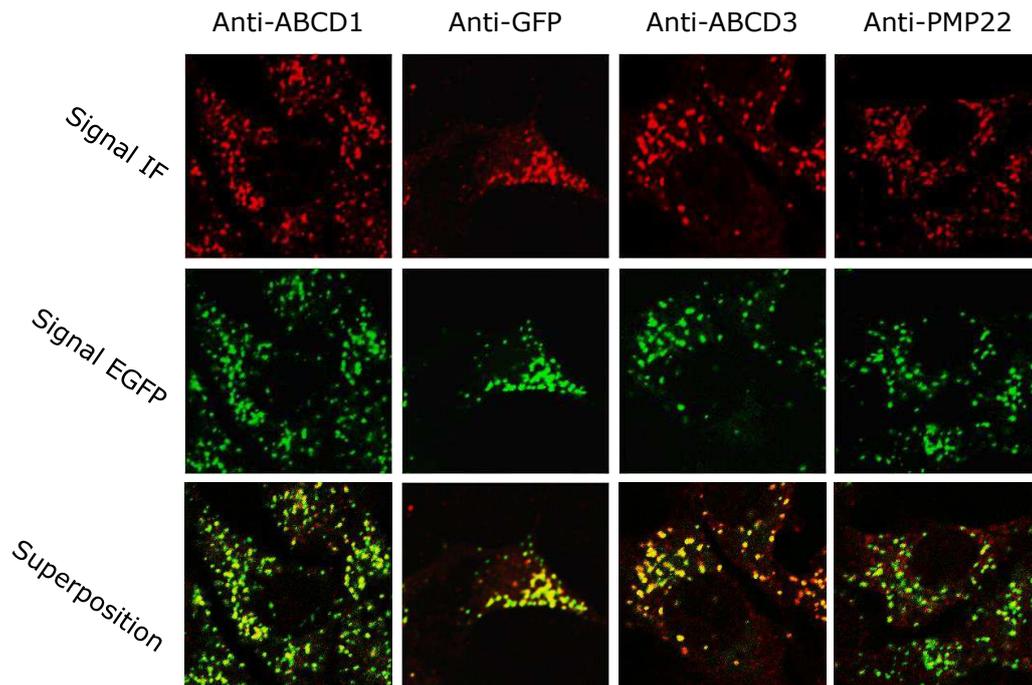


Figure 46 : Détection par immunofluorescence (signal IF) en microscopie confocale, des protéines membranaires peroxysomales ABCD1, ABCD2-EGFP, ABCD3 et PMP22, dans le clone 28.38 induit à la doxycycline.

Ces cellules surexpriment la protéine ABCD2 fusionnée à l'EGFP uniquement après induction à la doxycycline (2µg/mL, 48h) (signal EGFP). Les anticorps utilisés lors de l'immunomarquage sont recensés dans le Tableau 1. Les anticorps secondaires sont couplés à l'Alexa 594 (signal IF).

I.1.2. « Duolink *in situ* Proximity Ligation Assay »

L'étude par Duolink a été mise en place afin d'évaluer *in situ* la proximité entre les transporteurs ABCD peroxysomaux. Cependant, comme cela a été évoqué dans le chapitre précédent, la technique repose sur l'utilisation d'un couple d'anticorps primaires, dirigés chacun contre une des deux protéines dont on veut montrer la proximité. Ces deux anticorps doivent absolument provenir de deux espèces différentes car la méthode Duolink nécessite également l'utilisation d'anticorps secondaires dirigés contre les anticorps primaires et couplés à des sondes ADN (Figure 45). Ainsi, d'après les anticorps que nous avons à disposition (Tableau 11) et dont la réactivité a été testée sur le clone 28.38, nous avons pu étudier la proximité entre la protéine ABCD2-EGFP et 3 autres protéines peroxysomales, à savoir ABCD1 (Figure 47A), ABCD3 (B) et PMP22 (C).

Les expériences de Duolink ciblant les couples ABCD2-EGFP / ABCD1 et ABCD2-EGFP / ABCD3 aboutissent à l'apparition d'un signal PLA ponctué rouge et ce seulement lorsque les cellules sont induites à la doxycycline. Ainsi dans la membrane peroxysomale, la

protéine ABCD2-EGFP est proche des protéines ABCD1 et ABCD3. L'absence de signal PLA lorsque les protéines ABCD2-EGFP et PMP22 sont ciblées (Figure 47C) renforce la validité des résultats précédents, puisque PMP22 qui est une protéine majoritaire de la membrane peroxysomale, n'est pas décrite pour interagir avec ABCD2.

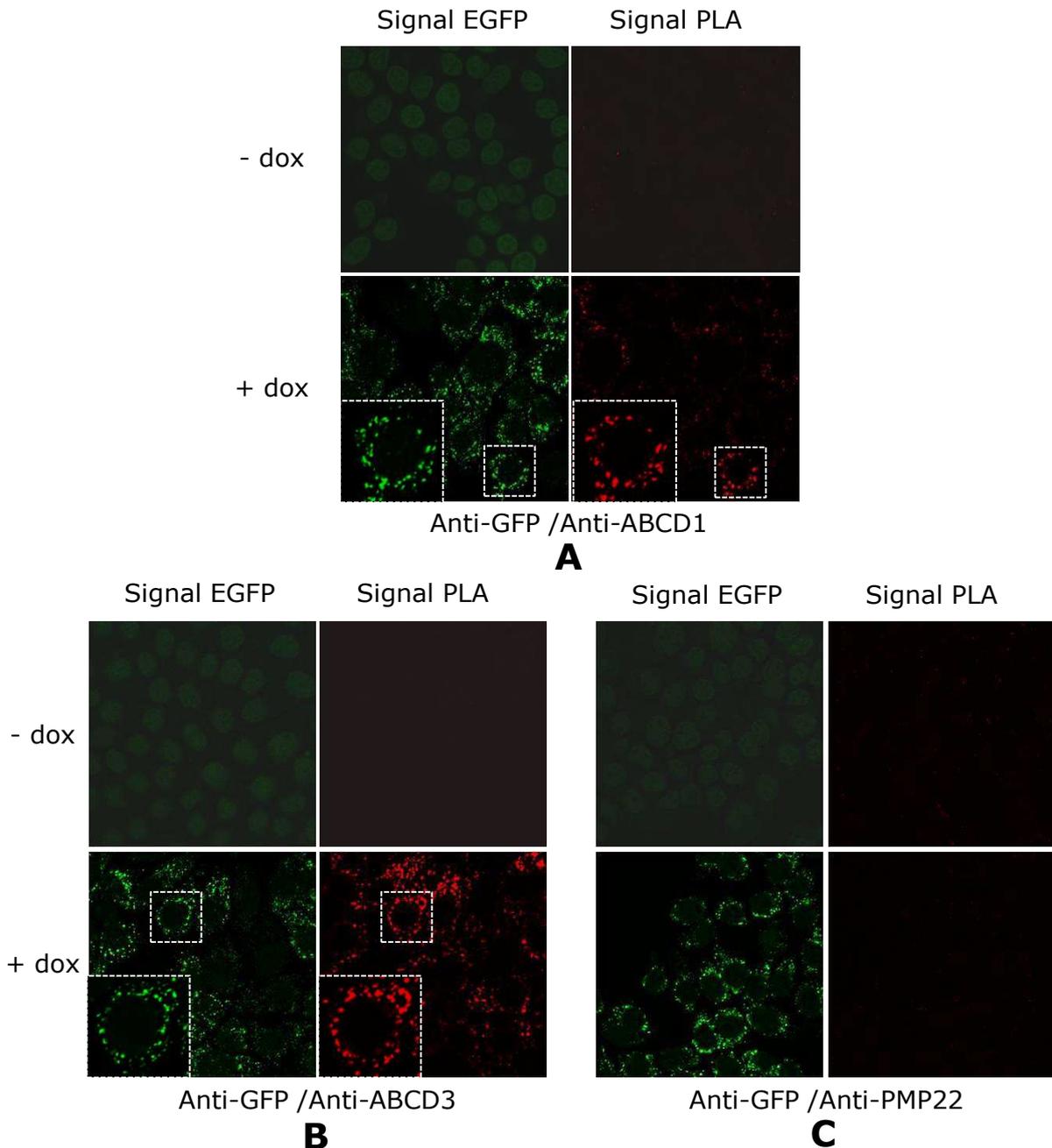


Figure 47 : Etude in situ de la proximité entre ABCD2-EGFP et d'autres protéines peroxysomales. La proximité entre les protéines ABCD2-EGFP et ABCD1 (A), ABCD2-EGFP et ABCD3 (B) et enfin ABCD2-EGFP et PMP22 (contrôle négatif) (C) a été étudiée au sein du clone 28.38 induit (+ dox) ou non (- dox). Le signal EGFP correspond à la fluorescence verte émise par la protéine de fusion ABCD2-EGFP, tandis que le signal PLA rouge témoigne de la proximité entre les deux protéines étudiées. L'observation des cellules a été réalisée en microscopie confocale. Les différents couples d'anticorps primaires utilisés sont notés en bas de la figure.

I.2. Interaction entre les transporteurs ABC peroxysomaux : étude *in vitro* par co-immunoprécipitation

Afin de déterminer si la proximité entre les transporteurs ABCD dans la membrane peroxysomale résulte d'une interaction physique, des expériences de co-immunoprécipitation croisées ont été mises en place. La co-immunoprécipitation est une technique qui consiste à isoler un complexe protéique en utilisant un anticorps dirigé contre un des membres du complexe. Les protéines immunoprécipitées et co-immunoprécipitées ainsi isolées, sont séparées par électrophorèse sur gel de polyacrylamide puis transférées sur membrane de PVDF (« PolyVinylidene DiFluoride ») et identifiées par révélation de la membrane avec les anticorps d'intérêt.

Pour cette étude de co-immunoprécipitation, je disposais de deux anticorps polyclonaux réactifs en conditions natives : un anticorps anti-ABCD1 et un anticorps anti-ABCD3 (Tableau 11). Pour rappel, lors d'une immunoprécipitation, les anticorps sont immobilisés sur des billes de Sépharose en se fixant sur la protéine A covalamment liée aux billes. Au moment de décrocher les complexes protéiques des billes (par le tampon de charge utilisé pour les dépôts sur SDS-PAGE), les anticorps utilisés pour l'immunoprécipitation sont également décrochés de la protéine A-sépharose et se retrouvent dans la fraction immunoprécipitée. Malheureusement, lorsque la fraction immunoprécipitée est analysée en immunoblot, les anticorps utilisés pour l'immunoprécipitation sont révélés par les anticorps secondaires et polluent le signal lié à la protéine d'intérêt... Afin de s'affranchir de ce problème, j'ai donc immobilisé de façon covalente les anticorps (anti-ABCD1 et anti-ABCD3) aux billes de protéine A-sépharose, à l'aide d'un agent de couplage, le diméthyle pimélimidate (protocole adapté de (Bons *et al.* 2008)). Cette étape a permis de réduire considérablement le bruit de fond habituellement observé lors de l'étude de la fraction immunoprécipitée en immunoblot. Concernant l'immunoprécipitation de la protéine ABCD2-EGFP, j'ai utilisé des billes d'agarose covalamment liées à un anticorps anti-GFP réactif en conditions natives, commercialisées par la société MBL (#D153-8).

I.2.1. Analyse des protéines co-immunoprécipitées avec ABCD2-EGFP

Afin d'isoler puis analyser les complexes impliquant la protéine ABCD2 fusionnée à l'EGFP, le lysat du clone 28.38 induit ou non, a été utilisé pour l'immunoprécipitation avec un anticorps anti-GFP covalamment lié à des billes d'agarose. Les complexes protéiques isolés

dans la fraction immunoprécipitée, ont été séparés par électrophorèse sur gel de polyacrylamide puis transférés sur membrane de PVDF. Les protéines immunoprécipitées ont ensuite été identifiées avec les anticorps d'intérêt : anti-GFP (Figure 48A), anti-ABCD1 (B) et anti-ABCD3 (C).

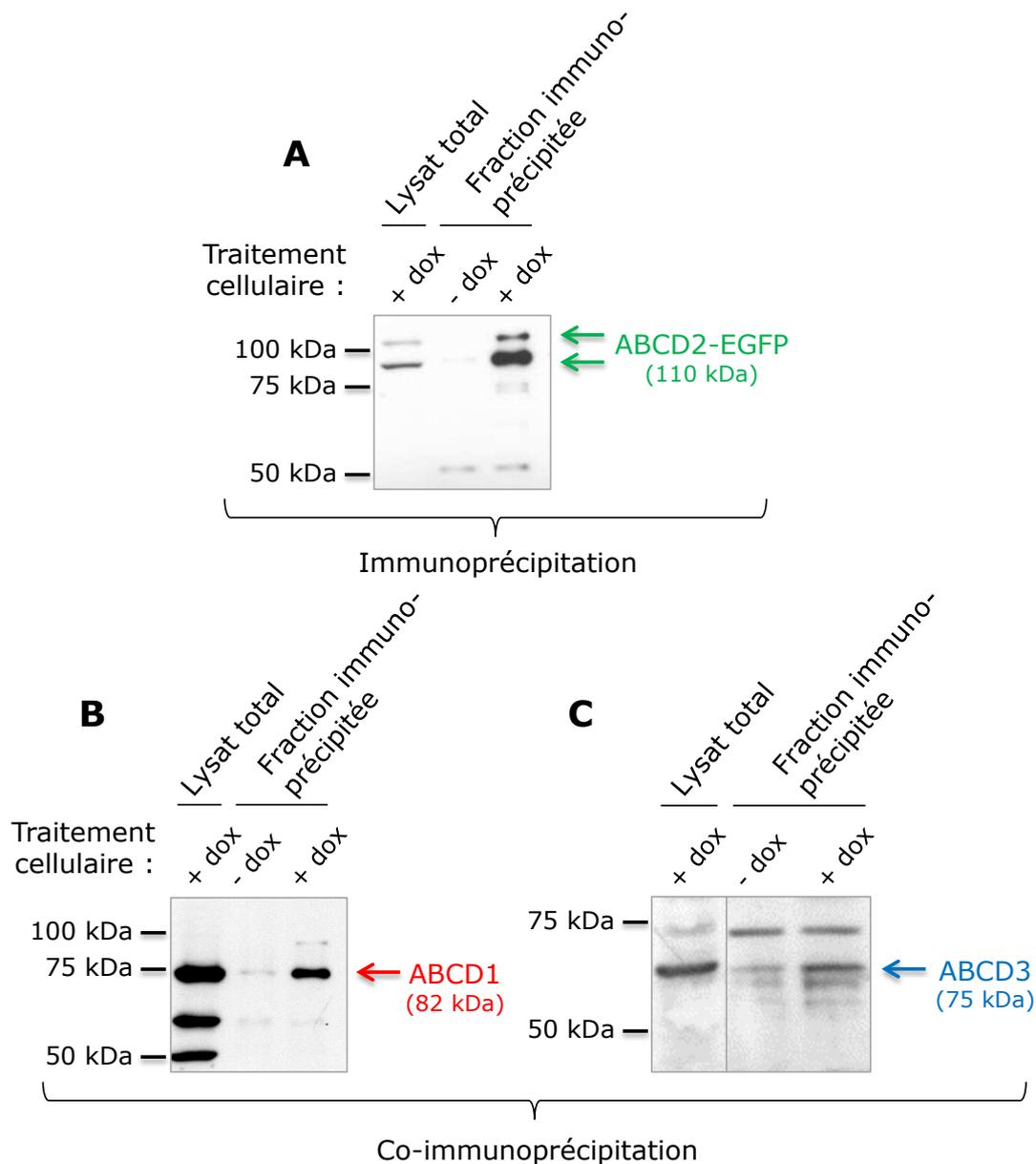


Figure 48 : Co-immunoprécipitation des protéines ABCD1 et ABCD3 avec la protéine ABCD2-EGFP grâce à l'anticorps anti-GFP.

Le clone 28.38 non induit ou induit à la doxycycline (dox) est lysé en présence de triton X-100. Le lysat protéique total (800 µg) est incubé pendant 90 minutes avec des billes d'agarose covalamment couplées à l'anticorps anti-GFP. Après plusieurs lavages des billes, la fraction immunoprécipitée est récupérée, puis la totalité est analysée en immunoblot. L'immunoprécipitation de la protéine ABCD2-EGFP est tout d'abord vérifiée à l'aide de l'anticorps anti-GFP (A). Les protéines co-immunoprécipitées sont ensuite révélées à l'aide des anticorps anti-ABCD1 (B) et anti-ABCD3 (C). Cent µg de protéines totales issues du lysat du clone 28.38 induit surexprimant ABCD2-EGFP et exprimant ABCD1 et ABCD3 au niveau basal sont également analysés.

D'après ces résultats, la protéine ABCD2-EGFP est immunoprécipitée par les billes d'agarose couplées à l'anticorps anti-GFP. Les transporteurs peroxysomaux ABCD1 et ABCD3 sont co-immunoprécipités avec ABCD2-EGFP, et ce seulement lorsque les cellules sont induites et expriment la protéine de fusion. Ainsi, ABCD2-EGFP interagit avec les deux autres transporteurs peroxysomaux ABCD1 et ABCD3 (Figure 49).

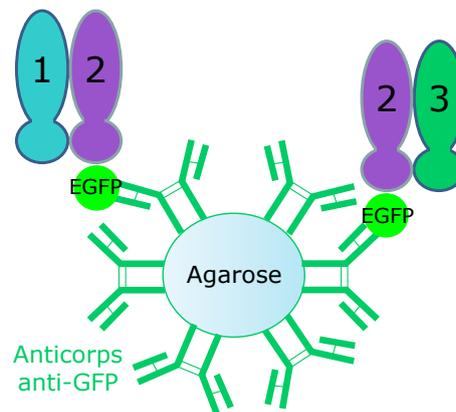


Figure 49 : Schéma hypothétique de la co-immunoprécipitation des protéines ABCD1 et ABCD3 avec l'anticorps anti-GFP, covalamment lié aux billes d'agarose (MBL #D153-8).

I.2.2. Analyse des protéines co-immunoprécipitées avec ABCD3

Afin d'isoler puis analyser les complexes impliquant la protéine ABCD3, le lysat du clone 28.38 induit ou non, a été utilisé pour l'immunoprécipitation avec un anticorps anti-ABCD3 que j'ai covalamment couplé à des billes de protéine A-sépharose. Les complexes protéiques isolés dans la fraction immunoprécipitée, ont été séparés par électrophorèse sur gel de polyacrylamide puis transférés sur membrane de PVDF. Les protéines immunoprécipitées ont ensuite été identifiées avec les anticorps d'intérêt : anti-ABCD3 (Figure 50A), anti-GFP (B) et anti-ABCD1 (C).

D'après les résultats présentés dans la Figure 50, la protéine ABCD3 est immunoprécipitée par les billes de protéine A-sépharose covalamment couplées à l'anticorps anti-ABCD3, et ce que l'on parte de lysat cellulaire induit ou non induit (Figure 50A). La protéine ABCD2-EGFP est co-immunoprécipitée avec la protéine ABCD3 (Figure 50B), de même que la protéine ABCD3 était co-immunoprécipitée avec ABCD2-EGFP (Figure 48).

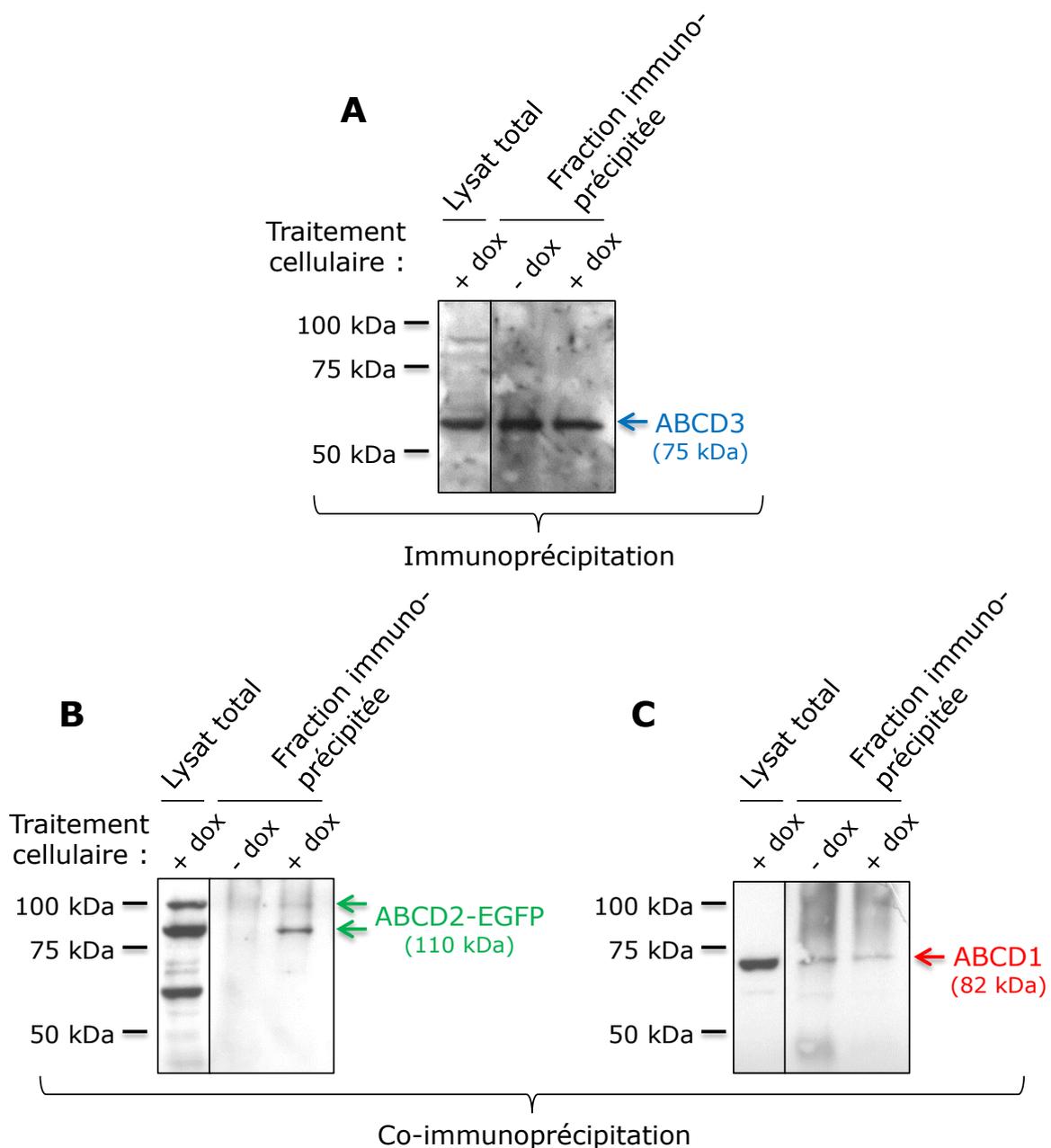


Figure 50 : Co-immunoprécipitation des protéines ABCD1 et ABCD2-EGFP avec la protéine ABCD3 grâce à l'anticorps anti-ABCD3.

Le clone 28.38 non induit ou induit à la doxycycline (dox) est lysé en présence de triton X-100. Le lysat protéique total (1,6 mg) est incubé pendant 90 minutes avec des billes de protéine A-sépharose covalamment couplées à l'anticorps anti-ABCD3. Après plusieurs lavages des billes, la fraction immunoprécipitée est récupérée, puis la totalité est analysée en immunoblot. L'immunoprécipitation de la protéine ABCD3 est tout d'abord vérifiée à l'aide de l'anticorps anti-ABCD3 (A). Les protéines co-immunoprécipitées sont ensuite révélées à l'aide des anticorps anti-GFP (B) et anti-ABCD1 (C). Cent µg de protéines totales issues du lysat du clone 28.38 induit surexprimant ABCD2-EGFP et exprimant ABCD1 et ABCD3 au niveau basal sont également analysés.

Ce résultat confirme qu'ABCD3 et ABCD2-EGFP interagissent (Figure 51). En plus de la protéine ABCD2-EGFP, ABCD1 est également co-immunoprécipitée avec ABCD3 (Figure 50C). Ainsi, ABCD3 interagirait avec ABCD1 (Figure 51).

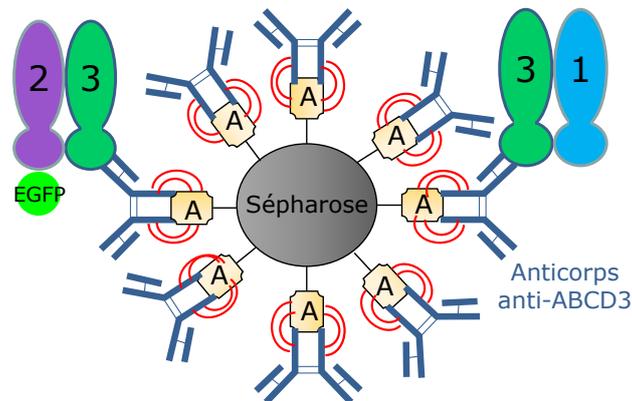


Figure 51 : Schéma illustrant la co-immunoprécipitation des protéines ABCD2-EGFP et ABCD1 avec ABCD3 grâce à l'anticorps anti-ABCD3 que j'ai covalamment lié aux billes de protéine A-sépharose. (Le lien covalent est représenté en rouge)

I.2.3. Analyse des protéines co-immunoprécipitées avec ABCD1

Afin d'isoler puis analyser les complexes impliquant la protéine ABCD1, le lysat du clone 28.38 induit ou non, a été utilisé pour l'immunoprécipitation avec un anticorps anti-ABCD1 que j'ai covalamment couplé à des billes de protéine A-sépharose. Les complexes protéiques isolés dans la fraction immunoprécipitée, ont été séparés par électrophorèse sur gel de polyacrylamide puis transférés sur membrane de PVDF. Les protéines immunoprécipitées ont ensuite été identifiées avec les anticorps d'intérêt : anti-ABCD1 (Figure 52A), anti-GFP (B) et anti-ABCD3 (non montré).

D'après les résultats, la protéine ABCD1 est immunoprécipitée par les billes de protéine A-sépharose covalamment couplées à l'anticorps anti-ABCD1, que l'on parte de lysat cellulaire induit ou non induit (Figure 52A). La protéine ABCD2-EGFP étant également retrouvée dans la fraction immunoprécipitée (Figure 52B), cela signifie qu'elle est co-immunoprécipitée avec la protéine ABCD1, de même que la protéine ABCD1 était co-immunoprécipitée avec ABCD2-EGFP (Figure 48). Ce résultat d'immunoprécipitation confirme l'interaction entre les deux protéines (Figure 53). En revanche, je n'ai pas réussi à détecter la protéine ABCD3 dans la fraction immunoprécipitée. Or d'après les résultats présentés dans la Figure 50, ABCD1 est co-immunoprécipitée avec ABCD3. Donc l'inverse devrait être vrai également. L'élément qui pourrait expliquer ce résultat est que l'anticorps anti-ABCD3 (Zymed) alors utilisé pour la révélation est peu spécifique et peu réactif envers ABCD3 de rat. Cependant, nous disposons dorénavant au laboratoire d'un nouvel anticorps polyclonal dirigé contre la protéine ABCD3

de rat, qui est relativement spécifique (Tableau 5). Il faudrait donc réitérer l'expérience afin de vérifier si la protéine ABCD3 est co-immunoprécipitée ou non avec la protéine ABCD1.

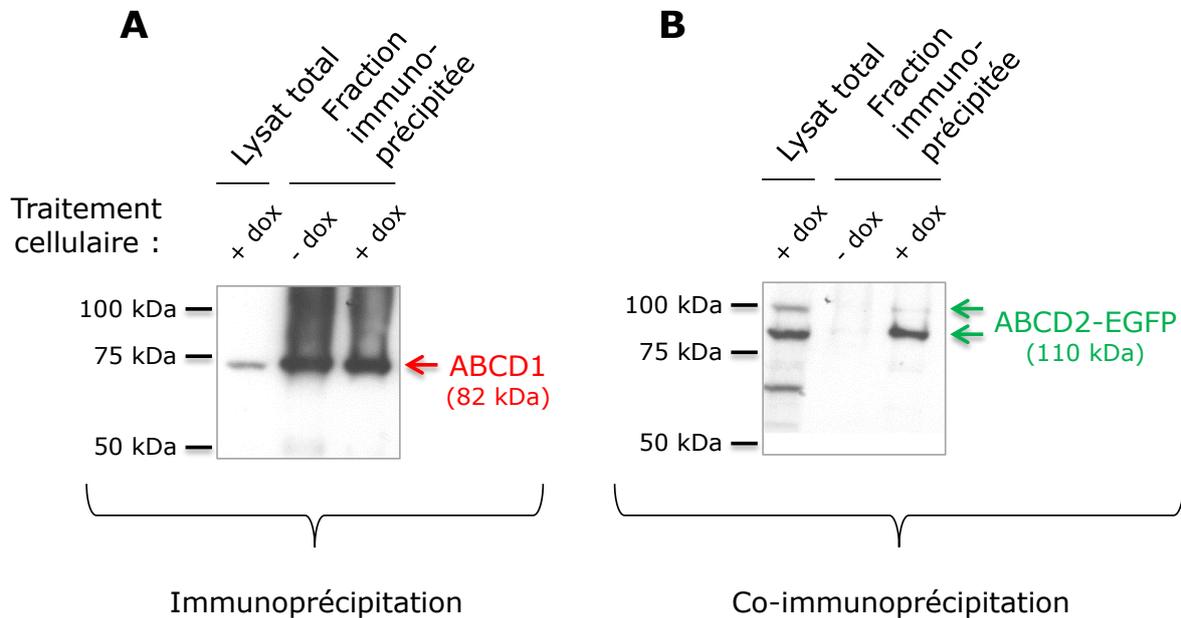


Figure 52 : Co-immunoprécipitation de la protéine ABCD2-EGFP avec ABCD1 grâce à l'anticorps anti-ABCD1.

Le clone 28.38 non induit ou induit à la doxycycline (dox) est lysé en présence de triton X-100. Le lysat protéique total (1,6 mg) est incubé pendant 90 minutes avec des billes de protéine A-sépharose covalentement couplées à l'anticorps anti-ABCD1. Après plusieurs lavages des billes, la fraction immunoprécipitée est récupérée, puis la totalité est analysée en immunoblot. L'immunoprécipitation de la protéine ABCD1 est tout d'abord vérifiée à l'aide de l'anticorps anti-ABCD1 (A). La co-immunoprécipitation de la protéine ABCD2-EGFP est ensuite observée à l'aide de l'anticorps anti-GFP (B). Cent µg de protéines totales issues du lysat du clone 28.38 induit surexprimant ABCD2-EGFP et exprimant ABCD1 et ABCD3 au niveau basal sont également analysés.

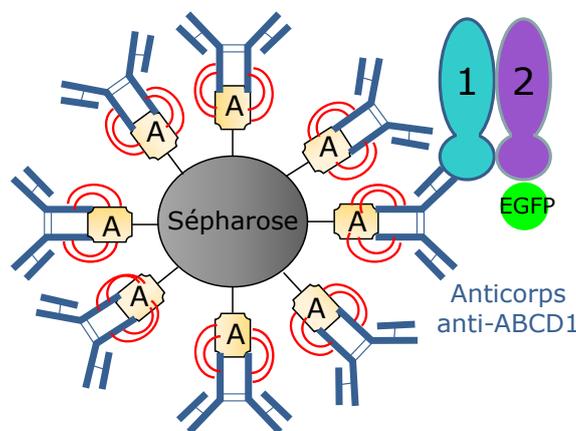


Figure 53 : Schéma illustrant la co-immunoprécipitation de la protéine ABCD2-EGFP avec ABCD1 grâce à l'anticorps anti-ABCD1 que j'ai covalentement couplé aux billes de protéine A-sépharose. (Le lien covalent est représenté en rouge)

Pour conclure, les immunoprécipitations croisées permettent de dire avec confiance qu'ABCD2-EGFP interagit avec ABCD1 et qu'ABCD2-EGFP interagit avec ABCD3 (Tableau 12). ABCD1 semble interagir avec ABCD3, bien que l'immunoprécipitation croisée n'ait pas fonctionné. Pour ce qui est d'ABCD1 et ABCD3, seule une co-immunoprécipitation a fonctionné. Au final, les trois transporteurs ABCD1, 2 et 3 interagissent les uns avec les autres au sein de la membrane peroxysomale. Pourtant, d'après ces seuls résultats de Duolink et de co-immunoprécipitations, on ne peut encore pas juger de l'importance de ces interactions et surtout dans quel contexte d'oligomérisation elles interviennent. En effet, on peut se demander à ce stade si ces transporteurs interagissent au sein de dimères, de tétramères au bien de complexes comportant d'autres protéines partenaires.

| | | Immunoprécipitation | | |
|------------------------|------------|---------------------|--------------|--------------|
| | | ABCD1 | ABCD2-EGFP | ABCD3 |
| Co-immunoprécipitation | ABCD1 | | + | + |
| | ABCD2-EGFP | + | | + |
| | ABCD3 | - | + | |

Tableau 12 : Bilan des co-immunoprécipitations réalisées sur le clone 28.38 et visant à mettre en évidence les interactions entre les transporteurs ABCD peroxysomaux.

II. OLIGOMERISATION DES TRANSPORTEURS ABCD PEROXYSSOMIAUX

D'après la littérature et d'après les études de Duolink et de co-immunoprécipitations réalisées lors de ma thèse, il apparaît fort probable que les trois transporteurs ABCD peroxysomaux soient capables de s'homo-oligomériser mais également de s'hétéro-oligomériser. Cependant, on conclut souvent sur l'homo- ou l'hétéro-dimérisation d'ABCD1, 2 et 3, sans être vraiment certains de leur statut oligomérique. Ces transporteurs sont-ils retrouvés sous forme dimérique, tétramérique, ou sous forme d'oligomères plus importants ? Une chose est sûre, ce sont au minimum des dimères, car les transporteurs ABCD peroxysomaux sont des demi-transporteurs qui doivent se dimériser pour être fonctionnels.

Afin d'étudier le statut oligomérique des transporteurs ABCD1, ABCD2 et ABCD3, deux approches complémentaires ont été utilisées : une étude par sédimentation sur gradient de sucrose, ainsi qu'une étude par électrophorèse sur gel d'acrylamide en condition native, technique plus résolutive mais également plus délicate à mettre en place. Ces deux études ont été menées sur le clone 28.38 qui surexprime la protéine ABCD2-EGFP après induction à la doxycycline.

II.1. Etude du statut oligomérique des transporteurs ABCD peroxysomaux par sédimentation sur gradient de sucrose

La sédimentation sur gradient de sucrose est une technique simple à mettre en œuvre, qui ne nécessite pas des échantillons concentrés en protéines et qui tolère l'utilisation d'anticorps peu spécifiques. Les résultats recueillis apportent des informations sur la masse moléculaire apparente des complexes protéiques dans lesquels sont contenues les protéines étudiées.

A terme, on vise deux objectifs au travers de cette étude :

1. Observer des variations du statut oligomérique des transporteurs ABCD peroxysomaux, en fonction des conditions de lyse, dénaturantes ou au contraire non dénaturantes,
2. Estimer la taille des complexes au sein desquels ABCD1, 2 et 3 interagissent.

II.1.1. Test de solubilisation des protéines

La clé du travail se situe dans l'étape de solubilisation des protéines. D'une part il faut choisir un détergent capable de dissocier correctement les complexes protéiques, comme le SDS (Sodium Dodécyl Sulfate, détergent ionique), et d'autre part il faut tester différents détergents non dénaturant capables de préserver les complexes protéiques, tels que le triton X-100, le β -DDM (DoDécyl Maltoside) ou l' α -DDM (détergents non ioniques). Cependant, la solubilisation des protéines membranaires par les détergents non dénaturants doit être mise au point. En effet, il faut veiller à les utiliser en concentration suffisante pour solubiliser entièrement les protéines membranaires, sans pour autant dissocier les complexes protéiques. C'est pourquoi avant de démarrer l'étude par sédimentation sur gradient de sucrose, différentes conditions de lyse cellulaire ont été testées, avec des concentrations croissantes en β -DDM (Figure 54).

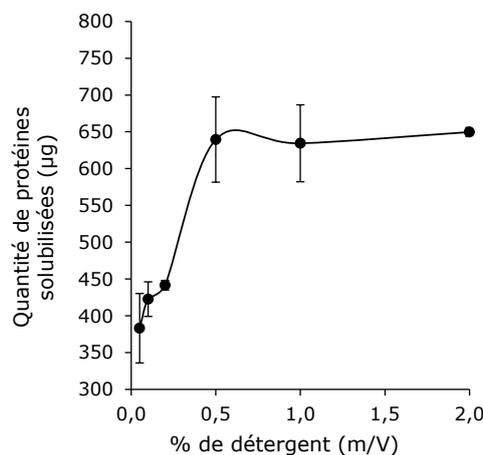


Figure 54 : Test de solubilisation des protéines totales de la cellule par le β -DDM.

La lyse a été réalisée sur le clone 28.38 avec 0,5 mL de tampon de lyse par boîte de culture de 10 cm de diamètre et à 80% de confluence (NaCl 150 mM, Tris 100 mM à pH8, β -DDM à différentes concentrations).

Le test de solubilisation des protéines avait également été réalisé avec un autre détergent non dénaturant, le Triton X-100. Quel que soit le détergent utilisé, la quantité maximale de protéines solubilisée est atteinte à partir de 0,5% de détergent dans le tampon de lyse. Pour la suite de l'étude, les cellules ont donc été lysées avec 1% de détergent non dénaturant, afin de se placer dans des conditions optimales de solubilisation des protéines membranaires.

II.1.2. Linéarité et étalonnage des gradients de sucrose

La sédimentation sur gradient de sucrose permet de fragmenter un lysat protéique selon la densité des complexes protéiques. Afin de déterminer la taille moléculaire apparente de

complexes isolés, le gradient doit être nécessairement linéaire. En revanche, il peut être monté de façon discontinue, c'est-à-dire, être réalisé en superposant plusieurs solutions de sucrose, de densités décroissantes. Après ultracentrifugation, les limites entre les différentes solutions de sucrose s'atténuent et le gradient devient en théorie linéaire. Plusieurs protocoles de montage de gradients de sucrose discontinus ont été évalués en faisant varier le nombre de solutions de sucrose superposées et les concentrations en sucrose. Le gradient retenu qui présente un bon compromis entre facilité de montage et linéarité a été obtenu à partir de 5 solutions de sucrose montées par ordre décroissant de densité : 2,5 mL 30%, 2 mL 20%, 2 mL 15%, 2 mL 10% et 2 mL 5% (Figure 55).

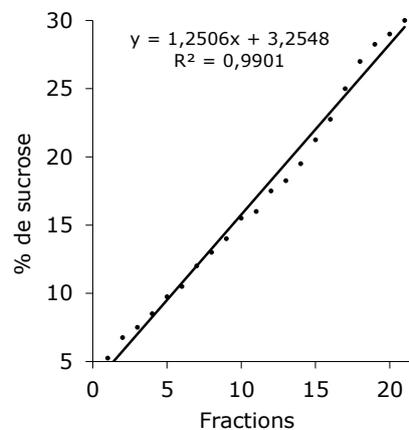


Figure 55: Linéarité, obtenue après ultracentrifugation, du gradient discontinu de sucrose 5-30%. A l'équilibre, la linéarité du gradient non chargé en protéines est confirmée par mesure de l'indice de réfraction des 22 fractions de 0,5 mL récupérées à partir du haut du gradient. Un facteur de corrélation élevé ($R^2 = 0,9901$) est obtenu.

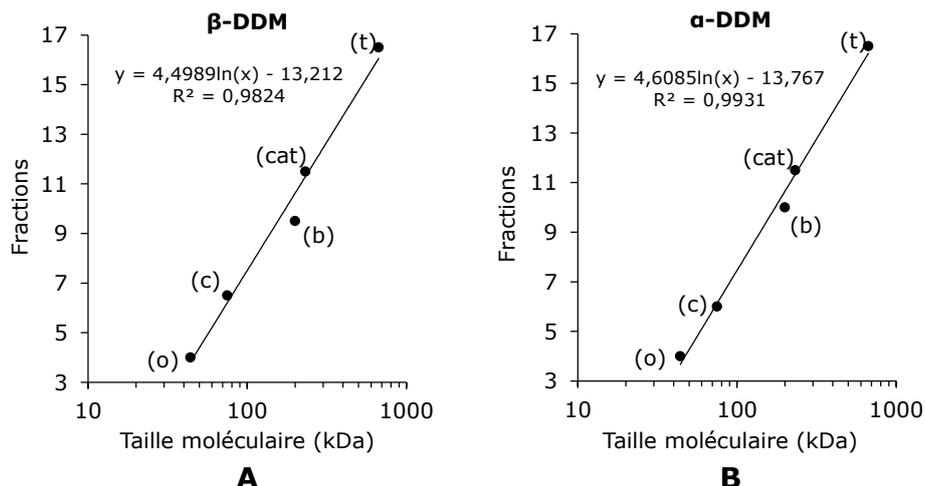


Figure 56 : Etalonnage du gradient discontinu de sucrose 5-30%. Le gradient est étalonné en β -DDM 1% (A) et en α -DDM 1% (B), par sédimentation de manière séparée de marqueurs correspondant à des protéines oligomériques (thyroglobuline (t) tétramère de 669 kDa ; catalase (cat) tétramère de 232 kDa, β -amylase (b) tétramère de 200 kDa ; conalbumine (c) de 75 kDa et ovalbumine (o) de 44 kDa). Après ultracentrifugation des différents gradients de sucrose, les marqueurs protéiques sont détectés dans les 22 fractions de 0,5 mL collectées par mesure directe de l'absorbance à 280 nm.

Le gradient de sucrose 5-30% a pu ensuite être étalonné par sédimentation de plusieurs protéines marqueurs oligomériques diluées dans du tampon de lyse en présence de β - ou d' α -DDM 1% et chacune chargée séparément sur un gradient. Les courbes d'étalonnage sont données Figure 56. L'étalonnage des gradients de sucrose est quasiment identique quel que soit le détergent non dénaturant utilisé.

II.1.3. Modification du statut oligomérique des transporteurs ABCD peroxysomaux en fonction des conditions de lyse

Le clone 28.38 surexprimant ABCD2-EGFP après induction par la doxycycline a été lysé soit en présence de SDS, un détergent ionique dénaturant qui dissocie les complexes protéiques, soit en présence d'un détergent non ionique, le Triton X-100 (résultats non montrés), le β -DDM ou l' α -DDM décrits pour maintenir les interactions protéine / protéine. Les complexes protéiques solubilisés ont ensuite été fractionnés par sédimentation sur un gradient de sucrose 5-30%. Les fractions récupérées à l'équilibre en partant du haut du gradient ont été déposées sur SDS-PAGE puis analysées en immunoblot afin de localiser ABCD1 (Figure 57A), ABCD2-EGFP (B) et ABCD3 (C).

En présence de SDS, les trois transporteurs monomériques sont retrouvés majoritairement centrés sur les fractions 6-7 pour ABCD1 et ABCD3 et 7-8 pour ABCD2-EGFP. En revanche, lorsqu'un détergent non dénaturant est utilisé pour la solubilisation, les transporteurs ABCD sont retrouvés dans des fractions beaucoup plus denses, contenant donc des complexes de plus haut poids moléculaire. Ceci est valable pour le Triton X-100 (résultats non montrés), le β -DDM et l' α -DDM (Figure 57), avec un décalage plus important obtenu avec ces deux derniers détergents. Si on compare la répartition des transporteurs ABCD peroxysomaux entre les gradients en présence de β -DDM et ceux en présence d' α -DDM, on remarque que les complexes sont mieux préservés en présence d' α -DDM. En effet, avec l' α -DDM la présence d'ABCD1, ABCD2 et ABCD3 persiste dans des fractions de plus haut poids moléculaire (Figure 57).

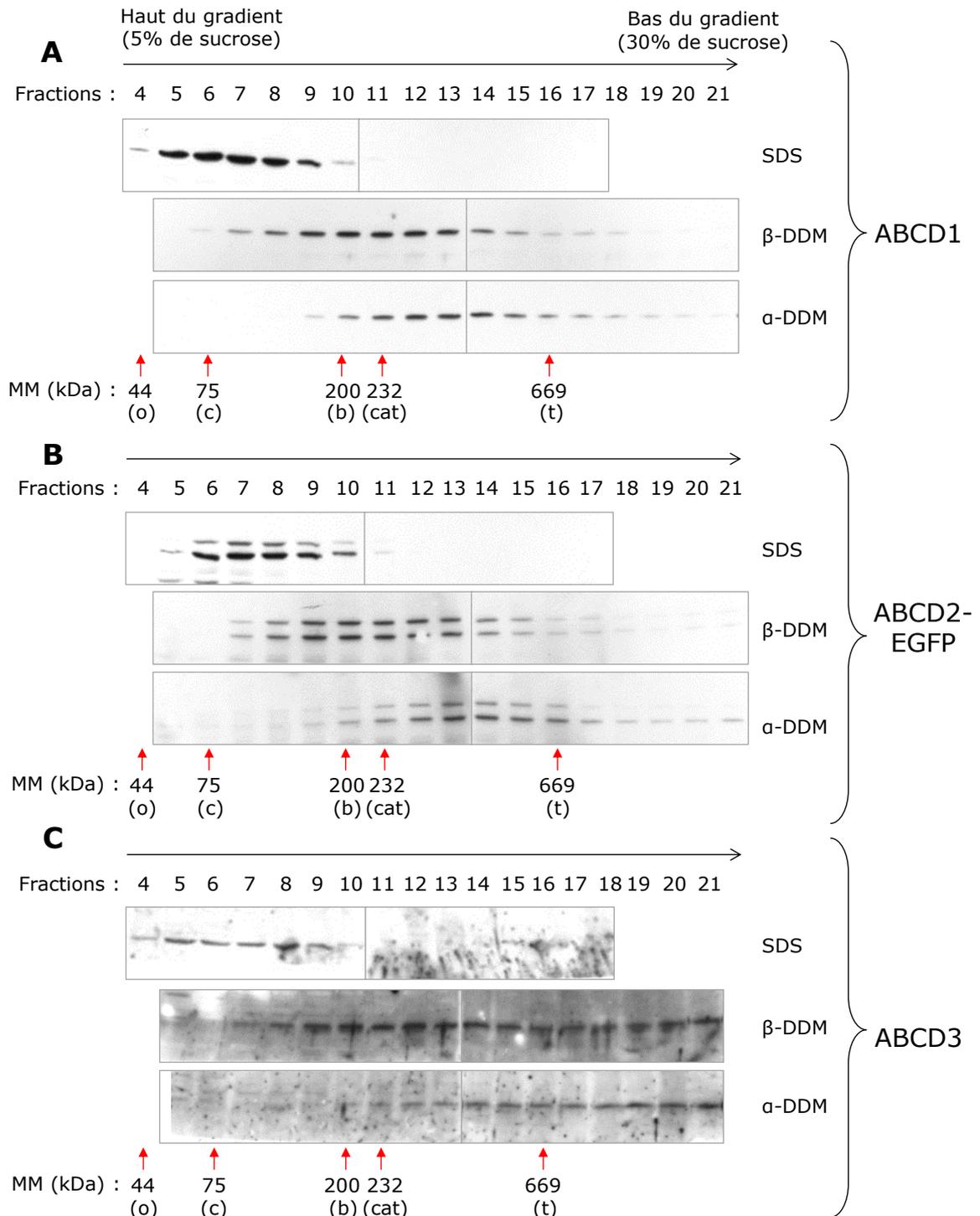


Figure 57 : Etude du statut oligomérique d'ABCD1 (A), ABCD2-EGFP (B) et ABCD3 (C) par sédimentation sur gradient de sucrose 5-30%.

Le clone 28.38 surexprimant ABCD2-EGFP suite à l'induction par la doxycycline est lysé soit en présence d'un détergent ionique qui déstabilise les interactions protéine / protéine ; le SDS 1%, soit en présence de détergent non-ionique décrit pour préserver les complexes protéiques, le β -DDM 1% ou l' α -DDM 1%. Le lysat cellulaire est chargé sur un gradient de sucrose 5-30% puis fractionné par sédimentation sur le gradient lors de l'ultracentrifugation. A l'équilibre, 23 fractions de 0,5 mL sont récupérées, déposées sur SDS-PAGE puis analysées en immunoblot. La localisation des marqueurs protéiques utilisés pour étalonner les gradients est indiquée en dessous de chaque ensemble d'immunoblots (thyroglobuline (t) 669 kDa ; catalase (cat) 232 kDa, β -amylase (b) 200 kDa ; conalbumine (c) 75k Da et ovalbumine (o) 44k Da).

II.1.4. Estimation de la taille des complexes protéiques contenant ABCD1, ABCD2-EGFP et ABCD3

Une étude par sédimentation sur gradient de sucrose est bien entendu moins précise qu'une électrophorèse sur gel d'acrylamide en conditions natives, pour estimer la taille de complexes protéiques. Néanmoins, elle permet de donner une fourchette de tailles dans laquelle situer les complexes protéiques.

Il faut noter que les protéines oligomériques utilisées lors de l'étalonnage des gradients, sont des protéines solubles. Leur masse moléculaire apparente est donc proche de leur masse moléculaire théorique. En revanche, pour les protéines membranaires qui sont solubilisées, leur masse moléculaire apparente comprend non seulement la masse des protéines, mais également la masse moléculaire des micelles de détergent. De façon approximative, la masse moléculaire d'une micelle d' α -DDM est de 40 kDa, celle du β -DDM de 60 kDa et enfin celle du SDS de 18 kDa.

Afin d'estimer la taille des complexes moléculaires dans lesquels se retrouvent les transporteurs ABCD peroxysomaux, j'ai réalisé une analyse densitométrique de la répartition d'ABCD1 (Figure 58A), ABCD2-EGFP (B) et ABCD3 (C) dans les fractions issues des gradients de sucrose réalisés en SDS, en β -DDM et en α -DDM. D'après l'analyse densitométrique, il semblerait qu'à la suite d'une lyse en β -DDM, ABCD1, ABCD2-EGFP et ABCD3 soient majoritairement retrouvées dans des complexes de 100 à 350 kDa, qui pourraient correspondre à des dimères. En revanche, après une lyse en α -DDM, ABCD1 et ABCD2-EGFP sont retrouvées dans des fractions de poids moléculaires supérieurs à des dimères, correspondant à des complexes de 200 à 600 kDa (Figure 58 A et B). Les deux transporteurs seraient donc présents dans la membrane peroxysomale sous une forme oligomérique supérieure à des dimères. Concernant ABCD3, sa distribution dans le gradient de sucrose après une lyse en α -DDM ne suit pas exactement celle d'ABCD1 et d'ABCD2-EGFP. Comme pour les deux autres demi-transporteurs, ABCD3 est retrouvée dans des fractions contenant des complexes protéiques de masse moléculaire supérieure à des dimères. En revanche, une part importante de la protéine est en plus observée dans les fractions de très hauts poids moléculaires, jusqu'à la dernière fraction du gradient (Figure 58). Il est difficile de conclure sur une forme oligomérique d'ABCD3 qui semblerait supérieure à celle d'ABCD1 et ABCD2-EGFP. Il pourrait d'avantage s'agir d'agrégats.

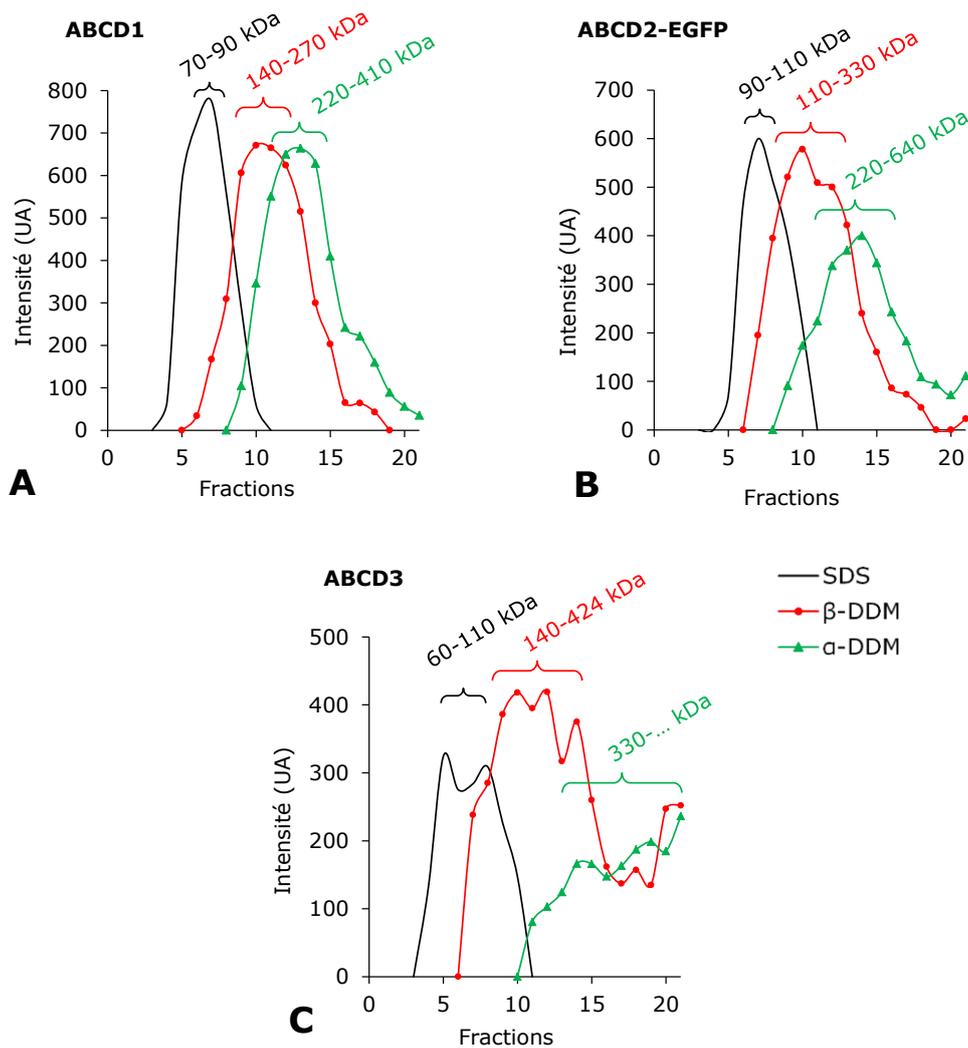


Figure 58 : Analyse densitométrique de la répartition d'ABCD1 (A), ABCD2-EGFP (B) et ABCD3 (C) dans les fractions issues des gradients de sucrose 5-30%. Le clone 28.38 surexprimant ABCD2-EGFP suite à l'induction par la doxycycline est lysé soit en présence de SDS 1%, soit de β - ou d' α -DDM 1%.

II.2. Etude du statut oligomérique des transporteurs ABCD peroxysomaux par gel d'électrophorèse en conditions natives

L'étude du statut oligomérique des transporteurs ABCD peroxysomaux par sédimentation sur gradients de sucrose a permis de montrer que ces transporteurs sont présents dans des complexes moléculaires de taille supérieure à des dimères. Afin de préciser leur état oligomérique, nous avons opté pour l'électrophorèse sur gel d'acrylamide en conditions non dénaturantes. Ce type d'électrophorèse permet de séparer les complexes protéiques en fonction de leur masse moléculaire, et surtout d'identifier par la suite les protéines qui entrent dans la composition des complexes grâce à une migration dénaturante réalisée dans une deuxième dimension (Figure 59).

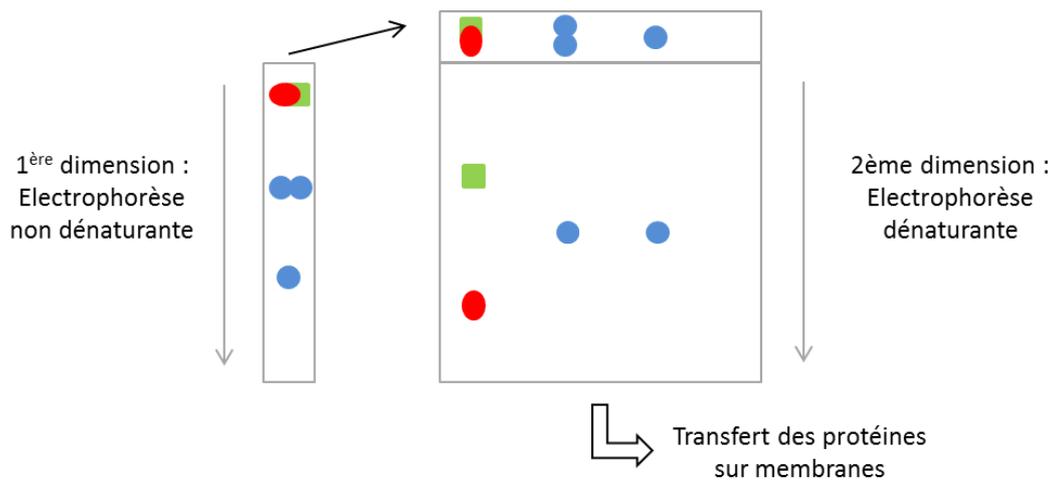


Figure 59 : Schéma illustrant le principe d'une électrophorèse bidimensionnelle (2D).

Lors de la 1^{ère} dimension, les complexes protéiques sont séparés en condition native en migrant dans un gel de polyacrylamide ; la seconde dimension permet de séparer les constituants protéiques des complexes en condition dénaturante, en présence de SDS.

II.2.1. Préparation de fractions enrichies en protéines membranaires et en peroxyosomes

L'électrophorèse sur gel d'acrylamide en conditions non dénaturantes est une technique très délicate qui nécessite notamment des échantillons concentrés en protéines d'intérêt. C'est pourquoi j'ai enrichi mes échantillons en purifiant les membranes totales ou bien les peroxyosomes, à partir du clone 28.38 induit à la doxycycline.

Concernant la préparation des membranes totales, les cellules reprises dans un tampon hypo-osmotique ont été éclatées grâce à un homogénéisateur de type Dounce (espace entre le renflement du piston et la paroi du mortier adapté pour également éclater les organites), puis les membranes totales ont été culotées par ultracentrifugation. Pour la préparation des fractions enrichies en peroxyosomes, les cellules ont également été reprises dans un tampon hypo-osmotique puis éclatées dans un homogénéisateur de type Dounce, mais cette fois-ci l'espace entre le renflement du piston et la paroi du mortier est adapté pour maintenir les organites intacts. La fraction peroxyosomale contenant en théorie les peroxyosomes intacts (fraction contaminée par les mitochondries légères et les lysosomes) est ensuite récupérée par centrifugations différentielles. L'enrichissement des échantillons en protéine ABCD2-EGFP est présenté dans la Figure 60.

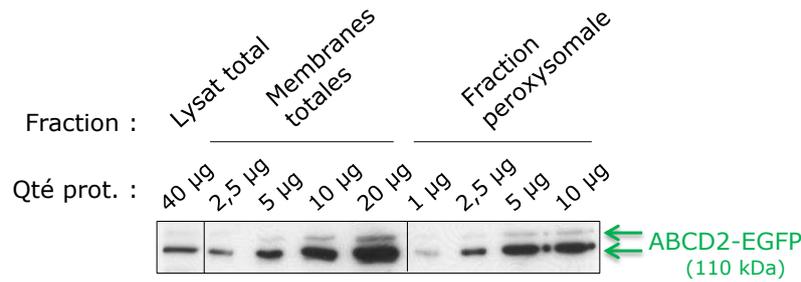


Figure 60 : Enrichissement en protéines ABCD2-EGFP dans la préparation de membranes totales et dans la fraction enrichie en peroxysomes, obtenues à partir du clone 28.38 induit à la doxycycline.

D'après une analyse densitométrique réalisée sur l'immunoblot, la préparation de membranes totales présente un enrichissement en protéine ABCD2-EGFP d'environ 10 fois par rapport au lysat total (Figure 60, piste 1), tandis que la fraction peroxysomale est enrichie de 15 à 20 fois.

Les échantillons à déposer sur gels natifs seront donc préparés à partir des membranes totales et des peroxysomes purifiés, et les complexes protéiques seront solubilisés en présence d' α -DDM. Ce détergent non ionique a déjà été utilisé lors de l'étude du statut oligomérique des transporteurs ABCD peroxysomaux par sédimentation sur gradient de sucrose. D'après les résultats que nous avons obtenus (Figure 58), l' α -DDM est le détergent non dénaturant le plus approprié pour préserver l'intégrité de nos complexes protéiques.

Contrairement à l'étude par sédimentation sur gradient de sucrose, Les protéines ne sont pas solubilisées à partir de cellules, mais à partir de membranes (totales ou peroxysomales). Il a donc fallu déterminer à nouveau, quelle concentration de détergent utiliser afin que l'étape de solubilisation de nos ABCDs soit optimale. Pour cela, la fraction enrichie en peroxysomes (1 µg/µL) est mise en présence de différentes concentrations d' α -DDM. Après solubilisation des protéines, les préparations ont été centrifugées 10 min à 20 000g afin de culoter les éventuels agrégats. Les protéines contenues dans le surnageant (protéines solubles et solubilisées) et dans le culot ont ensuite été analysées en immunoblot avec les anticorps anti-ABCD1 (Figure 61A), anti-GFP (B) et anti-ABCD3 (C). D'après les résultats obtenus, la totalité d'ABCD2-EGFP et d'ABCD1 sont solubilisées à partir de 0,2% d' α -DDM dans le tampon de lyse. La solubilisation d'ABCD3 ne suit pas exactement le même profil que celle d'ABCD2-EGFP et d'ABCD1. En effet, quelle que soit la concentration d' α -DDM dans le tampon de lyse, la protéine n'est jamais solubilisée de manière totale. Le maximum de solubilisation d'ABCD3 (60-70%) est atteint avec 0,2% d' α -DDM dans le tampon de solubilisation.

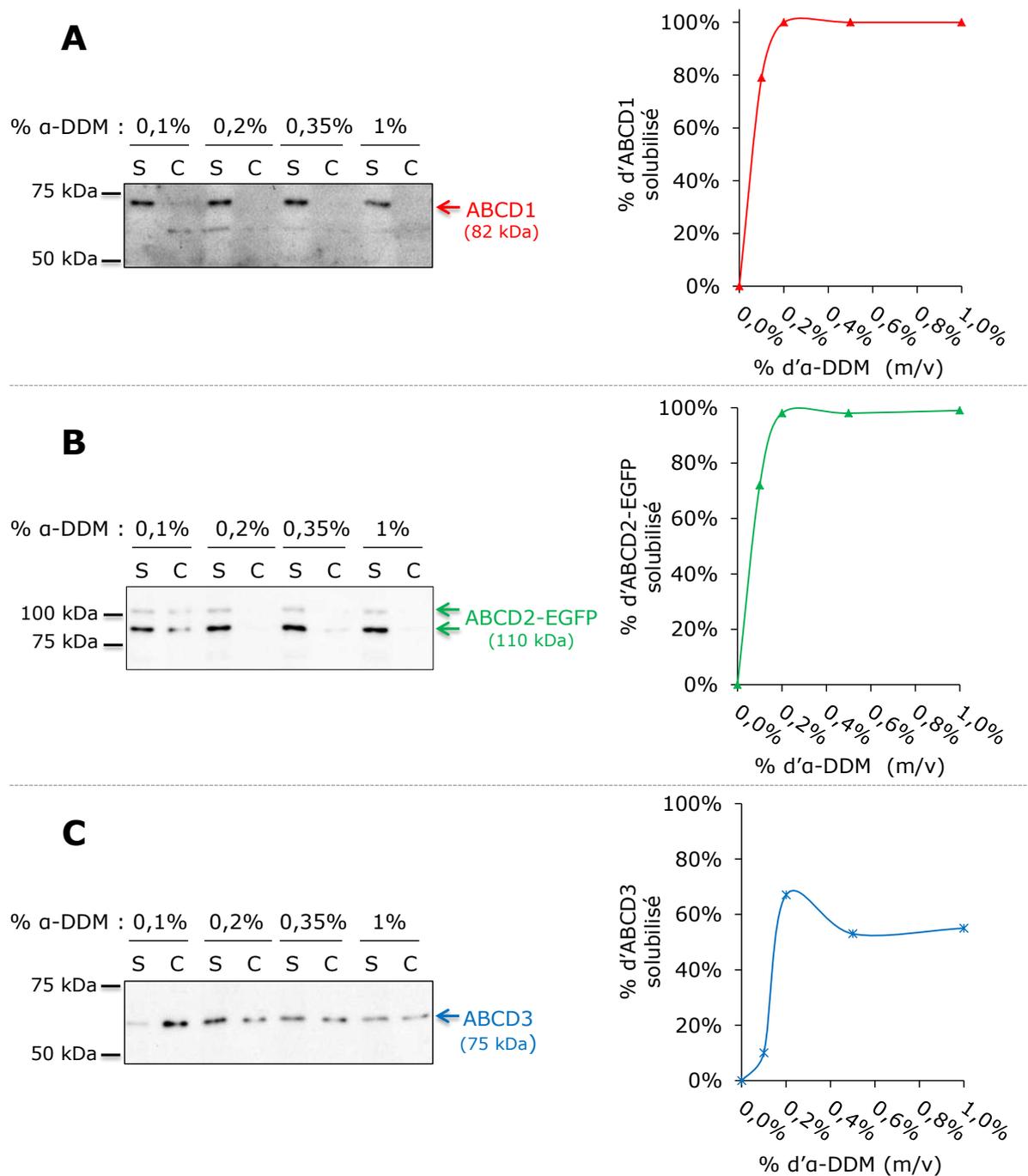


Figure 61 : Etude de la solubilisation d'ABCD1 (A), d'ABCD2-EGFP (B) et d'ABCD3 (C), à partir de la fraction enrichie en peroxyosome, en fonction de la concentration en α -DDM utilisée (de 0,1% à 1% ; (m/v)).

Après 20 min de solubilisation à 4°C, puis 10 min de centrifugation à 20 000g, les protéines solubilisées sont contenues dans le surnageant (S), tandis que les protéines non solubilisées, ou agrégats, sont récupérées dans le culot (C). Les fractions solubles (S) et non solubles (C) sont ensuite déposées sur SDS-PAGE puis analysées en immunoblot. Les graphiques obtenus par analyse densitométrique des immunoblots représentent le pourcentage de protéines solubilisées en fonction du pourcentage d' α -DDM utilisé.

II.2.2. Electrophorèse en conditions natives

Plusieurs protocoles d'électrophorèse native existent dans la littérature, dont le plus répandu est le « Blue Native PAGE » qui consiste à réaliser une électrophorèse native en présence de bleu de Coomassie (R-250), ajouté dans les échantillons protéiques ainsi que dans le tampon de migration. Cette molécule chargée négativement se fixe sur les complexes protéiques et les charge négativement sans les perturber, facilitant alors leur migration dans le gel. Les premiers tests de gel bleu natif se sont malheureusement révélés infructueux. Le gel bleu natif est en général utilisé pour des protéines purifiées et pour lesquelles le transfert ultérieur sur membrane de PVDF ne s'avère pas nécessaire. Dans notre cas, le transfert doit avoir lieu pour pouvoir ensuite détecter nos protéines d'intérêt par immunoblot et même si la fixation du bleu de Coomassie est donnée pour être réversible dans certaines conditions, nos membranes restent colorées en bleu, ce qui peut gêner la reconnaissance de l'épitope par les anticorps utilisés lors de la révélation des membranes. Une alternative à l'utilisation du bleu de Coomassie consiste à ajouter du Dériphat (lauryl- β -iminodipropionate) dans le tampon de migration (Peter *et al.* 1991). Il s'agit d'un détergent qui préserve l'intégrité des complexes protéiques tout en les chargeant négativement facilitant, tout comme le bleu de Coomassie, leur migration dans le gel. Cette variante a déjà été utilisée pour mettre en évidence l'oligomérisation du transporteur ABCA1 (Trompier *et al.* 2006). Le protocole décrit par Peter and Thornber en 1991, a été modifié par l'utilisation d'un tampon de migration à la cathode composé de Tris-Histidine. Ce tampon a été décrit pour améliorer la migration des protéines basiques (Niepmann *et al.* 2006). Nos transporteurs ABCD peroxysomaux possèdent en effet, des points isoélectriques théoriques relativement basiques (pHi de 8,74 pour ABCD1, pHi de 8,44 pour ABCD2-EGFP et pHi de 9,32 pour ABCD3).

Lors des premières électrophorèses natives en présence de Dériphat (DNE, « Deriphath Native Electrophoresis »), j'ai testé différentes conditions de préparation des échantillons, afin d'optimiser la migration de nos complexes protéiques. Les solubilisations ont été réalisées en présence de 0,2% ou 1% d' α -DDM et différentes quantités de protéines ont été déposées sur le gel natif : 10 μ g de protéines membranaires et 1 μ g ou 5 μ g de protéines peroxysomales. Après migration sur la nuit à 4°C, les protéines ont été transférées sur membrane de PVDF, ultérieurement révélées par l'anticorps anti-GFP (Figure 62A), puis par l'anticorps anti-ABCD1 (B).

D'après les résultats obtenus, seul le dépôt de 5 µg de protéines peroxysomales solubilisées en présence de 0,2% d'α-DDM permet une migration correcte des protéines ABCD2-EGFP et ABCD1 en conditions native. Ainsi, dans ces conditions, ABCD2-EGFP (110 kDa) est retrouvée dans une complexe moléculaire d'environ 480 kDa qui pourrait correspondre à un tétramère (Figure 62A). Concernant ABCD1 qui présente une masse moléculaire théorique de 82 kDa, la protéine est non seulement retrouvée dans un complexe protéique aux alentours de 400 kDa compatible avec la forme tétramérique, mais également dans un complexe d'environ 200 kDa compatible avec la forme dimérique (Figure 62B).

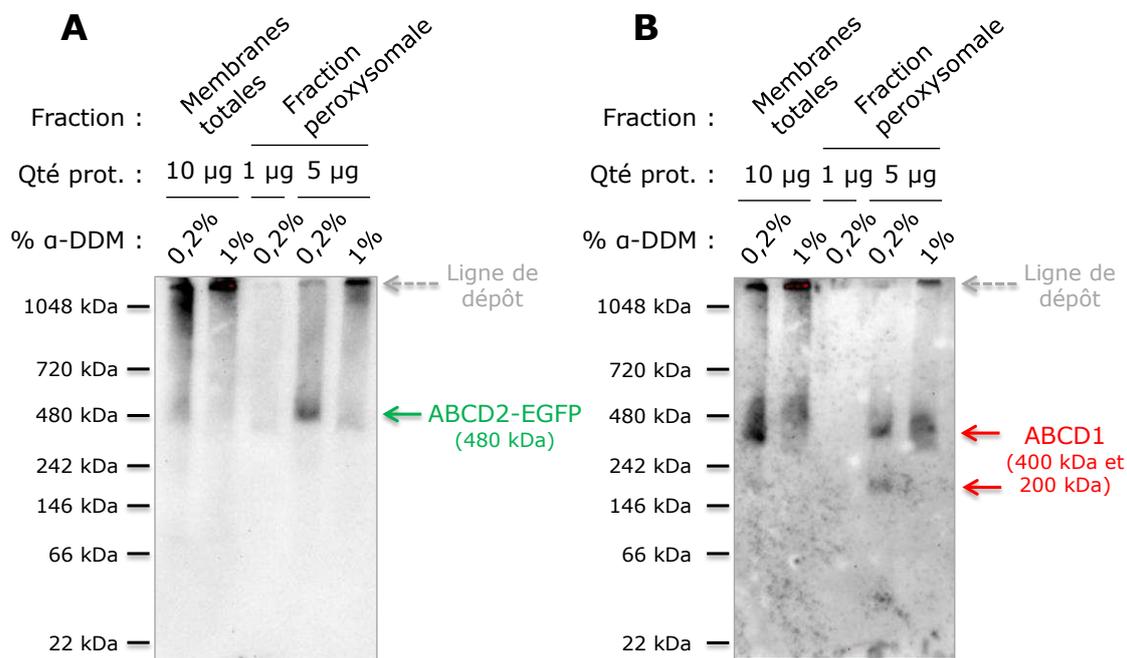


Figure 62 : Etude du statut oligomérique d'ABCD2-EGFP (A) et d'ABCD1 (B) par électrophorèse sur gel d'acrylamide en condition non dénaturante.

Les échantillons déposés sur le gel sont préparés à partir de membranes totales ou d'une fraction peroxysomale, issus du clone 28.38 induit à la doxycycline. Les protéines sont solubilisées en présence d'α-DDM à 0,2% ou 1%. Une quantité (qté) de 10 µg de protéines membranaires est déposée sur gel, contre 1 et 5 µg de protéines peroxysomales. Après migration, les protéines sont transférées sur membrane de PVDF, puis révélées à l'aide de l'anticorps anti-GFP (A) et l'anticorps anti-ABCD1 (B).

Après ces premiers résultats, j'ai cherché à affiner la concentration d'α-DDM utilisée lors de la lyse, afin d'optimiser la migration d'ABCD2-EGFP et ABCD1 en condition native. Les échantillons préparés à partir de la fraction peroxysomale ont été solubilisés avec des concentrations croissantes d'α-DDM : 0,1% ; 0,2% ; 0,35% ; 0,5% et 1%. Cinq µg de protéines peroxysomales ont été déposés sur gel. Après migration, les protéines ont été transférées sur membrane de PVDF, révélées par l'anticorps anti-GFP (Figure 63A), puis par l'anticorps anti-ABCD1 (B).

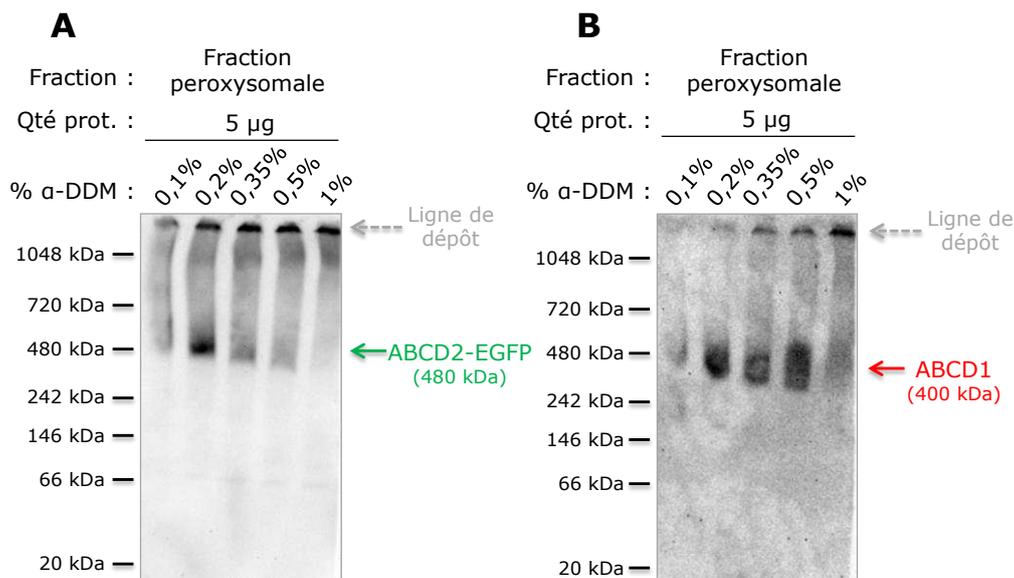


Figure 63 : Etude du statut oligomérique d'ABCD2-EGFP (A) et d'ABCD1 (B) par électrophorèse sur gel d'acrylamide en conditions non dénaturantes.

Les échantillons déposés sur le gel sont préparés à partir d'une fraction peroxysomale issue du clone 28.38 induit à la doxycycline. Les protéines sont solubilisées en présence de concentrations croissantes d'α-DDM (0,1% à 1%). Une quantité (qté) de 5 µg de protéines peroxysomales est déposée sur gel. Après migration, les protéines sont transférées sur membrane de PVDF, puis révélées à l'aide de l'anticorps anti-GFP (A) et de l'anticorps anti-ABCD1 (B).

Les résultats obtenus sont identiques à ceux de l'électrophorèse présentée précédemment (Figure 62). La solubilisation des protéines peroxysomales avec 0,2% d'α-DDM reste la meilleure condition pour faire migrer correctement nos complexes protéiques. ABCD2-EGFP est de nouveau retrouvée dans un complexe moléculaire d'environ 480 kDa (Figure 63A), tandis qu'ABCD1 est retrouvée dans un complexe d'environ 400 kDa (Figure 63B). Cependant, les résultats obtenus lors d'une troisième électrophorèse native, réalisée dans des conditions identiques, confirment qu'ABCD1 est retrouvée dans deux complexes de taille différente : majoritairement dans un complexe d'environ 400 kDa, mais également dans un complexe d'environ 200 kDa (résultats non montrés).

D'après la première dimension non dénaturante, on peut d'ores et déjà supposer qu'ABCD1 et ABCD2-EGFP sont majoritairement compris dans des complexes distincts puisque le signal correspondant à ABCD1 ne se superpose pas à celui d'ABCD2-EGFP (Figure 64). L'interaction entre les deux transporteurs, visualisée précédemment par co-immunoprécipitation, serait alors minoritaire. La réalisation d'une deuxième dimension dénaturante est absolument nécessaire afin d'identifier les partenaires des transporteurs ABCD1 et ABCD2. Plusieurs essais d'électrophorèses bidimensionnelles ont été réalisés. Ils ont permis de séparer en conditions natives, puis dénaturantes, les marqueurs correspondant à

des protéines oligomériques solubles. La tâche s'avère plus compliquée concernant les protéines ABCD1 et ABCD2, hydrophobes et impliquées dans des complexes protéiques de haut poids moléculaire. Bien que leur migration en conditions non dénaturantes soit au point, il a été impossible de les faire migrer en conditions dénaturantes, les 2 protéines restant immobilisées dans la bandelette de gel natif.

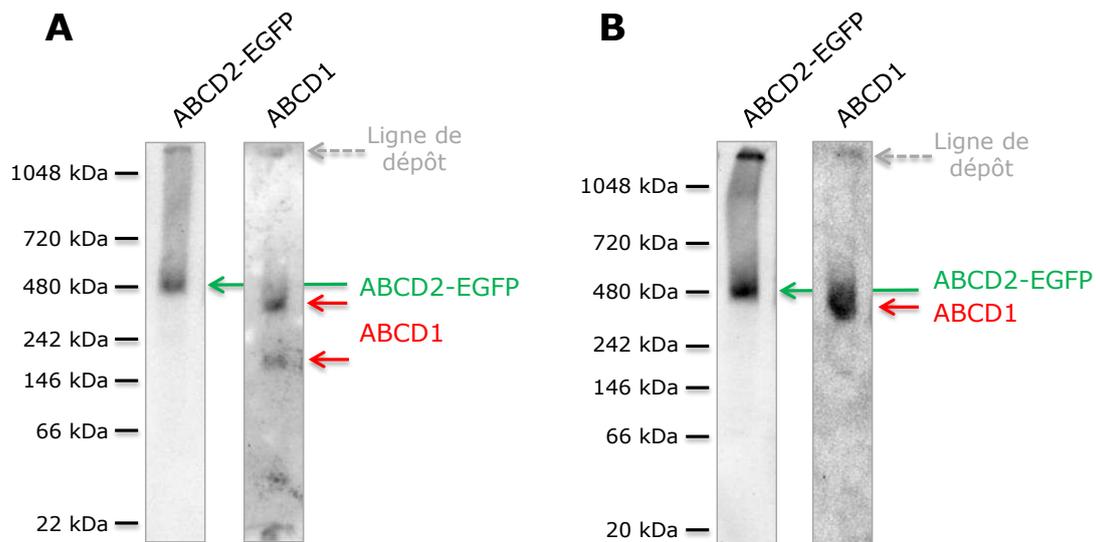


Figure 64: Alignement des protéines ABCD2-EGFP et ABCD1 séparées sur gel d'électrophorèse d'acrylamide en condition native.

Pour chaque alignement, les immunoblots correspondent à la même piste, dans laquelle avaient été déposés 5 µg de protéines peroxysomales solubilisées dans 0,2% d' α -DDM. L'alignement de gauche est issu des immunoblots présentés dans la Figure 62, tandis que l'alignement de droite reprend les immunoblots présentés dans la Figure 63.

Pour conclure, les résultats obtenus par électrophorèse non dénaturante sont en accord avec ceux obtenus précédemment par sédimentation sur gradient de sucrose. Les transporteurs ABCD peroxysomaux sont retrouvés dans des complexes protéiques de taille supérieure à de simples dimères et qui pourraient tout à fait correspondre à des tétramères.

Ces résultats obtenus par électrophorèse native, ainsi que ceux obtenus par co-immunoprécipitation, sédimentation sur gradient de sucrose et *in vivo* par Duolink, vont prochainement faire l'objet d'une publication qui traitera du statut oligomérique des transporteurs ABCD peroxysomaux.

III. DISCUSSION

Dans le cadre de ma thèse, un des objectifs était de préciser l'état oligomérique d'ABCD2, et plus généralement des transporteurs ABCD peroxysomaux. Pour répondre à cet objectif, plusieurs techniques couramment utilisées dans l'étude de l'oligomérisation des transporteurs ABC ont été mises en place : la co-immunoprécipitation, la sédimentation sur gradient de sucrose et l'électrophorèse en conditions natives. Nous avons également utilisé la méthode de « Duolink *in situ* Proximity Ligation Assay », afin de mettre en évidence la proximité entre les transporteurs ABCD peroxysomaux dans les membranes.

III.1. Interaction entre les transporteurs ABCD peroxysomaux

La technique de « Duolink *in situ* Proximity Ligation Assay », combinée à la co-immunoprécipitation nous a permis de montrer que dans le clone 28.38, la protéine ABCD2-EGFP interagit avec ABCD1 et ABCD3. De plus, le demi-transporteur ABCD1 pourrait interagir avec ABCD3. Ces résultats viennent confirmer ceux publiés dans plusieurs articles qui suggèrent que les transporteurs ABCD peroxysomaux interagissent les uns avec les autres (Liu *et al.* 1999; Smith *et al.* 1999; Tanaka *et al.* 2002; Guimaraes *et al.* 2004; Hillebrand *et al.* 2007; Hillebrand *et al.* 2012). Cependant, à part l'article de Guimaraes *et al.* qui n'exclut pas la possibilité d'une oligomérisation des transporteurs ABCD peroxysomaux supérieure aux dimères, bien souvent les publications concluent sur leur homo- ou hétéro-dimérisation. Or la co-immunoprécipitation, le FRET, ou encore le BRET, ne peuvent juger que de l'interaction, directe ou non, entre deux protéines cibles...

La co-immunoprécipitation est très dépendante des anticorps utilisés lors de l'immunoprécipitation. En effet, en se liant à son épitope, celui-ci peut altérer les interactions protéine-protéine et gêner la co-immunoprécipitation de protéines. Lors de l'immunoprécipitation de la protéine ABCD2-EGFP par l'anticorps anti-GFP, la totalité de la protéine est immunoprécipitée, et ce quel que soit la quantité de lysat protéique utilisée. Les protéines ABCD1 et ABCD3 sont co-immunoprécipitées avec ABCD2-EGFP, mais pas en totalité. Cette observation pourrait être liée à la déstabilisation des interactions entre ABCD2-EGFP et les deux autres transporteurs ABCD peroxysomaux, par l'anticorps anti-GFP utilisé pour l'immunoprécipitation. Mais elle pourrait tout autant traduire le fait qu'ABCD2-EGFP appartient à plusieurs types de complexes protéiques, dans lesquels ABCD1 et ABCD3 sont

parfois absents. Ces hypothèses pourraient également s'appliquer à ABCD1. En effet, comme pour ABCD2-EGFP, l'immunoprécipitation d'ABCD1 est totale, tandis qu'ABCD2-EGFP est co-immunoprécipitée seulement en partie.

III.2. Oligomérisation des transporteurs ABCD peroxysomaux

D'après nos résultats obtenus par sédimentation sur gradient de sucrose, après une lyse en SDS, les trois transporteurs ABCD peroxysomaux sont retrouvés centrés sur les fractions 6 à 8. En revanche, lorsqu'un détergent non dénaturant est utilisé pour la solubilisation (β -DDM ou α -DDM), les transporteurs ABCD sont retrouvés dans des fractions beaucoup plus denses, contenant donc des complexes de plus haut poids moléculaire. Ce décalage est très certainement lié à l'état d'oligomérisation des protéines qui varie en fonction des propriétés, dénaturantes ou non, du détergent. Cependant, les protéines membranaires solubilisées sont contenues dans des micelles de détergent, qui modifient plus ou moins leur masse moléculaire apparente. De façon approximative, la masse moléculaire d'une micelle d' α -DDM est de 40 kDa, celle du β -DDM de 60 kDa et enfin celle du SDS de 18 kDa. Le décalage observé entre le gradient réalisé en présence de SDS et les deux gradients réalisés en β - et α -DDM pourrait donc être influencé par la taille des micelles de détergent utilisé pour lyser les cellules. Toutefois, on peut remarquer qu'après une lyse en α -DDM, les demi-transporteurs ABCD1, ABCD2 et ABCD3 sont retrouvés dans des fractions de plus haut poids moléculaire qu'après une lyse en β -DDM. Pourtant, la masse moléculaire d'une micelle d' α -DDM est de 40 kDa, tandis que la masse moléculaire d'une micelle de β -DDM de 60 kDa. Ceci nous conforte dans l'idée que les transporteurs ABCD peroxysomaux seraient présents dans la membrane peroxysomale sous une forme oligomérique supérieure à des dimères, et que les complexes sont mieux préservés en présence d' α -DDM. Néanmoins, afin d'écartier définitivement le doute lié aux détergents, il est prévu de réaliser une sédimentation sur gradient de sucrose à partir de cellules surexprimant un dimère ABCD chimérique. Les cellules seront lysées à l'aide de β -DDM ou d' α -DDM, puis les complexes oligomériques seront dissociés par ajout d'urée 3 M (Guimaraes *et al.* 2004). La localisation du dimère chimérique dans le gradient à l'équilibre devrait confirmer ou non, que nos résultats sont uniquement liés à l'oligomérisation des transporteurs ABCD peroxysomaux et non au détergent utilisé pour solubiliser les complexes protéiques.

Au cours de ma thèse, afin de déterminer si les oligomères avaient une valeur fonctionnelle, nous avons tenté d'évaluer l'influence de la présence des AGTLC sur l'oligomérisation des transporteurs ABCD peroxysomaux. Afin de tester cette hypothèse, le clone 28.38 surexprimant ABCD2-EGFP a été cultivé 15h en présence ou non, de C24:0 ou de C26:0, avant d'être lysé à l'aide d' α -DDM, puis fractionné par sédimentation sur gradient de sucrose. Que les cellules aient été cultivées en présence d'AGTLC ou non, la répartition d'ABCD1 et d'ABCD2-EGFP est identique dans les gradients de sucrose (résultats non montrés). Les protéines sont retrouvées dans des fractions recueillant des complexes protéiques de haut poids moléculaire (200 kDa – 600 kDa). Le prétraitement des cellules avec des AGTLC n'induirait pas la formation de complexes oligomériques plus importants. Avec le recul, il aurait été préférable de lyser les cellules à l'aide de β -DDM. En effet, d'après nos résultats, le β -DDM préserve moins bien nos complexes que l' α -DDM. Or les AGTLC pourraient être impliqués dans la stabilisation d'ABCD1 et d'ABCD2-EGFP sous forme oligomérique. Dans ce cas, la répartition d'ABCD1 et d'ABCD2-EGFP dans le gradient de sucrose en présence de β -DDM, devait être identique à leur répartition dans le gradient de sucrose en présence d' α -DDM.

Nos résultats d'électrophorèse en conditions natives, réalisée en présence d' α -DDM, concordent avec ceux obtenus par sédimentation sur gradient de sucrose : ABCD1 et ABCD2-EGFP sont retrouvés dans des complexes d'environ 200 et 400 kDa pour ABCD1 et d'environ 480 kDa pour ABCD2-EGFP. Ceci laisse présager qu'ABCD1 et ABCD2-EGFP seraient présents sous forme de tétramères dans la membrane peroxysomale, mais également sous forme dimérique pour ABCD1. Aucun résultat satisfaisant n'a été obtenu au sujet du statut oligomérique d'ABCD3. Contrairement à ABCD1 et ABCD2-EGFP, la solubilisation d'ABCD3 à partir d'une fraction enrichie en peroxysome n'est jamais totale, malgré l'utilisation de concentrations croissantes d' α -DDM (0,2% à 1%). D'après une publication récente, le demi-transporteur ABCD3 serait contenu dans des radeaux lipidiques résistants au Triton X-100, ce qui pourrait expliquer notre difficulté à le solubiliser (Woudenberg *et al.* 2010).

**DISCUSSION
GENERALE ET
CONCLUSION**

I. L'IDENTIFICATION DES SUBSTRATS TRANSPORTES PAR LES DIMERES CHIMERIQUES ET LES LIMITES DU MODELE CELLULAIRE

Notre stratégie d'étude basée sur l'utilisation de dimères chimériques s'est révélée efficace puisqu'elle nous a permis de montrer pour la première fois que les transporteurs ABCD1 et ABCD2 sont fonctionnels quel que soit leur agencement dimérique, et qu'ils transportent du C26:0, du C26:1, et du C24:1. Seulement, dans l'état actuel, l'identification des substrats s'est limitée aux AGTLC qui s'accumulent dans les lipides des fibroblastes déficients en *ABCD1*, à savoir, le C26:0, le C26:1, le C24:1. Pourtant, les transporteurs ABCD peroxysomaux sont susceptibles d'importer de nombreux substrats (les AG polyinsaturés, comme le DHA ou ses précurseurs ; les AG méthylés, comme l'acide pristanique et l'acide phytanique ; les AG dicarboxyliques, ou encore les alcools gras), et il sera donc nécessaire d'élargir notre investigation. De plus, l'identification de substrats par mesure de l'activité de β -oxydation peroxysomale des substrats est également limitée, car seulement certains AG radiomarqués sont disponibles : AG saturés (C20:0, C22:0, C24:0 et C26:0), AG monoinsaturés (C18:1, C20:1 et C22:1), AG polyinsaturés n-3 (précurseurs du DHA : C18:3, C20:5 et C22:4), AG polyinsaturés n-6 (C18:2, C20:4, C22:4, C22:5 et C24:4), alcool gras (docosanol) (société ARC « American Radiolabeled Chemicals »). Pour contourner ce problème, il existe une méthode alternative de mesure de β -oxydation peroxysomale dans des fibroblastes, qui n'est pas basée sur l'utilisation d'AG radiomarqués (Kemp et al. 2004). Cette méthode alternative non radioactive, utilise des AG marqués au deutérium, plus largement commercialisés que les AG radiomarqués (société « Larodan Fine Chemicals »).

Mais comment poursuivre l'investigation des substrats transportés par les dimères chimériques dans notre modèle cellulaire ?

La première piste à suivre consiste à augmenter la précision dans l'analyse lipidique, en ciblant le dosage des substrats dans une classe de lipides. En effet, il a été montré que dans le cerveau des patients atteints d'X-ALD (dans la matière blanche et les plaques de démyélinisation), les lipides totaux contiennent 5 à 7 fois plus de C26:0 que les lipides totaux d'un cerveau normal (Wilson et al. 1993). Excepté le phosphatidylinositol, toutes les classes de lipides accumulent du C26:0 (les cérébrosides, la PC, la sphingomyéline ou encore les sulfatides), mais l'accumulation la plus importante est retrouvée dans les esters de cholestérol (de 25 fois dans la matière blanche, jusqu'à 200 fois dans les plaques de démyélinisation !).

Le C24:0 est également décrit pour s'accumuler chez les patients atteints d'X-ALD. Or dans notre lignée de fibroblastes issus d'un patient atteint d'X-ALD, aucune accumulation de C24:0 n'est observée dans les lipides totaux. Cependant, il est fort probable qu'il s'accumule dans une classe de lipides, mais que cette accumulation ne soit pas suffisante pour être observée dans les lipides totaux. Ainsi, afin d'évaluer si les dimères chimériques transportent du C24:0, on pourrait cibler son dosage, dans une classe de lipide connue pour accumuler les AGTLC chez les patients atteints d'X-ALD, telle que les esters de cholestérol. Afin d'augmenter la précision dans l'analyse lipidique, on pourrait envisager de doser les AG plus longtemps après la transfection. En effet, les AG sont en perpétuelle dynamique dans les cellules, mais le renouvellement des AGTLC dans les lipides membranaires est un processus vraisemblablement très lent. En effet, la diminution des niveaux de C26:0, dans les lipides totaux de fibroblastes de patients X-ALD présentant des mutations conformationnelles sur *ABCD1* a été mesurée après 4 semaines de culture à 30°C (Zhang et al. 2011). Ainsi, la surexpression des dimères chimériques dans les fibroblastes déficients en *ABCD1*, pourrait avoir un effet plus visible sur les niveaux en AG contenus dans les lipides, à long terme. Dans l'état actuel, cette piste ne peut pas être envisagée car les cellules sont transfectées de façon transitoire. Afin d'observer les effets des dimères chimériques à plus long terme, il faudrait réaliser des transfections stables.

La seconde piste à suivre pour poursuivre l'investigation des substrats dans notre modèle cellulaire, consiste à prétraiter les fibroblastes (transfectés ou non) avec les substrats potentiels (AG polyinsaturés, AG méthylés...), afin de forcer leur accumulation dans les membranes. C'est cette méthode qui a d'ailleurs été utilisée lors de la caractérisation fonctionnelle d'*ABCD2* développée au laboratoire, mais uniquement avec du C24:0 et du C26:0 (Genin et al. 2011), et qui pourrait être complétée par le dosage des substrats potentiels dans les esters de cholestérol, toujours dans l'optique d'augmenter la précision dans les analyses lipidiques.

Pourtant malgré ces pistes stratégiques, l'identification des substrats transportés par les dimères chimériques incluant *ABCD3* risque d'être compliquée. En effet, les fibroblastes cutanés humains expriment le transporteur *ABCD3* à un niveau élevé, tandis que d'après une étude par northern-blot, ils expriment peu *ABCD2* (Holzinger et al. 1997), et que la protéine *ABCD1* est absente des cellules. Même si le faible niveau d'expression d'*ABCD2* n'a pu être confirmé au niveau protéique, à cause de l'absence d'anticorps réactif en immunoblot, cela

n'est pas très important, tout du moins vis-à-vis du C26:0, et peut-être également vis-à-vis des autres AG. En effet, la protéine ABCD2 ne jouerait qu'un rôle mineur dans la β -oxydation résiduelle du C26:0 observée dans les fibroblastes déficients en *ABCD1* (Wiesinger et al. 2013). Dans ces cellules, la β -oxydation résiduelle du C26:0 serait principalement médiée par la protéine ABCD3, avec cependant une efficacité plus faible que la protéine ABCD1. La surexpression des protéines chimériques incluant ABCD3 devra être suffisamment élevée pour que l'on puisse observer une différence dans la composition lipidique, entre les fibroblastes transfectés et les fibroblastes non transfectés. Afin de s'affranchir de ce problème, la stratégie consisterait à diminuer l'expression endogène d'ABCD3 dans les cellules, grâce à la technique d'interférence ARN, mais en veillant toutefois à ce que l'extinction du gène ABCD3 n'entrave pas l'expression des dimères chimériques incluant ABCD3. En effet, l'interférence ARN est basée sur la dégradation de l'ARNm d'un gène cible, suite à son interaction avec un petit ARN interférant dont la séquence est spécifique du gène cible. Ainsi, il ne faudrait pas que l'ARN interférant spécifique d'ABCD3, interagisse avec l'ARNm codant un dimère chimérique contenant ABCD3 et le dégrade.

Quelles que soient les améliorations apportées à notre modèle cellulaire, le transport des substrats pris en charge par les dimères chimériques restera évalué de façon indirecte, par la mesure de β -oxydation du substrat, ou son dosage dans les lipides. Afin d'identifier de façon directe les substrats des transporteurs ABCD peroxysomaux, l'utilisation de vésicules membranaires reconstituées à partir de peroxysome purifiés ou bien l'utilisation de peroxysomes purifiés a déjà été tentée, mais sans succès (équipe de Wanders RJ, résultats non publiés). En effet, les membranes peroxysomales sont très fragiles et perméables une fois purifiées (Antonenkov et al. 2004). La purification des peroxysomes nécessite l'utilisation d'un tampon hypoosmotique pour la lyse des cellules, auquel les peroxysomes sont très sensibles. Malgré plusieurs améliorations apportées au protocole de purification, comme l'utilisation de polyéthylène glycol 1500 servant à protéger les peroxysomes de la pression osmotique, les peroxysomes purifiés ne sont toujours pas intacts (Antonenkov et al. 2004). Ainsi, contrairement aux mitochondries, il n'est pas possible de travailler à partir de peroxysomes purifiés pour étudier le transport de substrats à travers sa membrane.

Depuis quelques années, plusieurs transporteurs ABC eucaryotes ont été reconstitués dans des liposomes (Wang et al. 2008; Herget et al. 2009; Zehnpfennig et al. 2009; Telbisz et al. 2013). Cette méthode est à ce jour la seule qui permet d'identifier de façon directe les substrats des

transporteurs ABC. Il serait envisageable de reconstituer nos dimères chimériques dans des liposomes, afin d'identifier leur substrat, voir même de déterminer l'affinité avec laquelle un dimère prend en charge un substrat. D'ailleurs, la reconstitution d'ABCD1 et d'ABCD2 dans des liposomes a déjà été réalisée, mais malheureusement, une fois insérés dans les liposomes, les deux transporteurs peroxysomaux perdaient leur fonctionnalité, vue l'absence d'activité ATPase mesurée (basale ou en présence d'AGTLC) (Morita et al. 2006). Pourtant, plusieurs études basées sur la reconstitution de protéines membranaires peroxysomales dans des liposomes se sont révélées concluantes. Cette approche a ainsi permis d'identifier le substrat du transporteur peroxysomal PMP34 (nucléotides) (Visser et al. 2002) et de mettre en évidence plusieurs transporteur peroxysomaux : un transporteur facilitant le passage du phosphate peroxysomal (Visser et al. 2005), un transporteur d'isocitrate et d' α -cétoglutarate (Visser et al. 2006), un transporteur de sels biliaires (Visser et al. 2007), et enfin un transporteur de CoA, FAD et NAD⁺ codé par le gène SLC25A17 (Agrimi et al. 2012). A ce jour, toutes les tentatives de reconstitution des transporteurs ABCD peroxysomaux (en homo- ou hétéro-dimères) dans des liposomes, ont échoué (Wanders et al. 2007).

Cependant, les substrats des transporteurs ABCD peroxysomaux sont très hydrophobes et sont probablement pris en charge par des protéines solubles qui les véhiculent dans le cytosol jusqu'aux transporteurs, ou qui les récupèrent à l'intérieur du peroxysome après leur transport. La reconstitution de transporteurs ABCD peroxysomaux dans des liposomes reste donc envisageable, mais l'évaluation du transport de substrats pourrait être limitée par l'absence des protéines nécessaires à leur prise en charge. Cependant, la mesure de la stimulation de l'activité ATPase des transporteurs en présence d'un AG, pourrait tout de même permettre d'identifier leurs substrats, bien que ce soit indirect. En effet, si l'activité ATPase d'un transporteur est stimulée par un AG, suppose que le cycle catalytique s'est déclenché suite à la fixation de cet AG sur le transporteur.

II. L'EXPLORATION DE L'AGENCEMENT OLIGOMERIQUE DES TRANSPORTEURS ABCD PEROXYSOMAX ET LES LIMITES LIEES A L'UTILISATION DE DETERGENTS

Notre travail sur l'oligomérisation des transporteurs ABCD peroxysomaux, combinant la sédimentation sur gradient de sucrose et l'électrophorèse en conditions natives, envisage pour

la première fois l'hypothèse qu'ABCD1, 2, et 3, sont capables de s'oligomériser dans des complexes de taille supérieure à de simples dimères.

Les techniques que nous avons développées afin de mettre en évidence l'agencement oligomérique des transporteurs ABCD peroxysomaux, étaient basées sur l'utilisation de détergents non dénaturants. En effet, les transporteurs ABC sont des protéines très hydrophobes et l'utilisation de détergents « doux » est nécessaire pour les extraire des membranes tout en préservant leur statut oligomérique. Le β -DDM utilisé lors de nos expériences, est un détergent non ionique connu pour sa bonne efficacité d'extraction et pour préserver la structure et la fonction des protéines membranaires (Prive 2007), et dont l'utilisation est largement répandue dans les études structurales et fonctionnelles des transporteurs ABC (Denis et al. 2004; Ravaud et al. 2006; Trompier et al. 2006; Infed et al. 2011; Ellinger et al. 2013). Toutefois, on ne peut pas ignorer le risque d'agrégation des protéines que les détergents peuvent induire, mais également leur effet potentiel sur la masse moléculaire apparente des complexes protéiques. La méthode de « cross-link » suivie d'une étude par spectrométrie de masse, constitue une alternative intéressante pour étudier les interactions entre protéines dans les membranes, puisqu'elle ne nécessite pas l'utilisation de détergents (Sinz 2006). Cette méthode est basée sur la stabilisation *in vivo* des interactions protéine-protéine, grâce à des agents chimiques capables d'établir un pontage covalent entre les chaînes latérales des acides aminés. Une fois stabilisé dans la membrane, le complexe d'intérêt est isolé (par SDS-PAGE ou immunoprécipitation), puis analysé par spectrométrie de masse. Cette méthode permet non seulement d'évaluer la taille et la composition de complexes protéiques, mais elle présente l'avantage non négligeable de faciliter l'étude de complexes transitoires, en stabilisant les interactions. La mise en place d'une telle technique dans le cadre de l'étude structurale des transporteurs ABCD peroxysomaux ne se limiterait donc pas à confirmer leur agencement oligomérique, mais permettrait également d'identifier leurs partenaires protéiques non ABC. Néanmoins, si la réaction n'est pas bien contrôlée, le pontage covalent des acides aminés peut lier deux protéines qui sont simplement proches dans la cellule, mais qui n'interagissent pas.

D'autres techniques qui n'utilisent pas de détergent, permettent de mettre en évidence les interactions protéine-protéine. Par exemple, les techniques de FRET et de BRET, sont deux techniques basées sur l'émission de fluorescence dans les cellules, seulement lorsque deux protéines cibles interagissent. Ces deux techniques ont d'ailleurs été utilisées afin de mettre en

évidence l'homodimérisation et l'hétérodimérisation d'ABCD1 et d'ABCD3 (Hillebrand et al. 2007; Hillebrand et al. 2012). Cependant, ces techniques nécessitent au préalable de cibler deux partenaires potentiels, et ne permettent pas de définir la taille du complexe au sein duquel interagissent les 2 protéines. Dans la même idée, la méthode de « split ubiquitin », qui est la méthode du double-hybride adaptée aux protéines membranaires, permet de détecter les interactions protéine-protéine dans leur environnement natif cellulaire. Cette méthode est basée sur l'utilisation des fragments N- et C-terminaux de l'ubiquitine, fusionnés à deux protéines dont veut montrer l'interaction, et d'un gène rapporteur. Le fragment C-terminal de l'ubiquitine est également fusionné à une protéine, capable d'activer la transcription du gène rapporteur. L'interaction spécifique entre les deux protéines permet la reconstitution de l'ubiquitine, et entraîne le clivage de l'activateur de la transcription qui peut alors entrer dans le noyau et activer la transcription du gène rapporteur. Contrairement au FRET et au BRET, cette technique permet d'identifier tous les partenaires potentiels (criblage de banques), mais tout comme le FRET et le BRET, elle ne permet pas de tirer de conclusion sur leur agencement.

Finalement, le plus souvent, l'étude du statut oligomérique d'une protéine reste basée sur l'utilisation de détergents non dénaturants. Récemment, une nouvelle classe de détergents, appelés calixarènes, a été élaborée spécifiquement pour étudier la structure des protéines membranaires, et en particulier des transporteurs ABC. D'après les premiers travaux publiés, réalisés avec ces détergents, les calixarènes permettent d'extraire le transporteur BmrA (« Bacillus multidrug resistance ATP protein »), en préservant sa structure et sa fonction (Matar-Merheb et al. 2011). Nous avons eu l'occasion au laboratoire, de tester ces calixarènes sur nos transporteurs ABCD peroxysomaux. D'après nos premiers résultats, la lyse du clone 28.38 avec certains calixarènes, permet d'extraire les protéines ABCD1 et ABCD2-EGFP des membranes peroxysomales, en les maintenant sous forme oligomérique. En effet, suite à une électrophorèse en conditions natives réalisée à partir du clone 28.38, les deux protéines sont retrouvées dans un complexe d'environ 480 kDa pour ABCD2-EGFP, et d'environ 400 kDa pour ABCD1. Ces résultats correspondent parfaitement avec ceux obtenus précédemment, lorsque les cellules étaient lysées en présence d' α -DDM.

III. LA DYNAMIQUE D'INTERACTION DES TRANSPORTEURS ABCD PEROXYSOMAUX

Grâce à mon travail de thèse, l'agencement oligomérique des transporteurs ABCD peroxysomaux se précise mais se complique aussi un peu : en plus des dimères, la présence de complexes homo- et hétéro-oligomériques est dorénavant à envisager. Pour autant, plusieurs points restent à préciser.

➤ Tout d'abord, comment évolue l'agencement oligomérique des transporteurs ABCD peroxysomaux dans la cellule, depuis leur synthèse dans le cytosol, jusqu'au transport de substrats ? (Figure 65)

D'une façon générale, les protéines membranaires peroxysomales ne sont pas des protéines membranaires classiques car elles sont synthétisées sur des ribosomes libres, dans le cytosol. Leur mPTS, signal d'adressage au peroxysome, situé à leur extrémité N-terminale est reconnu par PEX19 qui jouerait un rôle de protéine chaperonne et empêcherait l'agrégation des protéines membranaires au cours de leur synthèse. La dimérisation des demi-transporteurs ABCD peroxysomaux permettrait de stabiliser les monomères, mais on ne sait pas vraiment à quel moment intervient cette dimérisation : est-ce avant leur adressage au peroxysome, ou une fois qu'ils sont insérés dans la membrane ? La transcription-traduction *in vitro* d'ABCD3 en présence de PEX19 aboutit à la formation d'un complexe d'environ 100 kDa qui contiendrait une protéine ABCD3 liée à une protéine PEX19 (Kashiwayama et al. 2005). D'après les auteurs, l'interaction de PEX19 avec ABCD3 serait co-translationnelle et permettrait de maintenir ABCD3 sous forme soluble avant son intégration dans le peroxysome. Par contre, la présence du complexe de 100 kDa signifie que PEX19 interagit avec le monomère d'ABCD3 et non pas avec le dimère. Cela suppose donc que la dimérisation d'ABCD3 n'aurait pas lieu avant son insertion dans la membrane du peroxysome. Lors de la synthèse du transporteur ABC entier CFTR (ABCC7) dans le réticulum endoplasmique, les 2 TMD sont tout d'abord retrouvés dissociés dans la membrane du réticulum, puis s'associent et acquièrent ensuite leur conformation finale (Lukacs et al. 2012). Sur le même modèle, les demi-transporteurs ABCD peroxysomaux pourraient être insérés dans la membrane peroxysomale sous forme de monomère, grâce au complexe PEX19/PEX3, puis rapidement se stabiliser par dimérisation au sein de la membrane, ce qui permettrait d'achever leur repliement dans la bonne conformation. Cette hypothèse est en accord avec le fait que le système de contrôle qualité peroxysomal reconnaît les problèmes conformationnels d'ABCD1

seulement après sa dimérisation, en intervenant probablement dans la membrane du peroxysome (Takahashi et al. 2007). En effet, au niveau cellulaire, la co-expression de formes mutantes d'ABCD1 (mutants ABCD1 dégradés chez les patients X-ALD) avec la forme « wild type » d'ABCD1 aboutit à la dégradation de la protéine ABCD1.

Les demi-transporteurs ABD peroxysomaux, stabilisés sous forme de dimères pourraient ensuite s'oligomériser dans la membrane peroxysomale. L'oligomérisation des transporteurs ABC pourrait faire intervenir des protéines non ABC, comme CAP70 qui favorise la dimérisation et la conductance d'ABCC7 (CFTR) (Wang et al. 2000). D'après deux articles, les transporteurs ABCD1 et ABCD3 interagiraient avec plusieurs protéines. Du côté peroxysomal, ABCD1 interagirait avec FATP2, une synthétase impliquée dans l'activation des AGTLC (Makkar et al. 2006). Du côté cytosolique, ABCD1 et ABCD3 interagiraient notamment avec FATP4, une synthétase impliquée dans l'activation et le transport des AGTLC (Hillebrand et al. 2012). Ces synthétases, également impliquées dans le transport des lipides, pourraient favoriser l'oligomérisation des transporteurs ABCD peroxysomaux. Afin de tester cette hypothèse, il serait intéressant d'étudier le statut oligomérique d'ABCD1, 2 et 3, dans des cellules, ou chez des souris, déficientes en *FATP4* (Herrmann et al. 2003; Jia et al. 2007), ou encore chez des souris déficientes en *FATP2* (Heinzer et al. 2003; Falcon et al. 2010). Plusieurs études d'interaction protéine-protéine avec une approche globale (techniques de co-fractionnement et de double-hybride), ont permis d'identifier de nombreux partenaires potentiels des transporteurs ABCD peroxysomaux (<http://thebiogrid.org/106717/table/homo-sapiens/abcd1.html>). Afin de confirmer ces résultats, il est prévu de réaliser une analyse par spectrométrie de masse, des complexes impliquant ABCD1 et ABCD2-EGFP, isolés par électrophorèse en conditions natives. L'étude devrait être réalisée sur la plateforme protéomique de Dijon (<http://www.clipproteomic.fr/>), à partir du clone 28.38 surexprimant ou non la protéine ABCD2-EGFP, et devrait permettre de confirmer certains partenaires des transporteurs ABCD peroxysomaux, ainsi que de découvrir de nouveaux partenaires.

Le transporteur ABCA1 est un transporteur entier de la membrane plasmique (2 NBD et 2 TMD), impliqué dans transport de lipides. De façon intéressante, le transporteur ABCA1, présent sous forme dimérique dans la membrane plasmique, s'oligomériserait suite à la fixation et l'hydrolyse d'ATP (Trompier et al. 2006). La dissociation du transporteur ABCA1 interviendrait après le transport du substrat. Ainsi, l'oligomérisation des transporteurs ABC pourrait être liée au cycle catalytique et au cycle de transport et aurait donc un rôle

fonctionnel. En suivant cette hypothèse, on pourrait imaginer que les transporteurs ABCD soient présents sous forme dimérique dans la membrane à l'état basal, et que leur interaction avec les protéines solubles (FATP4) qui apportent les substrats, puissent induire et/ou stabiliser la formation d'oligomères nécessaires au transport des lipides dans le peroxysome. Une fois les substrats à l'intérieur du peroxysome, les complexes oligomériques se dissocieraient, et les transporteurs ABCD peroxysomaux seraient de nouveau sous forme dimérique. Puisque des dimères chimériques de transporteurs ABC entiers (CFTR) sont fonctionnels (4NBD et 4 TMD) (Zerhusen et al. 1999), on pourrait envisager de vérifier si les dimères de demi-transporteurs ABCD sont fonctionnels seuls ou associés par deux, en créant des constructions plasmidiques codant des tétramères chimériques de demi-transporteurs ABCD...

➤ Ensuite, quel(s) facteur(s) contrôle(nt) l'agencement oligomérique des transporteurs ABCD peroxysomaux dans la membrane peroxysomale ?

D'après nos résultats, ABCD1 et ABCD2 sont fonctionnels quel que soit leur agencement dimérique. Ils sont donc susceptible de s'homo- et de s'hétérodimériser dans les cellules. On peut vraisemblablement supposer que les niveaux d'expression de chaque transporteur jouent un rôle important dans leur dimérisation. Si on prend en compte les profils d'expression en miroir d'ABCD1 et d'ABCD2, il semble plus probable qu'*in vivo* l'association des deux demi-transporteurs en hétérodimère soit rare. Cependant, l'induction d'ABCD2 dans un tissu riche en ABCD1 (comme le foie), pourrait aboutir à la formation d'hétérodimères, tout aussi fonctionnels que les homodimères. Qu'en est-il de la fonctionnalité des dimères comprenant ABCD3? ABCD3 est exprimé de façon ubiquitaire et à un niveau relativement élevé par rapport à ABCD1 et ABCD2. Or, si l'on part du principe que c'est le niveau d'expression des transporteurs qui contrôle leur dimérisation, en plus de s'homodimériser, ABCD3 pourrait très vraisemblablement s'hétérodimériser avec ABCD1 et ABCD2. Il sera donc très instructif de vérifier si les dimères chimériques incluant ABCD3 sont fonctionnels et s'il existe des différences quantifiables en fonction de l'agencement. D'après la littérature, ABCD3 est le seul à être localisé dans des radeaux lipidiques (résistants au Triton X-100) parmi les transporteurs ABCD peroxysomaux (ABCD1 serait présent dans des radeaux résistants au Lubrol-WX) (Woudenberg et al. 2010). Si ABCD3 est effectivement isolé des autres transporteurs dans des radeaux lipidiques distincts, cela va à l'encontre de son interaction avec ABCD1 et ABCD2, que nous avons pourtant mis en évidence par co-

immunoprécipitation, et qui a déjà été relaté dans la littérature. Il pourrait donc exister deux populations de transporteurs ABCD3, une isolée dans certains radeaux lipidiques et une localisée hors de ces radeaux et susceptible d'interagir avec ABCD1 et ABCD2. On peut supposer que la localisation membranaire d'ABCD3 est étroitement liée à son agencement oligomérique et à sa fonctionnalité. Dans les radeaux lipidiques, son agencement oligomérique ainsi que sa fonctionnalité pourraient être modulés par l'environnement lipidique et protéique.

Quant à la formation des oligomères obtenus par association des dimères, celle-ci pourrait être finalement contrôlée par la quantité et la nature des substrats à transporter dans le peroxyosome. Il serait donc intéressant de réaliser une exploration des interactions entre les transporteurs ABCD peroxysoaux *in vivo*, afin de vérifier si leur agencement dépend de leur niveau d'expression dans les tissus, mais également si leur organisation dépend de l'implication des tissus dans le métabolisme lipidique. Cette étude devrait être menée chez des souris ou des rats sauvages, mais également chez les souris déficientes en *Abcd1*, pour voir si la perte du transporteur affecte l'agencement d'ABCD2 et d'ABCD3, et enfin chez des souris déficientes en *Abcd1* et surexprimant *Abcd2*, afin d'observer si l'induction d'*Abcd2* modifie l'agencement du transporteur et celui d'ABCD3.

Pour conclure, mes résultats de thèse suggèrent que les transporteurs ABCD peroxysoaux sont fonctionnels quel que soit leur agencement dimérique, et sont capables de s'agencer dans des complexes oligomériques de taille supérieure à des dimères, qui correspondent vraisemblablement à des tétramères. Ainsi, ces résultats permettent d'envisager un agencement plus complexe des transporteurs ABCD peroxysoaux et ouvrent de nouvelles interrogations. Quelle est la valeur fonctionnelle de l'oligomérisation des transporteurs ABCD peroxysoaux ? L'oligomérisation permettrait-elle de stabiliser les dimères, stabilisation qui serait nécessaire à leur fonctionnalité ? Comment évolue l'agencement des transporteurs ABCD peroxysoaux en fonction des substrats à métaboliser et en fonction des niveaux d'expression variables d'un type cellulaire à l'autre ? Quels facteurs contrôlent l'oligomérisation des transporteurs ABCD peroxysoaux ?

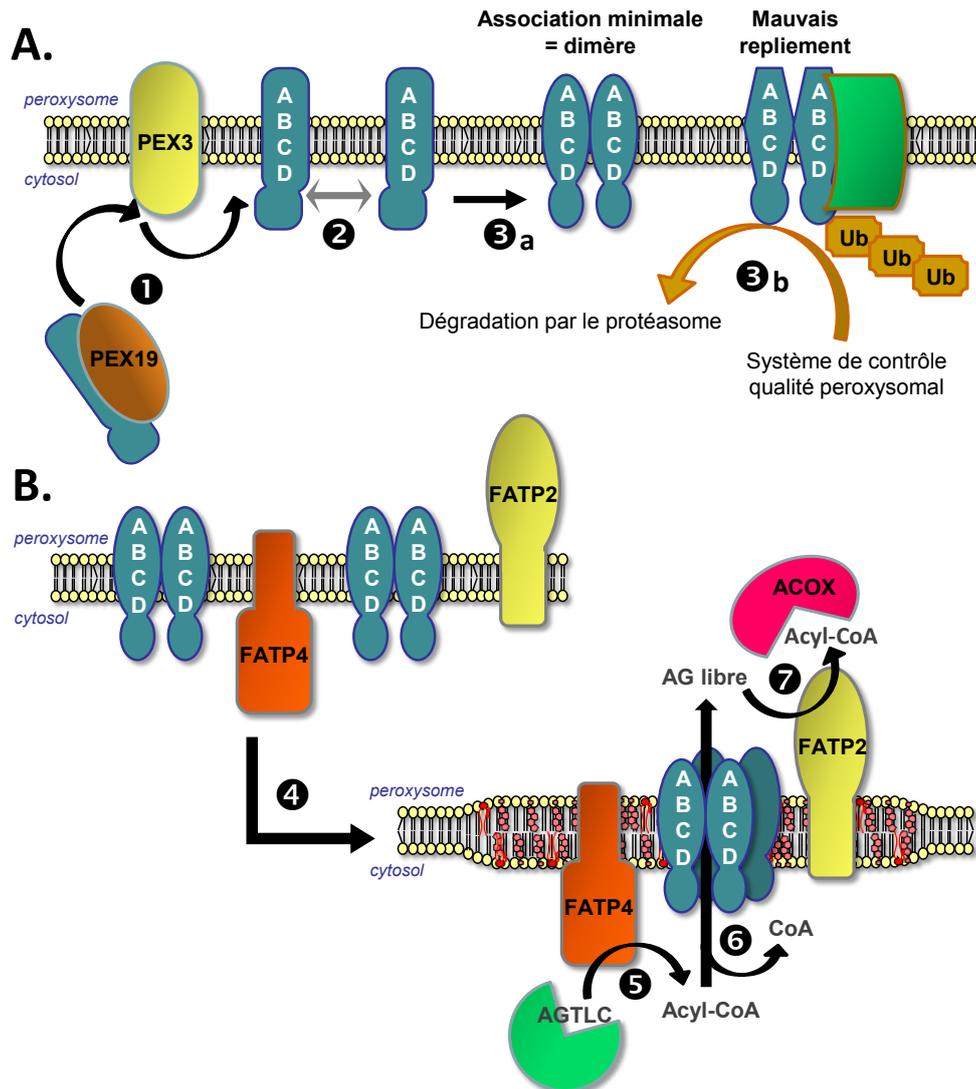


Figure 65 : Modèle hypothétique décrivant l'évolution de l'agencement oligomérique des transporteurs ABCD peroxysomaux, depuis leur synthèse (A) jusqu'au transport de substrat (B).

1 Les transporteurs ABCD peroxysomaux sont synthétisés dans le cytosol sur des ribosomes libres et sont pris en charge par la protéine chaperonne PEX19. **2** Ils seraient ensuite insérés dans la membrane peroxysomale sous forme de monomères, grâce au complexe PEX19/PEX3, par un mécanisme encore inconnu. **3a** Les monomères devraient ensuite rapidement se stabiliser par dimérisation au sein de la membrane ce qui permettrait d'achever leur repliement dans la bonne conformation. **3b** Le système de contrôle qualité peroxysomal pourrait intervenir après l'étape de dimérisation, afin de vérifier la bonne conformation des dimères. En cas de mauvais repliement, les dimères seraient polyubiquitinés et dégradés par le protéasome.

Les transporteurs ABCD peroxysomaux seraient donc au minimum sous forme de dimères dans la membrane. **4** L'assemblage des transporteurs peroxysomaux sous forme oligomérique telle que des tétramères dépendrait de la présence de substrat. Les tétramères pourraient être stabilisés au sein de radeaux lipidiques grâce à des interactions protéiques notamment avec les synthétases FATP4 et FATP2 ou encore des protéines solubles chargées de véhiculer les AGTLC. **5** La synthétase FATP4 serait chargée d'activer les AGTLC en acyl-CoA qui seraient alors **6** importés dans le peroxysome sous forme d'AG libres, **7** réactivés par FATP2 en acyl-CoA, puis pris en charge par l'ACOX qui est la première enzyme de la voie de β -oxydation.

BIBLIOGRAPHIE

- Agrawal, G., S. Joshi, *et al.* (2011). "Cell-free sorting of peroxisomal membrane proteins from the endoplasmic reticulum." *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**(22): 9113-9118.
- Albet, S., C. Causeret, *et al.* (1997). "Fenofibrate differently alters expression of genes encoding ATP-binding transporter proteins of the peroxisomal membrane." *FEBS Lett* **405**(3): 394-397.
- Alencastre, I. S., T. A. Rodrigues, *et al.* (2009). "Mapping the cargo protein membrane translocation step into the PEX5 cycling pathway." *J Biol Chem* **284**(40): 27243-27251.
- Aller, S. G., J. Yu, *et al.* (2009). "Structure of P-glycoprotein reveals a molecular basis for poly-specific drug binding." *Science* **323**(5922): 1718-1722.
- Antonenkov, V. D., S. Grunau, *et al.* (2010). "Peroxisomes are oxidative organelles." *Antioxid Redox Signal* **13**(4): 525-537.
- Antonenkov, V. D. and J. K. Hiltunen (2012). "Transfer of metabolites across the peroxisomal membrane." *Biochim Biophys Acta* **1822**(9): 1374-1386.
- Asheuer, M., I. Bieche, *et al.* (2005). "Decreased expression of ABCD4 and BG1 genes early in the pathogenesis of X-linked adrenoleukodystrophy." *Hum Mol Genet* **14**(10): 1293-1303.
- Ashibe, B., T. Hirai, *et al.* (2007). "Dual subcellular localization in the endoplasmic reticulum and peroxisomes and a vital role in protecting against oxidative stress of fatty aldehyde dehydrogenase are achieved by alternative splicing." *J Biol Chem* **282**(28): 20763-20773.
- Aubourg, P. (2007). "[X-linked adrenoleukodystrophy]." *Ann Endocrinol (Paris)* **68**(6): 403-411.
- Aubourg, P., C. Adamsbaum, *et al.* (1993). "A two-year trial of oleic and erucic acids ("Lorenzo's oil") as treatment for adrenomyeloneuropathy." *N Engl J Med* **329**(11): 745-752.
- Aubourg, P., S. Blanche, *et al.* (1990). "Reversal of early neurologic and neuroradiologic manifestations of X-linked adrenoleukodystrophy by bone marrow transplantation." *N Engl J Med* **322**(26): 1860-1866.
- Baarine, M., P. Andreoletti, *et al.* (2012). "Evidence of oxidative stress in very long chain fatty acid--treated oligodendrocytes and potentialization of ROS production using RNA interference--directed knockdown of ABCD1 and ACOX1 peroxisomal proteins." *Neuroscience* **213**: 1-18.
- Barbier, M., A. Sabbagh, *et al.* (2012). "CD1 gene polymorphisms and phenotypic variability in X-linked adrenoleukodystrophy." *PLoS One* **7**(1): e29872.
- Berger, J., S. Albet, *et al.* (1999). "The four murine peroxisomal ABC-transporter genes differ in constitutive, inducible and developmental expression." *Eur J Biochem* **265**(2): 719-727.
- Berger, J., H. Bernheimer, *et al.* (1995). "Association of X-linked adrenoleukodystrophy with HLA DRB1 alleles." *Biochem Biophys Res Commun* **216**(2): 447-451.
- Berger, J., B. Molzer, *et al.* (1994). "X-linked adrenoleukodystrophy (ALD): a novel mutation of the ALD gene in 6 members of a family presenting with 5 different phenotypes." *Biochem Biophys Res Commun* **205**(3): 1638-1643.
- Berger, J., A. Pujol, *et al.* (2010). "Current and future pharmacological treatment strategies in X-linked adrenoleukodystrophy." *Brain Pathol* **20**(4): 845-856.
- Beznan, L., A. B. Moser, *et al.* (2001). "Adrenoleukodystrophy: incidence, new mutation rate, and results of extended family screening." *Ann Neurol* **49**(4): 512-517.
- Bhatia, A., H. J. Schafer, *et al.* (2005). "Oligomerization of the human ABC transporter ABCG2: evaluation of the native protein and chimeric dimers." *Biochemistry* **44**(32): 10893-10904.
- Bons, J. A., E. C. Michielsen, *et al.* (2008). "A specific immunoprecipitation method for isolating isoforms of insulin-like growth factor binding protein-3 from serum." *Clin Chim Acta* **387**(1-2): 59-65.
- Boscoboinik, D., M. T. Debanne, *et al.* (1990). "Dimerization of the P-glycoprotein in membranes." *Biochim Biophys Acta* **1027**(3): 225-228.
- Bottelbergs, A., S. Verheijden, *et al.* (2010). "Axonal integrity in the absence of functional peroxisomes from projection neurons and astrocytes." *Glia* **58**(13): 1532-1543.
- Braiterman, L. T., S. Zheng, *et al.* (1998). "Suppression of peroxisomal membrane protein defects by peroxisomal ATP binding cassette (ABC) proteins." *Hum Mol Genet* **7**(2): 239-247.

- Braverman, N. E. and A. B. Moser (2012). "Functions of plasmalogen lipids in health and disease." Biochim Biophys Acta **1822**(9): 1442-1452.
- Brites, P., P. A. Mooyer, *et al.* (2009). "Plasmalogens participate in very-long-chain fatty acid-induced pathology." Brain **132**(Pt 2): 482-492.
- Brose, R. D., D. Avramopoulos, *et al.* (2012). "SOD2 as a potential modifier of X-linked adrenoleukodystrophy clinical phenotypes." J Neurol **259**(7): 1440-1447.
- Buechler, C., A. Boettcher, *et al.* (2002). "The carboxyterminus of the ATP-binding cassette transporter A1 interacts with a beta2-syntrophin/utrophin complex." Biochem Biophys Res Commun **293**(2): 759-765.
- Bugaut, M., S. Fourcade, *et al.* (2003). "Pharmacological induction of redundant genes for a therapy of X-ALD: phenylbutyrate and other compounds." Adv Exp Med Biol **544**: 281-291.
- Cappa, M., C. Bizzarri, *et al.* (2011). "Is subclinical adrenal failure in adrenoleukodystrophy/adrenomyeloneuropathy reversible?" J Endocrinol Invest **34**(10): 753-756.
- Cartier, N. and P. Aubourg (2010). "Hematopoietic stem cell transplantation and hematopoietic stem cell gene therapy in X-linked adrenoleukodystrophy." Brain Pathol **20**(4): 857-862.
- Cartier, N., S. Hacein-Bey-Abina, *et al.* (2009). "Hematopoietic stem cell gene therapy with a lentiviral vector in X-linked adrenoleukodystrophy." Science **326**(5954): 818-823.
- Coelho, D., J. C. Kim, *et al.* (2012). "Mutations in ABCD4 cause a new inborn error of vitamin B12 metabolism." Nat Genet **44**(10): 1152-1155.
- Cserepes, J., Z. Szentpetery, *et al.* (2004). "Functional expression and characterization of the human ABCG1 and ABCG4 proteins: indications for heterodimerization." Biochem Biophys Res Commun **320**(3): 860-867.
- Daus, M. L., M. Grote, *et al.* (2007). "ATP-driven MalK dimer closure and reopening and conformational changes of the "EAA" motifs are crucial for function of the maltose ATP-binding cassette transporter (MalFGK2)." J Biol Chem **282**(31): 22387-22396.
- Dawson, R. J. and K. P. Locher (2006). "Structure of a bacterial multidrug ABC transporter." Nature **443**(7108): 180-185.
- De Marcos Lousa, C., C. W. van Roermund, *et al.* (2013). "Intrinsic acyl-CoA thioesterase activity of a peroxisomal ATP binding cassette transporter is required for transport and metabolism of fatty acids." Proc Natl Acad Sci U S A **110**(4): 1279-1284.
- De Nys, K., E. Meyhi, *et al.* (2001). "Characterisation of human peroxisomal 2,4-dienoyl-CoA reductase." Biochim Biophys Acta **1533**(1): 66-72.
- Deon, M., M. P. Garcia, *et al.* (2008). "Hexacosanoic and docosanoic acids plasma levels in patients with cerebral childhood and asymptomatic X-linked adrenoleukodystrophy: Lorenzo's oil effect." Metab Brain Dis **23**(1): 43-49.
- Deon, M., M. Wajner, *et al.* (2006). "The effect of Lorenzo's oil on oxidative stress in X-linked adrenoleukodystrophy." J Neurol Sci **247**(2): 157-164.
- Dezi, M., P. F. Fribourg, *et al.* (2010). "The multidrug resistance half-transporter ABCG2 is purified as a tetramer upon selective extraction from membranes." Biochim Biophys Acta **1798**(11): 2094-2101.
- Di Biase, A., R. Di Benedetto, *et al.* (2004). "Free radical release in C6 glial cells enriched in hexacosanoic acid: implication for X-linked adrenoleukodystrophy pathogenesis." Neurochem Int **44**(4): 215-221.
- Dietrich, D., H. Schmuths, *et al.* (2009). "Mutations in the Arabidopsis peroxisomal ABC transporter COMATOSE allow differentiation between multiple functions in planta: insights from an allelic series." Mol Biol Cell **20**(1): 530-543.
- Dreesen, T. D., D. H. Johnson, *et al.* (1988). "The brown protein of *Drosophila melanogaster* is similar to the white protein and to components of active transport complexes." Mol Cell Biol **8**(12): 5206-5215.

- Eichler, F. S., J. Q. Ren, *et al.* (2008). "Is microglial apoptosis an early pathogenic change in cerebral X-linked adrenoleukodystrophy?" *Ann Neurol* **63**(6): 729-742.
- Engelen, M., S. Kemp, *et al.* (2012). "X-linked adrenoleukodystrophy (X-ALD): clinical presentation and guidelines for diagnosis, follow-up and management." *Orphanet J Rare Dis* **7**(1): 51.
- Fang, Y., J. C. Morrell, *et al.* (2004). "PEX3 functions as a PEX19 docking factor in the import of class I peroxisomal membrane proteins." *J Cell Biol* **164**(6): 863-875.
- Ferdinandusse, S., S. Denis, *et al.* (2003). "Studies on the metabolic fate of n-3 polyunsaturated fatty acids." *J Lipid Res* **44**(10): 1992-1997.
- Ferdinandusse, S., S. Denis, *et al.* (2009). "Bile acids: the role of peroxisomes." *J Lipid Res* **50**(11): 2139-2147.
- Ferdinandusse, S., S. Denis, *et al.* (2001). "Identification of the peroxisomal beta-oxidation enzymes involved in the biosynthesis of docosahexaenoic acid." *J Lipid Res* **42**(12): 1987-1995.
- Ferdinandusse, S., S. Denis, *et al.* (2004). "Identification of the peroxisomal beta-oxidation enzymes involved in the degradation of long-chain dicarboxylic acids." *J Lipid Res* **45**(6): 1104-1111.
- Ferdinandusse, S. and S. M. Houten (2006). "Peroxisomes and bile acid biosynthesis." *Biochim Biophys Acta* **1763**(12): 1427-1440.
- Ferdinandusse, S., T. Meissner, *et al.* (2002). "Identification of the peroxisomal beta-oxidation enzymes involved in the degradation of leukotrienes." *Biochem Biophys Res Commun* **293**(1): 269-273.
- Forss-Petter, S., H. Werner, *et al.* (1997). "Targeted inactivation of the X-linked adrenoleukodystrophy gene in mice." *J Neurosci Res* **50**(5): 829-843.
- Fouquet, F., J. M. Zhou, *et al.* (1997). "Expression of the adrenoleukodystrophy protein in the human and mouse central nervous system." *Neurobiol Dis* **3**(4): 271-285.
- Fourcade, S., J. Lopez-Erauskin, *et al.* (2008). "Early oxidative damage underlying neurodegeneration in X-adrenoleukodystrophy." *Hum Mol Genet* **17**(12): 1762-1773.
- Fourcade, S., M. Ruiz, *et al.* (2009). "A key role for the peroxisomal ABCD2 transporter in fatty acid homeostasis." *Am J Physiol Endocrinol Metab* **296**(1): E211-221.
- Fourcade, S., S. Savary, *et al.* (2001). "Fibrate induction of the adrenoleukodystrophy-related gene (ABCD2): promoter analysis and role of the peroxisome proliferator-activated receptor PPARalpha." *Eur J Biochem* **268**(12): 3490-3500.
- Fourcade, S., S. Savary, *et al.* (2003). "Thyroid hormone induction of the adrenoleukodystrophy-related gene (ABCD2)." *Mol Pharmacol* **63**(6): 1296-1303.
- Fransen, M., M. Nordgren, *et al.* (2012). "Role of peroxisomes in ROS/RNS-metabolism: Implications for human disease." *Biochim Biophys Acta* **1822**(9): 1363-1373.
- Galea, E., N. Launay, *et al.* (2012). "Oxidative stress underlying axonal degeneration in adrenoleukodystrophy: A paradigm for multifactorial neurodegenerative diseases?" *Biochim Biophys Acta* **1822**(9): 1475-1488.
- Gartner, J., H. Moser, *et al.* (1992). "Mutations in the 70K peroxisomal membrane protein gene in Zellweger syndrome." *Nat Genet* **1**(1): 16-23.
- Genin, E. C., F. Geillon, *et al.* (2011). "Substrate specificity overlap and interaction between adrenoleukodystrophy protein (ALDP/ABCD1) and adrenoleukodystrophy-related protein (ALDRP/ABCD2)." *J Biol Chem* **286**(10): 8075-8084.
- Genin, E. C., C. Gondcaille, *et al.* (2009). "Induction of the adrenoleukodystrophy-related gene (ABCD2) by thymomimetics." *J Steroid Biochem Mol Biol* **116**(1-2): 37-43.
- George, A. M. and P. M. Jones (2012). "Perspectives on the structure-function of ABC transporters: the Switch and Constant Contact models." *Prog Biophys Mol Biol* **109**(3): 95-107.
- Ghosh, M. K. and A. K. Hajra (1986). "A rapid method for the isolation of peroxisomes from rat liver." *Anal Biochem* **159**(1): 169-174.
- Gloeckner, C. J., P. U. Mayerhofer, *et al.* (2000). "Human adrenoleukodystrophy protein and related peroxisomal ABC transporters interact with the peroxisomal assembly protein PEX19p." *Biochem Biophys Res Commun* **271**(1): 144-150.

- Gondcaille, C., M. Depreter, *et al.* (2005). "Phenylbutyrate up-regulates the adrenoleukodystrophy-related gene as a nonclassical peroxisome proliferator." *J Cell Biol* **169**(1): 93-104.
- Gould, S. J., G. A. Keller, *et al.* (1989). "A conserved tripeptide sorts proteins to peroxisomes." *J Cell Biol* **108**(5): 1657-1664.
- Graf, G. A., W. P. Li, *et al.* (2002). "Coexpression of ATP-binding cassette proteins ABCG5 and ABCG8 permits their transport to the apical surface." *J Clin Invest* **110**(5): 659-669.
- Graf, G. A., L. Yu, *et al.* (2003). "ABCG5 and ABCG8 are obligate heterodimers for protein trafficking and biliary cholesterol excretion." *J Biol Chem* **278**(48): 48275-48282.
- Grou, C. P., T. Francisco, *et al.* (2012). "Identification of ubiquitin-specific protease 9X (USP9X) as a deubiquitinase acting on ubiquitin-pectoxin 5 (PEX5) thioester conjugate." *J Biol Chem* **287**(16): 12815-12827.
- Gueugnon, F., C. Gondcaille, *et al.* (2007). "Dehydroepiandrosterone up-regulates the Adrenoleukodystrophy-related gene (ABCD2) independently of PPARalpha in rodents." *Biochimie* **89**(11): 1312-1321.
- Gueugnon, F., N. Volodina, *et al.* (2006). "A novel cell model to study the function of the adrenoleukodystrophy-related protein." *Biochem Biophys Res Commun* **341**(1): 150-157.
- Guimaraes, C. P., P. Domingues, *et al.* (2004). "Mouse liver PMP70 and ALDP: homomeric interactions prevail in vivo." *Biochim Biophys Acta* **1689**(3): 235-243.
- Guimaraes, C. P., C. Sa-Miranda, *et al.* (2005). "Probing substrate-induced conformational alterations in adrenoleukodystrophy protein by proteolysis." *J Hum Genet* **50**(2): 99-105.
- Gupta, S., J. Xie, *et al.* (2004). "Intermolecular interaction between R domains of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator." *Am J Respir Cell Mol Biol* **30**(2): 242-248.
- Hashmi, M., W. Stanley, *et al.* (1986). "Lignoceroyl-CoASH ligase: enzyme defect in fatty acid beta-oxidation system in X-linked childhood adrenoleukodystrophy." *FEBS Lett* **196**(2): 247-250.
- He, D., S. Barnes, *et al.* (2003). "Rat liver bile acid CoA:amino acid N-acyltransferase: expression, characterization, and peroxisomal localization." *J Lipid Res* **44**(12): 2242-2249.
- Hegedus, T., T. Sessler, *et al.* (2003). "C-terminal phosphorylation of MRP2 modulates its interaction with PDZ proteins." *Biochem Biophys Res Commun* **302**(3): 454-461.
- Hein, S., P. Schonfeld, *et al.* (2008). "Toxic effects of X-linked adrenoleukodystrophy-associated, very long chain fatty acids on glial cells and neurons from rat hippocampus in culture." *Hum Mol Genet* **17**(12): 1750-1761.
- Hettema, E. H., C. W. van Roermund, *et al.* (1996). "The ABC transporter proteins Pat1 and Pat2 are required for import of long-chain fatty acids into peroxisomes of *Saccharomyces cerevisiae*." *EMBO J* **15**(15): 3813-3822.
- Higgins, C. F., I. D. Hiles, *et al.* (1986). "A family of related ATP-binding subunits coupled to many distinct biological processes in bacteria." *Nature* **323**(6087): 448-450.
- Higgins, C. F. and K. J. Linton (2004). "The ATP switch model for ABC transporters." *Nat Struct Mol Biol* **11**(10): 918-926.
- Hillebrand, M., S. W. Gersting, *et al.* (2012). "Identification of a new fatty acid synthesis-transport machinery at the peroxisomal membrane." *J Biol Chem* **287**(1): 210-221.
- Hillebrand, M., S. E. Verrier, *et al.* (2007). "Live cell FRET microscopy: homo- and heterodimerization of two human peroxisomal ABC transporters, the adrenoleukodystrophy protein (ALDP, ABCD1) and PMP70 (ABCD3)." *J Biol Chem* **282**(37): 26997-27005.
- Hinz, A. and R. Tampe (2012). "ABC transporters and immunity: mechanism of self-defense." *Biochemistry* **51**(25): 4981-4989.
- Hirata, T., M. Okabe, *et al.* (2009). "Molecular mechanisms of subcellular localization of ABCG5 and ABCG8." *Biosci Biotechnol Biochem* **73**(3): 619-626.
- Ho, J. K., H. Moser, *et al.* (1995). "Interactions of a very long chain fatty acid with model membranes and serum albumin. Implications for the pathogenesis of adrenoleukodystrophy." *J Clin Invest* **96**(3): 1455-1463.

- Hoftberger, R., M. Kunze, *et al.* (2007). "Distribution and cellular localization of adrenoleukodystrophy protein in human tissues: implications for X-linked adrenoleukodystrophy." Neurobiol Dis **28**(2): 165-174.
- Holzinger, A., S. Kammerer, *et al.* (1997). "cDNA cloning and mRNA expression of the human adrenoleukodystrophy related protein (ALDRP), a peroxisomal ABC transporter." Biochem Biophys Res Commun **239**(1): 261-264.
- Hubbard, W. C., A. B. Moser, *et al.* (2009). "Newborn screening for X-linked adrenoleukodystrophy (X-ALD): validation of a combined liquid chromatography-tandem mass spectrometric (LC-MS/MS) method." Mol Genet Metab **97**(3): 212-220.
- Hubbard, W. C., A. B. Moser, *et al.* (2006). "Combined liquid chromatography-tandem mass spectrometry as an analytical method for high throughput screening for X-linked adrenoleukodystrophy and other peroxisomal disorders: preliminary findings." Mol Genet Metab **89**(1-2): 185-187.
- Hunt, M. C. and S. E. Alexson (2008). "Novel functions of acyl-CoA thioesterases and acyltransferases as auxiliary enzymes in peroxisomal lipid metabolism." Prog Lipid Res **47**(6): 405-421.
- Hunt, M. C., M. I. Siponen, *et al.* (2012). "The emerging role of acyl-CoA thioesterases and acyltransferases in regulating peroxisomal lipid metabolism." Biochim Biophys Acta **1822**(9): 1397-1410.
- Iatan, I., D. Bailey, *et al.* (2011). "Membrane microdomains modulate oligomeric ABCA1 function: impact on apoAI-mediated lipid removal and phosphatidylcholine biosynthesis." J Lipid Res **52**(11): 2043-2055.
- Ifuku, M., T. Katafuchi, *et al.* (2012). "Anti-inflammatory/anti-amyloidogenic effects of plasmalogens in lipopolysaccharide-induced neuroinflammation in adult mice." J Neuroinflammation **9**: 197.
- Igarashi, M., H. H. Schaumburg, *et al.* (1976). "Fatty acid abnormality in adrenoleukodystrophy." J Neurochem **26**(4): 851-860.
- Imanaka, T., K. Aihara, *et al.* (1999). "Characterization of the 70-kDa peroxisomal membrane protein, an ATP binding cassette transporter." J Biol Chem **274**(17): 11968-11976.
- Jansen, G. A., D. M. van den Brink, *et al.* (2001). "Identification of pristanal dehydrogenase activity in peroxisomes: conclusive evidence that the complete phytanic acid alpha-oxidation pathway is localized in peroxisomes." Biochem Biophys Res Commun **283**(3): 674-679.
- Jia, Z., C. L. Moulson, *et al.* (2007). "Fatty acid transport protein 4 is the principal very long chain fatty acyl-CoA synthetase in skin fibroblasts." J Biol Chem **282**(28): 20573-20583.
- Jones, J. M., J. C. Morrell, *et al.* (2004). "PEX19 is a predominantly cytosolic chaperone and import receptor for class 1 peroxisomal membrane proteins." J Cell Biol **164**(1): 57-67.
- Juliano, R. L. and V. Ling (1976). "A surface glycoprotein modulating drug permeability in Chinese hamster ovary cell mutants." Biochim Biophys Acta **455**(1): 152-162.
- Kage, K., S. Tsukahara, *et al.* (2002). "Dominant-negative inhibition of breast cancer resistance protein as drug efflux pump through the inhibition of S-S dependent homodimerization." Int J Cancer **97**(5): 626-630.
- Kamijo, K., S. Taketani, *et al.* (1990). "The 70-kDa peroxisomal membrane protein is a member of the Mdr (P-glycoprotein)-related ATP-binding protein superfamily." J Biol Chem **265**(8): 4534-4540.
- Kashiwayama, Y., K. Asahina, *et al.* (2007). "Hydrophobic regions adjacent to transmembrane domains 1 and 5 are important for the targeting of the 70-kDa peroxisomal membrane protein." J Biol Chem **282**(46): 33831-33844.
- Kashiwayama, Y., M. Morita, *et al.* (2002). "Nucleotide-induced conformational changes of PMP70, an ATP binding cassette transporter on rat liver peroxisomal membranes." Biochem Biophys Res Commun **291**(5): 1245-1251.
- Kashiwayama, Y., M. Seki, *et al.* (2009). "70-kDa peroxisomal membrane protein related protein (P70R/ABCD4) localizes to endoplasmic reticulum not peroxisomes, and NH2-terminal

- hydrophobic property determines the subcellular localization of ABC subfamily D proteins." *Exp Cell Res* **315**(2): 190-205.
- Kassmann, C. M., C. Lappe-Siefke, *et al.* (2007). "Axonal loss and neuroinflammation caused by peroxisome-deficient oligodendrocytes." *Nat Genet* **39**(8): 969-976.
- Kemp, S., J. Berger, *et al.* (2012). "X-linked adrenoleukodystrophy: Clinical, metabolic, genetic and pathophysiological aspects." *Biochim Biophys Acta* **1822**(9): 1465-1474.
- Kemp, S., F. L. Theodoulou, *et al.* (2011). "Mammalian peroxisomal ABC transporters: from endogenous substrates to pathology and clinical significance." *Br J Pharmacol* **164**(7): 1753-1766.
- Kemp, S., F. Valianpour, *et al.* (2005). "Elongation of very long-chain fatty acids is enhanced in X-linked adrenoleukodystrophy." *Mol Genet Metab* **84**(2): 144-151.
- Kemp, S., H. M. Wei, *et al.* (1998). "Gene redundancy and pharmacological gene therapy: implications for X-linked adrenoleukodystrophy." *Nat Med* **4**(11): 1261-1268.
- Kennedy, D. W. and J. L. Abkowitz (1997). "Kinetics of central nervous system microglial and macrophage engraftment: analysis using a transgenic bone marrow transplantation model." *Blood* **90**(3): 986-993.
- Khan, M., J. Singh, *et al.* (2010). "Very long-chain fatty acid accumulation causes lipotoxic response via 5-lipoxygenase in cerebral adrenoleukodystrophy." *J Lipid Res* **51**(7): 1685-1695.
- Khan, M., J. Singh, *et al.* (2008). "Plasmalogen deficiency in cerebral adrenoleukodystrophy and its modulation by lovastatin." *J Neurochem* **106**(4): 1766-1779.
- Kikuchi, M., N. Hatano, *et al.* (2004). "Proteomic analysis of rat liver peroxisome: presence of peroxisome-specific isozyme of Lon protease." *J Biol Chem* **279**(1): 421-428.
- Kim, P. K., R. T. Mullen, *et al.* (2006). "The origin and maintenance of mammalian peroxisomes involves a de novo PEX16-dependent pathway from the ER." *J Cell Biol* **173**(4): 521-532.
- Klucken, J., C. Buchler, *et al.* (2000). "ABCG1 (ABC8), the human homolog of the Drosophila white gene, is a regulator of macrophage cholesterol and phospholipid transport." *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**(2): 817-822.
- Knazek, R. A., W. B. Rizzo, *et al.* (1983). "Membrane microviscosity is increased in the erythrocytes of patients with adrenoleukodystrophy and adrenomyeloneuropathy." *J Clin Invest* **72**(1): 245-248.
- Kobayashi, A., Y. Takanezawa, *et al.* (2006). "Efflux of sphingomyelin, cholesterol, and phosphatidylcholine by ABCG1." *J Lipid Res* **47**(8): 1791-1802.
- Kobayashi, T., N. Shinnoh, *et al.* (1997). "Adrenoleukodystrophy protein-deficient mice represent abnormality of very long chain fatty acid metabolism." *Biochem Biophys Res Commun* **232**(3): 631-636.
- Komar, A. A. (2009). "A pause for thought along the co-translational folding pathway." *Trends Biochem Sci* **34**(1): 16-24.
- Korenke, G. C., S. Fuchs, *et al.* (1996). "Cerebral adrenoleukodystrophy (ALD) in only one of monozygotic twins with an identical ALD genotype." *Ann Neurol* **40**(2): 254-257.
- Lacaille, V. G. and M. J. Androlewicz (1998). "Herpes simplex virus inhibitor ICP47 destabilizes the transporter associated with antigen processing (TAP) heterodimer." *J Biol Chem* **273**(28): 17386-17390.
- Lam, S. K., N. Yoda, *et al.* (2010). "A vesicle carrier that mediates peroxisome protein traffic from the endoplasmic reticulum." *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**(50): 21523-21528.
- Landgraf, P., P. U. Mayerhofer, *et al.* (2003). "Targeting of the human adrenoleukodystrophy protein to the peroxisomal membrane by an internal region containing a highly conserved motif." *Eur J Cell Biol* **82**(8): 401-410.
- Langmann, T., R. Mauerer, *et al.* (2003). "Real-time reverse transcription-PCR expression profiling of the complete human ATP-binding cassette transporter superfamily in various tissues." *Clin Chem* **49**(2): 230-238.

- Leclercq, S., J. Skrzypski, *et al.* (2008). "Effect of dietary polyunsaturated fatty acids on the expression of peroxisomal ABC transporters." *Biochimie* **90**(10): 1602-1607.
- Lewin, T. M., C. G. Van Horn, *et al.* (2002). "Rat liver acyl-CoA synthetase 4 is a peripheral-membrane protein located in two distinct subcellular organelles, peroxisomes, and mitochondrial-associated membrane." *Arch Biochem Biophys* **404**(2): 263-270.
- Li, C. and A. P. Naren (2010). "CFTR chloride channel in the apical compartments: spatiotemporal coupling to its interacting partners." *Integr Biol (Camb)* **2**(4): 161-177.
- Li, E., W. C. Wimley, *et al.* (2012). "Transmembrane helix dimerization: beyond the search for sequence motifs." *Biochim Biophys Acta* **1818**(2): 183-193.
- Linnebank, M., S. Kemp, *et al.* (2006a). "Methionine metabolism and phenotypic variability in X-linked adrenoleukodystrophy." *Neurology* **66**(3): 442-443.
- Linnebank, M., A. Semmler, *et al.* (2006b). "The cystathionine beta-synthase variant c.844_845ins68 protects against CNS demyelination in X-linked adrenoleukodystrophy." *Hum Mutat* **27**(10): 1063-1064.
- Linton, K. J. (2007). "Structure and function of ABC transporters." *Physiology (Bethesda)* **22**: 122-130.
- Litman, T., U. Jensen, *et al.* (2002). "Use of peptide antibodies to probe for the mitoxantrone resistance-associated protein MXR/BCRP/ABCP/ABCG2." *Biochim Biophys Acta* **1565**(1): 6-16.
- Liu, L. X., K. Janvier, *et al.* (1999). "Homo- and heterodimerization of peroxisomal ATP-binding cassette half-transporters." *J Biol Chem* **274**(46): 32738-32743.
- Lombard-Platet, G., S. Savary, *et al.* (1996). "A close relative of the adrenoleukodystrophy (ALD) gene codes for a peroxisomal protein with a specific expression pattern." *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**(3): 1265-1269.
- Lu, J. F., A. M. Lawler, *et al.* (1997). "A mouse model for X-linked adrenoleukodystrophy." *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**(17): 9366-9371.
- Lund, T. C., P. S. Stadem, *et al.* (2012). "Elevated cerebral spinal fluid cytokine levels in boys with cerebral adrenoleukodystrophy correlates with MRI severity." *PLoS One* **7**(2): e32218.
- Ma, C., G. Agrawal, *et al.* (2011). "Peroxisome assembly: matrix and membrane protein biogenesis." *J Cell Biol* **193**(1): 7-16.
- Maier, E. M., P. U. Mayerhofer, *et al.* (2008). "X-linked adrenoleukodystrophy phenotype is independent of ABCD2 genotype." *Biochem Biophys Res Commun* **377**(1): 176-180.
- Makkar, R. S., M. A. Contreras, *et al.* (2006). "Molecular organization of peroxisomal enzymes: protein-protein interactions in the membrane and in the matrix." *Arch Biochem Biophys* **451**(2): 128-140.
- Matsukawa, T., M. Asheuer, *et al.* (2011). "Identification of novel SNPs of ABCD1, ABCD2, ABCD3, and ABCD4 genes in patients with X-linked adrenoleukodystrophy (ALD) based on comprehensive resequencing and association studies with ALD phenotypes." *Neurogenetics* **12**(1): 41-50.
- Matsuzono, Y., T. Matsuzaki, *et al.* (2006). "Functional domain mapping of peroxin Pex19p: interaction with Pex3p is essential for function and translocation." *J Cell Sci* **119**(Pt 17): 3539-3550.
- McGuinness, M. C., J. M. Powers, *et al.* (1997). "Human leukocyte antigens and cytokine expression in cerebral inflammatory demyelinating lesions of X-linked adrenoleukodystrophy and multiple sclerosis." *J Neuroimmunol* **75**(1-2): 174-182.
- McGuinness, M. C., H. P. Zhang, *et al.* (2001). "Evaluation of pharmacological induction of fatty acid beta-oxidation in X-linked adrenoleukodystrophy." *Mol Genet Metab* **74**(1-2): 256-263.
- McNew, J. A. and J. M. Goodman (1994). "An oligomeric protein is imported into peroxisomes in vivo." *J Cell Biol* **127**(5): 1245-1257.
- Meinecke, M., C. Cizmowski, *et al.* (2010). "The peroxisomal importomer constitutes a large and highly dynamic pore." *Nat Cell Biol* **12**(3): 273-277.
- Mihalik, S. J., S. J. Steinberg, *et al.* (2002). "Participation of two members of the very long-chain acyl-CoA synthetase family in bile acid synthesis and recycling." *J Biol Chem* **277**(27): 24771-24779.

- Mo, W. and J. T. Zhang (2009). "Oligomerization of human ATP-binding cassette transporters and its potential significance in human disease." *Expert Opin Drug Metab Toxicol* **5**(9): 1049-1063.
- Morita, M. and T. Imanaka (2012). "Peroxisomal ABC transporters: Structure, function and role in disease." *Biochim Biophys Acta* **1822**(9): 1387-1396.
- Morita, S. Y., A. Kobayashi, *et al.* (2007). "Bile salt-dependent efflux of cellular phospholipids mediated by ATP binding cassette protein B4." *Hepatology* **46**(1): 188-199.
- Moser, H. W. (2000). "Molecular genetics of peroxisomal disorders." *Front Biosci* **5**: D298-306.
- Moser, H. W., A. B. Moser, *et al.* (2007). "'Lorenzo's oil' therapy for X-linked adrenoleukodystrophy: rationale and current assessment of efficacy." *J Mol Neurosci* **33**(1): 105-113.
- Moser, H. W., A. E. Moser, *et al.* (1983). "Identification of female carriers of adrenoleukodystrophy." *J Pediatr* **103**(1): 54-59.
- Moser, H. W., G. V. Raymond, *et al.* (2005). "Follow-up of 89 asymptomatic patients with adrenoleukodystrophy treated with Lorenzo's oil." *Arch Neurol* **62**(7): 1073-1080.
- Mosser, J., A. M. Douar, *et al.* (1993). "Putative X-linked adrenoleukodystrophy gene shares unexpected homology with ABC transporters." *Nature* **361**(6414): 726-730.
- Motley, A. M. and E. H. Hettema (2007). "Yeast peroxisomes multiply by growth and division." *J Cell Biol* **178**(3): 399-410.
- Moulson, C. L., D. R. Martin, *et al.* (2003). "Cloning of wrinkle-free, a previously uncharacterized mouse mutation, reveals crucial roles for fatty acid transport protein 4 in skin and hair development." *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**(9): 5274-5279.
- Netik, A., S. Forss-Petter, *et al.* (1999). "Adrenoleukodystrophy-related protein can compensate functionally for adrenoleukodystrophy protein deficiency (X-ALD): implications for therapy." *Hum Mol Genet* **8**(5): 907-913.
- Niepmann, M. and J. Zheng (2006). "Discontinuous native protein gel electrophoresis." *Electrophoresis* **27**(20): 3949-3951.
- Novikov, D. K., K. T. Koivuranta, *et al.* (1999). "Enzymology of beta-oxidation of (poly)unsaturated fatty acids." *Adv Exp Med Biol* **466**: 301-309.
- O'Hare, K., C. Murphy, *et al.* (1984). "DNA sequence of the white locus of *Drosophila melanogaster*." *J Mol Biol* **180**(3): 437-455.
- Ochoa-Reparaz, J., D. W. Mielcarz, *et al.* (2011). "Gut, bugs, and brain: role of commensal bacteria in the control of central nervous system disease." *Ann Neurol* **69**(2): 240-247.
- Ofman, R., I. M. Dijkstra, *et al.* (2010). "The role of ELOVL1 in very long-chain fatty acid homeostasis and X-linked adrenoleukodystrophy." *EMBO Mol Med* **2**(3): 90-97.
- Okiyoneda, T., T. Kono, *et al.* (2006). "Calreticulin facilitates the cell surface expression of ABCG5/G8." *Biochem Biophys Res Commun* **347**(1): 67-75.
- Okuhira, K., M. L. Fitzgerald, *et al.* (2010). "Binding of PDZ-RhoGEF to ATP-binding cassette transporter A1 (ABCA1) induces cholesterol efflux through RhoA activation and prevention of transporter degradation." *J Biol Chem* **285**(21): 16369-16377.
- Ortmann, B., J. Copeman, *et al.* (1997). "A critical role for tapasin in the assembly and function of multimeric MHC class I-TAP complexes." *Science* **277**(5330): 1306-1309.
- Osumi, T., S. Yokota, *et al.* (1990). "Proliferation of peroxisomes and induction of peroxisomal beta-oxidation enzymes in rat hepatoma H4IIEC3 by ciprofibrate." *J Biochem* **108**(4): 614-621.
- Ozvegy, C., T. Litman, *et al.* (2001). "Functional characterization of the human multidrug transporter, ABCG2, expressed in insect cells." *Biochem Biophys Res Commun* **285**(1): 111-117.
- Paintlia, A. S., A. G. Gilg, *et al.* (2003). "Correlation of very long chain fatty acid accumulation and inflammatory disease progression in childhood X-ALD: implications for potential therapies." *Neurobiol Dis* **14**(3): 425-439.
- Pellicoro, A. and K. N. Faber (2007). "Review article: The function and regulation of proteins involved in bile salt biosynthesis and transport." *Aliment Pharmacol Ther* **26 Suppl 2**: 149-160.
- Pepling, M. and S. M. Mount (1990). "Sequence of a cDNA from the *Drosophila melanogaster* white gene." *Nucleic Acids Res* **18**(6): 1633.

- Peter, G. F. and J. P. Thornber (1991). "Biochemical composition and organization of higher plant photosystem II light-harvesting pigment-proteins." *J Biol Chem* **266**(25): 16745-16754.
- Petriv, O. I., L. Tang, *et al.* (2004). "A new definition for the consensus sequence of the peroxisome targeting signal type 2." *J Mol Biol* **341**(1): 119-134.
- Petroni, A., B. Bertagnolio, *et al.* (1998). "The beta-oxidation of arachidonic acid and the synthesis of docosahexaenoic acid are selectively and consistently altered in skin fibroblasts from three Zellweger patients versus X-adrenoleukodystrophy, Alzheimer and control subjects." *Neurosci Lett* **250**(3): 145-148.
- Polgar, O., C. Ierano, *et al.* (2010). "Mutational analysis of threonine 402 adjacent to the GXXXG dimerization motif in transmembrane segment 1 of ABCG2." *Biochemistry* **49**(10): 2235-2245.
- Polgar, O., R. W. Robey, *et al.* (2004). "Mutational analysis of ABCG2: role of the GXXXG motif." *Biochemistry* **43**(29): 9448-9456.
- Poruchynsky, M. S. and V. Ling (1994). "Detection of oligomeric and monomeric forms of P-glycoprotein in multidrug resistant cells." *Biochemistry* **33**(14): 4163-4174.
- Pujol, A., I. Ferrer, *et al.* (2004). "Functional overlap between ABCD1 (ALD) and ABCD2 (ALDR) transporters: a therapeutic target for X-adrenoleukodystrophy." *Hum Mol Genet* **13**(23): 2997-3006.
- Pujol, A., C. Hindelang, *et al.* (2002). "Late onset neurological phenotype of the X-ALD gene inactivation in mice: a mouse model for adrenomyeloneuropathy." *Hum Mol Genet* **11**(5): 499-505.
- Raghuram, V., D. O. Mak, *et al.* (2001). "Regulation of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator single-channel gating by bivalent PDZ-domain-mediated interaction." *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**(3): 1300-1305.
- Ramjeesingh, M., J. F. Kidd, *et al.* (2003). "Dimeric cystic fibrosis transmembrane conductance regulator exists in the plasma membrane." *Biochem J* **374**(Pt 3): 793-797.
- Rampler, H., I. Weinhofer, *et al.* (2003). "Evaluation of the therapeutic potential of PPARalpha agonists for X-linked adrenoleukodystrophy." *Mol Genet Metab* **80**(4): 398-407.
- Reinecke, C. J., D. P. Knoll, *et al.* (1985). "The correlation between biochemical and histopathological findings in adrenoleukodystrophy." *J Neurol Sci* **70**(1): 21-38.
- Rizzo, W. B., R. T. Leshner, *et al.* (1989). "Dietary erucic acid therapy for X-linked adrenoleukodystrophy." *Neurology* **39**(11): 1415-1422.
- Roerig, P., P. Mayerhofer, *et al.* (2001). "Characterization and functional analysis of the nucleotide binding fold in human peroxisomal ATP binding cassette transporters." *FEBS Lett* **492**(1-2): 66-72.
- Rottensteiner, H., A. Kramer, *et al.* (2004). "Peroxisomal membrane proteins contain common Pex19p-binding sites that are an integral part of their targeting signals." *Mol Biol Cell* **15**(7): 3406-3417.
- Russ, W. P. and D. M. Engelman (2000). "The GxxxG motif: a framework for transmembrane helix-helix association." *J Mol Biol* **296**(3): 911-919.
- Salido, E., A. L. Pey, *et al.* (2012). "Primary hyperoxalurias: Disorders of glyoxylate detoxification." *Biochim Biophys Acta* **1822**(9): 1453-1464.
- Sanders, R. J., R. Ofman, *et al.* (2008). "Characterization of the human omega-oxidation pathway for omega-hydroxy-very-long-chain fatty acids." *FASEB J* **22**(6): 2064-2071.
- Sanders, R. J., R. Ofman, *et al.* (2006). "Omega-oxidation of very long-chain fatty acids in human liver microsomes. Implications for X-linked adrenoleukodystrophy." *J Biol Chem* **281**(19): 13180-13187.
- Sanders, R. J., R. Ofman, *et al.* (2005). "Evidence for two enzymatic pathways for omega-oxidation of docosanoic acid in rat liver microsomes." *J Lipid Res* **46**(5): 1001-1008.

- Sandlers, Y., A. B. Moser, *et al.* (2012). "Combined extraction of acyl carnitines and 26:0 lysophosphatidylcholine from dried blood spots: prospective newborn screening for X-linked adrenoleukodystrophy." *Mol Genet Metab* **105**(3): 416-420.
- Schluter, A., L. Espinosa, *et al.* (2012). "Functional genomic analysis unravels a metabolic-inflammatory interplay in adrenoleukodystrophy." *Hum Mol Genet* **21**(5): 1062-1077.
- Schmidt, F., D. Dietrich, *et al.* (2012). "The role of conserved PEX3 regions in PEX19-binding and peroxisome biogenesis." *Traffic* **13**(9): 1244-1260.
- Semmler, A., X. Bao, *et al.* (2009). "Genetic variants of methionine metabolism and X-ALD phenotype generation: results of a new study sample." *J Neurol* **256**(8): 1277-1280.
- Senes, A., M. Gerstein, *et al.* (2000). "Statistical analysis of amino acid patterns in transmembrane helices: the GxxxG motif occurs frequently and in association with beta-branched residues at neighboring positions." *J Mol Biol* **296**(3): 921-936.
- Senior, A. E., M. K. al-Shawi, *et al.* (1995). "The catalytic cycle of P-glycoprotein." *FEBS Lett* **377**(3): 285-289.
- Shani, N. and D. Valle (1996). "A *Saccharomyces cerevisiae* homolog of the human adrenoleukodystrophy transporter is a heterodimer of two half ATP-binding cassette transporters." *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**(21): 11901-11906.
- Shani, N., P. A. Watkins, *et al.* (1995). "PXA1, a possible *Saccharomyces cerevisiae* ortholog of the human adrenoleukodystrophy gene." *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**(13): 6012-6016.
- Sheng, M. and C. Sala (2001). "PDZ domains and the organization of supramolecular complexes." *Annu Rev Neurosci* **24**: 1-29.
- Shibata, H., Y. Kashiwayama, *et al.* (2004). "Domain architecture and activity of human Pex19p, a chaperone-like protein for intracellular trafficking of peroxisomal membrane proteins." *J Biol Chem* **279**(37): 38486-38494.
- Shimozawa, N., Y. Suzuki, *et al.* (1996). "Correction by gene expression of biochemical abnormalities in fibroblasts from Zellweger patients." *Pediatr Res* **39**(5): 812-815.
- Singh, I., M. Khan, *et al.* (1998a). "Lovastatin for X-linked adrenoleukodystrophy." *N Engl J Med* **339**(10): 702-703.
- Singh, I., A. E. Moser, *et al.* (1984). "Adrenoleukodystrophy: impaired oxidation of very long chain fatty acids in white blood cells, cultured skin fibroblasts, and amniocytes." *Pediatr Res* **18**(3): 286-290.
- Singh, I., H. W. Moser, *et al.* (1981). "Adrenoleukodystrophy: impaired oxidation of long chain fatty acids in cultured skin fibroblasts and adrenal cortex." *Biochem Biophys Res Commun* **102**(4): 1223-1229.
- Singh, I., K. Pahan, *et al.* (1998b). "Lovastatin and sodium phenylacetate normalize the levels of very long chain fatty acids in skin fibroblasts of X- adrenoleukodystrophy." *FEBS Lett* **426**(3): 342-346.
- Singh, I. and A. Pujol (2010). "Pathomechanisms underlying X-adrenoleukodystrophy: a three-hit hypothesis." *Brain Pathol* **20**(4): 838-844.
- Smit, J. J., A. H. Schinkel, *et al.* (1993). "Homozygous disruption of the murine *mdr2* P-glycoprotein gene leads to a complete absence of phospholipid from bile and to liver disease." *Cell* **75**(3): 451-462.
- Smith, B. T., T. K. Sengupta, *et al.* (2000). "Intraperoxisomal localization of very-long-chain fatty acyl-CoA synthetase: implication in X-adrenoleukodystrophy." *Exp Cell Res* **254**(2): 309-320.
- Smith, K. D., S. Kemp, *et al.* (1999). "X-linked adrenoleukodystrophy: genes, mutations, and phenotypes." *Neurochem Res* **24**(4): 521-535.
- Smith, P. C., N. Karpowich, *et al.* (2002). "ATP binding to the motor domain from an ABC transporter drives formation of a nucleotide sandwich dimer." *Mol Cell* **10**(1): 139-149.
- Spies, T., V. Cerundolo, *et al.* (1992). "Presentation of viral antigen by MHC class I molecules is dependent on a putative peptide transporter heterodimer." *Nature* **355**(6361): 644-646.

- Sprecher, H. (2000). "Metabolism of highly unsaturated n-3 and n-6 fatty acids." Biochim Biophys Acta **1486**(2-3): 219-231.
- Su, H. M., A. B. Moser, *et al.* (2001). "Peroxisomal straight-chain Acyl-CoA oxidase and D-bifunctional protein are essential for the retroconversion step in docosahexaenoic acid synthesis." J Biol Chem **276**(41): 38115-38120.
- Swinkels, B. W., S. J. Gould, *et al.* (1991). "A novel, cleavable peroxisomal targeting signal at the amino-terminus of the rat 3-ketoacyl-CoA thiolase." EMBO J **10**(11): 3255-3262.
- Takahashi, N., M. Morita, *et al.* (2007). "Adrenoleukodystrophy: subcellular localization and degradation of adrenoleukodystrophy protein (ALDP/ABCD1) with naturally occurring missense mutations." J Neurochem **101**(6): 1632-1643.
- Tanaka, A. R., K. Tanabe, *et al.* (2002). "ATP binding/hydrolysis by and phosphorylation of peroxisomal ATP-binding cassette proteins PMP70 (ABCD3) and adrenoleukodystrophy protein (ABCD1)." J Biol Chem **277**(42): 40142-40147.
- Tarling, E. J., T. Q. Vallim, *et al.* (2013). "Role of ABC transporters in lipid transport and human disease." Trends Endocrinol Metab.
- Tearle, R. G., J. M. Belote, *et al.* (1989). "Cloning and characterization of the scarlet gene of *Drosophila melanogaster*." Genetics **122**(3): 595-606.
- Telbisz, A., C. Ozvegy-Laczka, *et al.* (2013). "Effects of the lipid environment, cholesterol and bile acids on the function of the purified and reconstituted human ABCG2 protein." Biochem J **450**(2): 387-395.
- Tokuda, H. (2009). "Biogenesis of outer membranes in Gram-negative bacteria." Biosci Biotechnol Biochem **73**(3): 465-473.
- Toro, A. A., C. A. Araya, *et al.* (2009). "Pex3p-dependent peroxisomal biogenesis initiates in the endoplasmic reticulum of human fibroblasts." J Cell Biochem **107**(6): 1083-1096.
- Troffer-Charlier, N., N. Doerflinger, *et al.* (1998). "Mirror expression of adrenoleukodystrophy and adrenoleukodystrophy related genes in mouse tissues and human cell lines." Eur J Cell Biol **75**(3): 254-264.
- Trompier, D., M. Alibert, *et al.* (2006). "Transition from dimers to higher oligomeric forms occurs during the ATPase cycle of the ABCA1 transporter." J Biol Chem **281**(29): 20283-20290.
- Unterrainer, G., B. Molzer, *et al.* (2000). "Co-expression of mutated and normal adrenoleukodystrophy protein reduces protein function: implications for gene therapy of X-linked adrenoleukodystrophy." Hum Mol Genet **9**(18): 2609-2616.
- Uto, T., M. A. Contreras, *et al.* (2008). "Oxidative imbalance in nonstimulated X-adrenoleukodystrophy-derived lymphoblasts." Dev Neurosci **30**(6): 410-418.
- van der Knaap, M. S., E. Wassmer, *et al.* (2012). "MRI as diagnostic tool in early-onset peroxisomal disorders." Neurology **78**(17): 1304-1308.
- van der Zand, A., I. Braakman, *et al.* (2010). "Peroxisomal membrane proteins insert into the endoplasmic reticulum." Mol Biol Cell **21**(12): 2057-2065.
- van der Zand, A., J. Gent, *et al.* (2012). "Biochemically distinct vesicles from the endoplasmic reticulum fuse to form peroxisomes." Cell **149**(2): 397-409.
- van Geel, B. M., J. Assies, *et al.* (1999). "Progression of abnormalities in adrenomyeloneuropathy and neurologically asymptomatic X-linked adrenoleukodystrophy despite treatment with "Lorenzo's oil"." J Neurol Neurosurg Psychiatry **67**(3): 290-299.
- van Roermund, C. W., L. Ijlst, *et al.* (2012). "Peroxisomal Fatty Acid Uptake Mechanism in *Saccharomyces cerevisiae*." J Biol Chem **287**(24): 20144-20153.
- van Roermund, C. W., W. F. Visser, *et al.* (2008). "The human peroxisomal ABC half transporter ALDP functions as a homodimer and accepts acyl-CoA esters." FASEB J **22**(12): 4201-4208.
- van Roermund, C. W., W. F. Visser, *et al.* (2011). "Differential substrate specificities of human ABCD1 and ABCD2 in peroxisomal fatty acid beta-oxidation." Biochim Biophys Acta **1811**(3): 148-152.

- Van Veldhoven, P. P. (2010). "Biochemistry and genetics of inherited disorders of peroxisomal fatty acid metabolism." *J Lipid Res* **51**(10): 2863-2895.
- Vargas, C. R., M. Wajner, *et al.* (2004). "Evidence that oxidative stress is increased in patients with X-linked adrenoleukodystrophy." *Biochim Biophys Acta* **1688**(1): 26-32.
- Velarde, G., R. C. Ford, *et al.* (2001). "Three-dimensional structure of transporter associated with antigen processing (TAP) obtained by single Particle image analysis." *J Biol Chem* **276**(49): 46054-46063.
- Visser, W. F., C. W. van Roermund, *et al.* (2007). "Metabolite transport across the peroxisomal membrane." *Biochem J* **401**(2): 365-375.
- Vrins, C., E. Vink, *et al.* (2007). "The sterol transporting heterodimer ABCG5/ABCG8 requires bile salts to mediate cholesterol efflux." *FEBS Lett* **581**(24): 4616-4620.
- Walker, J. E., M. Saraste, *et al.* (1982). "Distantly related sequences in the alpha- and beta-subunits of ATP synthase, myosin, kinases and other ATP-requiring enzymes and a common nucleotide binding fold." *EMBO J* **1**(8): 945-951.
- Wanders, R. J., S. Ferdinandusse, *et al.* (2010). "Peroxisomes, lipid metabolism and lipotoxicity." *Biochim Biophys Acta* **1801**(3): 272-280.
- Wanders, R. J., J. Komen, *et al.* (2011). "Phytanic acid metabolism in health and disease." *Biochim Biophys Acta* **1811**(9): 498-507.
- 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." *Biochim Biophys Acta* **1763**(12): 1707-1720.
- Wang, J., D. W. Zhang, *et al.* (2008a). "Purification and reconstitution of sterol transfer by native mouse ABCG5 and ABCG8." *Biochemistry* **47**(18): 5194-5204.
- Wang, N., L. Yvan-Charvet, *et al.* (2008b). "ATP-binding cassette transporters G1 and G4 mediate cholesterol and desmosterol efflux to HDL and regulate sterol accumulation in the brain." *FASEB J* **22**(4): 1073-1082.
- Wang, S., H. Yue, *et al.* (2000). "Accessory protein facilitated CFTR-CFTR interaction, a molecular mechanism to potentiate the chloride channel activity." *Cell* **103**(1): 169-179.
- Wang, Y., R. Busin, *et al.* (2011). "X-linked adrenoleukodystrophy: ABCD1 de novo mutations and mosaicism." *Mol Genet Metab* **104**(1-2): 160-166.
- Waterham, H. R. and M. S. Ebberink (2012). "Genetics and molecular basis of human peroxisome biogenesis disorders." *Biochim Biophys Acta* **1822**(9): 1430-1441.
- Weinhofer, I., S. Forss-Petter, *et al.* (2005a). "X-linked adrenoleukodystrophy mice demonstrate abnormalities in cholesterol metabolism." *FEBS Lett* **579**(25): 5512-5516.
- Weinhofer, I., S. Forss-Petter, *et al.* (2002). "Cholesterol regulates ABCD2 expression: implications for the therapy of X-linked adrenoleukodystrophy." *Hum Mol Genet* **11**(22): 2701-2708.
- Weinhofer, I., M. Kunze, *et al.* (2005b). "Liver X receptor alpha interferes with SREBP1c-mediated Abcd2 expression. Novel cross-talk in gene regulation." *J Biol Chem* **280**(50): 41243-41251.
- Weinhofer, I., M. Kunze, *et al.* (2008). "Distinct modulatory roles for thyroid hormone receptors TRalpha and TRbeta in SREBP1-activated ABCD2 expression." *Eur J Cell Biol* **87**(12): 933-945.
- Whitcomb, R. W., W. M. Linehan, *et al.* (1988). "Effects of long-chain, saturated fatty acids on membrane microviscosity and adrenocorticotropin responsiveness of human adrenocortical cells in vitro." *J Clin Invest* **81**(1): 185-188.
- Wilson, R. and J. R. Sargent (1993). "Lipid and fatty acid composition of brain tissue from adrenoleukodystrophy patients." *J Neurochem* **61**(1): 290-297.
- Woudenberg, J., K. P. Rembacz, *et al.* (2010). "Lipid rafts are essential for peroxisome biogenesis in HepG2 cells." *Hepatology* **52**(2): 623-633.
- Xu, J., Y. Liu, *et al.* (2004). "Characterization of oligomeric human half-ABC transporter ATP-binding cassette G2." *J Biol Chem* **279**(19): 19781-19789.

- Yamada, T., Y. Ohyagi, *et al.* (2004). "Therapeutic effects of normal cells on ABCD1 deficient cells in vitro and hematopoietic cell transplantation in the X-ALD mouse model." *J Neurol Sci* **218**(1-2): 91-97.
- Yanagisawa, N., K. Shimada, *et al.* (2008). "Enhanced production of nitric oxide, reactive oxygen species, and pro-inflammatory cytokines in very long chain saturated fatty acid-accumulated macrophages." *Lipids Health Dis* **7**: 48.
- Yang, Y., Y. Liu, *et al.* (2007). "Regulation of function by dimerization through the amino-terminal membrane-spanning domain of human ABCC1/MRP1." *J Biol Chem* **282**(12): 8821-8830.
- Zerhusen, B., J. Zhao, *et al.* (1999). "A single conductance pore for chloride ions formed by two cystic fibrosis transmembrane conductance regulator molecules." *J Biol Chem* **274**(12): 7627-7630.
- Zhang, J. and M. A. Lazar (2000). "The mechanism of action of thyroid hormones." *Annu Rev Physiol* **62**: 439-466.
- Zhang, X., C. De Marcos Lousa, *et al.* (2011). "Conservation of targeting but divergence in function and quality control of peroxisomal ABC transporters: an analysis using cross-kingdom expression." *Biochem J* **436**(3): 547-557.

ANNEXES

MATERIEL ET METHODES

I. CULTURE CELLULAIRE

I.1. Entretien des cellules H4IIEC3

Les cellules H4IIEC3 proviennent d'une lignée d'hépatome de rat (ATCC : CRL-1600). Les cellules sont cultivées dans un milieu DMEM/HAM-F12 (1:1) contenant 5% de sérum de veau fœtal et 1 mM de sodium pyruvate, dans une atmosphère à 37°C, sous 5% de CO₂ et humidité saturante. Le milieu de culture est renouvelé tous les 2 jours.

I.2. Entretien du clone cellulaire 28.38

Le clone 28.38 issu d'une double transfection stable des cellules H4IIEC3, est cultivé dans les mêmes conditions que les cellules H4IIEC3. Deux antibiotiques, le G418 (généticine, InvivoGen) et l'hygromycine B (InvivoGen), sont ajoutés (200 µg.mL⁻¹) au milieu de culture classique pour assurer le maintien de la pression de sélection.

I.3. Entretien des fibroblastes cutanés humains

La lignée de fibroblastes cutanés issue d'un patient atteint d'X-ALD (Coriell, # GM 17819) et la lignée de fibroblastes « Wild-Type » (Coriell, # GM 03348), sont cultivées en absence d'antibiotiques dans du milieu DMEM contenant 10% de sérum de veau fœtal et 1 mM de sodium pyruvate, dans une atmosphère à 37°C, sous 5% de CO₂ et humidité saturante. Le milieu est renouvelé tous les 2 jours.

I.4. Décrochage à la trypsine/EDTA

Le passage des cellules s'effectue lorsque les cellules deviennent confluentes. Le milieu de culture complet est éliminé puis les cellules sont lavées avec du PBS 1X (« Phosphate Buffer Saline ») avant d'être détachées du fond de la boîte par ajout de trypsine 0,25% / EDTA 1 mM. Après ajout de milieu de culture complet, les cellules sont centrifugées à 200 g pendant 5 min et le culot de cellules est repris dans du milieu complet. Les cellules sont alors comptées (cellule de Malassez double standard, non modifiée) et réensemencées à la densité choisie.

I.5. Congélation des cellules

Les cellules à confluence sont détachées par traitement à la trypsine 0,25%/EDTA 1 mM puis reprises dans le mélange SVF 90%/diméthylsulfoxyde 10% à raison de 1.10^6 cellules.mL⁻¹. Elles sont ensuite congelées à -80°C avant d'être conservées dans l'azote liquide.

I.6. Clonage par dilution limite

Le sous-clonage par dilution limite du clone 28 s'effectue dans des plaques 96 puits dont les puits ont préalablement été traités soit avec une solution de fibronectine 12,5 mg.mL⁻¹ / gélatine 0,02% / PBS 1X, soit avec une solution aqueuse de poly-L-lysine 0,1 mg.mL⁻¹, pendant 5 min. Après deux lavages avec du PBS 1X et 2h d'incubation à température ambiante afin de sécher les puits, le clone 28 est ensemencé à raison de 0,05 ; 0,5 et 5 cellules par puits, dans 180 µL de milieu conditionné au 1/3 (2/3 de milieu complet et 1/3 de milieu conditionné contenant des facteurs de croissance et des cytokines). Le milieu conditionné a été obtenu en récupérant le milieu de culture complet utilisé pour cultiver les cellules H4IIEC3 non transfectées, puis en le filtrant (filtre 0,45 µm). La pression sélective est maintenue par deux antibiotiques, l'hygromycine B à 200 µg.mL⁻¹ et la généticine à 200 µg.mL⁻¹. Après 4 semaines de croissance, les clones sont visibles à l'œil nu et les clones isolés sont récupérés par trypsination puis mis en expansion en passant progressivement de puits de plaques 24 puits à des plaques 6 puits. Lorsque les clones arrivent à confluence, 2 puits de plaque 96 puits sont ensemencés à raison de 100.10^3 cellules par puits pour chaque clone, et 24h après ensemencement, la doxycycline à 2 µg.mL⁻¹ est ajoutée dans le milieu de culture d'un puits sur les deux afin d'induire l'expression d'ABCD2-EGFP. Après 17h d'incubation, la sélection des clones est réalisée par cytométrie en flux en fonction de leur niveau de fluorescence EGFP.

II. TECHNIQUES D'ANALYSE DES CELLULES

II.1. Immunofluorescence

Les cellules sont ensemencées dans des puits de plaques 24 puits contenant 1 mL de milieu de culture et dans lesquels une lamelle en verre de 12 mm de diamètre a été placée. Après 24 à 48 heures de culture, les cellules sont lavées 3 fois dans du PBS 1X puis fixées en

paraformaldéhyde 4% pendant 10 min. Afin d'éliminer les groupements aldéhydes libres, les lamelles sont lavées 3 fois dans du PBS 1X, puis 2 fois 5 min dans du PBS 1X / glycine 0,1 M. Après 3 nouveaux lavages dans du PBS 1X, les membranes cellulaires sont perméabilisées 10 min à température ambiante avec la solution « FACS permeabilizing solution 2 » (BD-Bioscience), puis lavées 3 fois dans du PBS-S (PBS 1X / saponine 0,05%). Selon les types cellulaires, les récepteurs Fc situés à la surface des cellules sont saturés pendant 20 min dans du PBS-S / sérum de rat 5% (étape réalisée sur les hépatomes de rat, mais pas sur les fibroblastes cutanés humains). Les cellules sont lavées 3 fois dans du PBS-S avant de les incuber pendant 20 min avec l'anticorps primaire dilué dans du PBS-S (Tableau 13). Trois lavages en PBS 1X / saponine 0,05% sont effectués afin d'éliminer les anticorps non fixés. Une incubation avec l'anticorps secondaire dilué dans du PBS-S est effectuée à l'obscurité pendant 20 min (Tableau 13). Trois lavages en PBS 1X sont effectués avant de marquer les noyaux au Hoechst 33342 (2 µg/mL), 5 min à température ambiante. Enfin, trois lavages en PBS 1X sont effectués avant de monter les lamelles en Fluorsave (Merck) sur des lames, qui seront mises à sécher sur la nuit à l'obscurité, puis observées en microscopie confocale (LEICA TCS SP2, Centre de Microscopie INRA Dijon/Université de Bourgogne, Dijon).

| ANTIGENE | Type d'anticorps / espèce | Dilution | Source |
|---------------|-------------------------------|----------|---|
| ABCD1 | Polyclonal / Lapin | 1/1 000 | Fourni par le Pr Aubourg (Fouquet, Zhou et al.1997) |
| ABCD3 | Polyclonal / Lapin | 1/100 | Obtenu au laboratoire (Albet, Causeret et al. 1997) |
| PMP22 | Polyclonal / Lapin | 1/100 | Obtenu au laboratoire |
| GFP | Monoclonal / Souris | 1/500 | Roche |
| Catalase | Monoclonal / Souris | 1/100 | Abcam, # ab16771 |
| IgG de Lapin | Monoclonal-Alexa 594 / Chèvre | 1/1 000 | Invitrogen, # A11072 |
| IgG de Souris | Monoclonal-Alexa 594 / Chèvre | 1/1 000 | Invitrogen, # A11020 |

Tableau 13 : Anticorps utilisés lors des expériences d'immunofluorescence

II.2. Cytométrie en flux

Les cellules sont collectées par trypsination avec une solution de trypsine 0,25% / EDTA 1 mM et fixées 10 min dans du paraformaldéhyde 1% / PBS 1X. Les membranes cellulaires sont perméabilisées 10 min à température ambiante avec la solution « FACS permeabilizing solution 2 » (BD-Biosciences). Après un lavage dans du PBS 1X, les cellules sont

resuspendues dans du paraformaldéhyde 1% / PBS 1X et analysées par un cytomètre analyseur équipé d'un laser argon émettant à 488 nm (FACS Calibur, Hôpital du Bocage, Dijon). La fluorescence de l'EGFP est collectée à l'aide d'un filtre à bande passante (FL1 520 nm +/-10) et le signal de fluorescence est représenté sur une échelle logarithmique. Les données sont ensuite analysées avec le logiciel FlowJo (FlowJo Inc).

III. METHODES BIOCHIMIQUES D'ANALYSE

III.1. Lyse des cellules

Les cellules à confluence dans des boîtes de culture de 10 cm de diamètre sont lavées deux fois avec du PBS 1X froid avant d'être lysées par 0,5 mL de tampon de lyse (Tableau 14), 30 min à 4°C. Le lysat récupéré est centrifugé à 20 000 g pendant 10 min à 4°C. Le surnageant postnucléaire est délicatement prélevé puis les protéines totales sont dosées.

| Techniques | Tampons de lyse utilisés |
|---------------------------------------|--|
| Lyse "classique" | NaCl 150 mM Tris-HCl 50 mM pH 7,5 Triton X-100 1 % Mélange d'inhibiteurs de protéase (Roche) + PMSF 1 mM |
| Sédimentation sur gradient de sucrose | NaCl 150 mM Tris-HCl 50 mM pH 7,5 • SDS 1 % • β -DDM 1 % • α -DDM 1 % • Triton X-100 1 % Mélange d'inhibiteurs de protéase (Roche) + PMSF 1 mM |
| Immunoprécipitation | NaCl 100 mM Tris-HCl 100 mM pH 8 EDTA pH8 10 mM Triton X-100 1 % Mélange d'inhibiteurs de protéase (Roche) + PMSF 1 mM |

Tableau 14 : Tampons de lyse utilisés pour les lyses "classiques" et les expériences de sédimentation sur gradient de sucrose, d'immunoprécipitation.

III.2. Dosage des protéines

III.2.1. Méthode de Bradford

Les protéines totales sont dosées selon la méthode de Bradford dans des cuves pour spectrophotomètre. Chaque cuve contient 2 μ L de lysat cellulaire et 200 μ L de réactif de

Bradford (Biorad) dans un volume final de 1,2 mL. Les dosages sont réalisés en triplicat. La réaction de Bradford est également effectuée sur une gamme étalon de BSA (« Bovine Serum Albumin », Sigma) avec de quantités de BSA de 0 ; 1 ; 2 ; 5 ; 10 ; 15 et 20 µg. L'absorbance est mesurée à 595 nm (spectrophotomètre UV-1800, Shimadzu).

III.2.2. Dosage des protéines avec le réactif BCA (« BiCinchoninic Acid »)

Le protocole suivi est fourni dans le kit « Quantipro BCA Assay kit » commercialisé par la société Sigma (# QPBCA). Les protéines totales sont dosées en duplicat dans des puits de plaque 96 puits. Chaque puits contient 25 µL d'échantillon protéique (échantillon à doser ou gamme d'étalonnage : 0 ; 2,5 ; 5 ; 10 ; 15 ; 20 et 25 µg de BSA) et 200 µL de réactif BCA. Après 30 min d'incubation à 37°C, l'absorbance est mesurée à 570 nm (lecteur de plaque).

III.3. Gel d'électrophorèse des protéines

Les échantillons protéiques sont dénaturés dans du tampon Laemmli 2X (urée 8 M, β-mercaptoéthanol 700 mM, SDS 2%, glycérol 10%, Tris-HCl pH 6,8 125 mM et bleu de bromophénol). Les protéines contenues dans ces échantillons ainsi que le marqueur de taille (Biorad "Precision Plus protein standards" de 250 à 10 kDa, # 161-0374) sont séparées en fonction de leur masse moléculaire sur un gel de polyacrylamide à 7,5% (gel de concentration : acrylamide : bisacrylamide 37,5 : 1 3% ; Tris-HCl pH 6,8, 125 mM ; SDS 0,1%, APS 0,1% ; TEMED 0,78 µg/mL ; gel de séparation : acrylamide : bisacrylamide 37,5 : 1, 7,5% ; Tris-HCl pH 8,8, 375 mM ; SDS 0,1%, APS 0,05% ; TEMED 0,78 µg/mL). La migration s'effectue pendant environ 2h à 25 mA / gel dans le tampon de migration (Tris-HCl pH 8,8, 25 mM, glycine 192 mM et SDS 0,1%).

III.4. Western-blotting

Après migration en électrophorèse sur gel de polyacrylamide, les protéines sont transférées pendant 1h (100 V) sur une membrane de polyvinylidène difluoride (PVDF). La membrane est saturée pendant 1h à température ambiante sous agitation dans du PBS 1X / Tween 20 0,1% (PBS-T) / lait écrémé 5% (m/V). L'incubation avec l'anticorps primaire (Tableau 15) dilué dans du PBS-T / lait écrémé 1% se déroule à température ambiante, 1h sous agitation.

Après 5 lavages de 5 min dans du PBS-T, la membrane est incubée 1h à température ambiante sous agitation avec un anticorps secondaire couplé à la peroxydase (HRP, « Horse Radish Peroxidase ») (Tableau 15) dilué dans du PBS-T / lait écrémé 1% et qui permet après 5 lavages de 5 min en PBS-T de détecter les complexes antigènes / anticorps par chimioluminescence (ECL, « Enhanced Chemiluminescence Light », Amersham Biosciences).

| ANTIGENE | Type d'anticorps / espèce | Dilution | Source |
|---------------|---------------------------|----------|---|
| ABCD1 | Polyclonal / Lapin | 1/3 000 | Fourni par le Pr Aubourg (Fouquet, Zhou et al. 1997) |
| ABCD1 | Polyclonal / Lapin | 1/5 000 | Obtenu au laboratoire (lapin n°925029) |
| ABCD2 | Polyclonal / Lapin | 1/1 000 | Obtenu au laboratoire (lapin PA4961) |
| ABCD3 | Polyclonal / Lapin | 1/200 | Obtenu au laboratoire (lapin F) (Albet, Causeret et al. 1997) |
| GFP | Monoclonal / Souris | 1/1 000 | Roche |
| HSC70 | Monoclonal / Souris | 1/200 | Santa Cruz, #B0703 |
| IgG de Lapin | Monoclonal-HRP / Chèvre | 1/10 000 | Santa Cruz, #B1711 |
| IgG de Souris | Monoclonal-HRP / Chèvre | 1/5 000 | Santa Cruz, #C2011 |

Tableau 15 : Anticorps utilisés lors des expériences de Western-blotting.

IV. INTERACTIONS PROTEINE-PROTEINE ET ISOLEMENT DE COMPLEXES PROTEIQUES

IV.1. « *In situ* Proximity Ligation Assay » (PLA)

Le clone 28.38 estensemencé à raison de 2.10^5 cellules par chambre, sur des lames de culture Lab-Tek de 16 chambres (Nunc). Avant ensemencement, les chambres sont préalablement traitées avec une solution aqueuse de poly-L-lysine à $0,1 \text{ mg.mL}^{-1}$ pendant 5 min. Après 24 heures de culture, les cellules sont traitées ou non avec de la doxycycline ($2 \mu\text{g/mL}$), puis remises en culture durant 48 heures. Elles sont ensuite lavées 3 fois dans du PBS 1X puis fixées en paraformaldéhyde 4% pendant 10 min. Afin d'éliminer les groupements aldéhydes libres, les cellules sont lavées 3 fois dans du PBS 1X, puis 2 fois 5 min dans du PBS 1X / glycine 0,1 M. Après 3 nouveaux lavages dans du PBS 1X, les membranes cellulaires sont

perméabilisées 10 min à température ambiante avec la solution « FACS permeabilizing solution 2 » (BD-Bioscience), puis lavées 3 fois dans du PBS-S (PBS 1X / saponine 0,05%). Les récepteurs Fc situés à la surface des cellules sont saturés pendant 20 min dans du PBS-S / sérum de rat 5%. Les cellules sont lavées 3 fois dans du PBS-S avant de les incuber pendant 20 min avec un couple d'anticorps primaires, dilué dans du PBS-S / sérum de rat 2% (Tableau 13). Trois lavages en PBS 1X / saponine 0,05% sont effectués afin d'éliminer les anticorps non fixés. Les étapes successives d'incubation des cellules avec des anticorps secondaires couplés à des sondes PLA (sondes ADN), d'hybridation et d'amplification des sondes, puis de révélation par fixation d'une sonde fluorescente rouge, sont décrites dans le protocole fourni avec le kit (Olink Biosciences). Finalement, les lames sont montées avec le milieu de montage Duolink et mises à sécher avant d'être observées en microscopie confocale (LEICA TCS SP2, Centre de Microscopie INRA Dijon/Université de Bourgogne, Dijon).

IV.2. Sédimentation sur gradient de sucre

Les protéines et complexes protéiques peuvent être séparés par ultracentrifugation sur des gradients de sucre où, au cours de cette centrifugation, les particules vont se stabiliser à un point du gradient correspondant à leur propre densité. Le sous-clone 28.38 induit (doxycycline 2 µg/mL) est lysé à 4°C en présence de SDS 1%, β-DDM 1%, α-DDM 1% ou Triton X-100 1% (Tableau 14). Un volume de 400 µL de surnageant contenant 2,5 mg de protéine est déposé sur un gradient discontinu de sucre 5-30% (m/V) (2,5 mL 30%, 2 mL 20%, 2 mL 15%, 2 mL 10% et 2 mL 5% de sucre dissous en tampon de lyse). La sédimentation est réalisée par ultracentrifugation à 260 000 g (rotor SW41, Beckman), 12h, à 4°C pour les gradients contenant du DDM, ou du triton X-100 et à température ambiante pour les gradients contenant du SDS. A l'équilibre, 22 fractions de 0,5 mL sont récupérées en partant du haut du gradient, et les protéines contenues dans 40 µL de fraction sont analysées par électrophorèse sur gel de polyacrylamide suivie d'un Western-blotting.

La linéarité du gradient non chargé en protéines est confirmée par mesure de l'indice de réfraction des 22 fractions de 0,5 mL récupérées à partir du haut du gradient. Le gradient de sucre 5-30% est étalonné par sédimentation de manière séparée de 4 mg de marqueur correspondant à des protéines oligomériques : thyroglobuline, tétramère de 669 kDa ; catalase, tétramère de 232 kDa ; β-amylase, tétramère de 200 kDa ; ou à des protéines monomériques : conalbumine (75 kDa) et ovalbumine (44 kDa) (« Gel Filtration HMW

Calibration Kit » GE Healthcare, # 28-4038-42). Après ultracentrifugation des différents gradients de sucrose, les marqueurs protéiques sont détectés dans les 22 fractions de 0,5 mL collectées par mesure directe de l'absorbance à 280 nm.

IV.3. Fixation covalente d'anticorps à des billes d'agarose

L'objectif est de fixer de façon covalente un anticorps à des billes d'agarose (anticorps polyclonal anti-ABCD1 fourni par le Pr Aubourg (Fouquet *et al.* 1997) et anticorps polyclonal anti-ABCD3 -Lapin F- obtenu au laboratoire (Albet *et al.* 1997). La stratégie consiste à utiliser la protéine A-sépharose (PAS, Sigma, # P-3391), constituée de billes de sépharose (polymère d'agarose) recouvertes de protéine A qui fixe le fragment Fc des anticorps. Une fois fixés sur la PAS, les anticorps sont immobilisés de façon covalente à l'aide d'un agent de couplage, le diméthyle pimélimidate qui lie les groupements amines libres. Le protocole a été adapté d'une publication (Bons *et al.* 2008). Une fois repris dans du tampon A à pH 8 (NaH_2PO_4 0,02 M, NaCl 0,15 M), 100 mg de PAS ($\approx 400 \mu\text{L}$) sont saturés avec 10 mL de PBS 1X / BSA 1 g.L⁻¹ durant 10 min, à température ambiante et sous agitation rotative. Les billes sont ensuite culottées par centrifugation, puis sont incubées en présence de 70 μg d'anticorps dilués dans 10 mL de PBS 1X / BSA 1 g.L⁻¹ durant 1 heure, à température ambiante et sous agitation rotative. Après 2 lavages en PBS 1X, les anticorps fixés à la PAS sont immobilisés sur les billes par une solution de PBS 1X / triéthanolamine 200 mmol.L⁻¹ / diméthyle pimélimidate 20 mmol.L⁻¹ (pH 8-9) (ajouté juste avant utilisation). Après 30 min d'incubation à température ambiante et sous agitation rotative, les billes sont lavées en PBS 1X / triéthanolamine 200 mmol.L⁻¹. Les étapes de couplage covalent et de lavage sont effectuées 2 fois. Les groupements amines réactifs sont ensuite inactivés dans du PBS 1X / éthanolamine 50 mmol.L⁻¹, 1 heure à température ambiante et sous agitation rotative. Les anticorps non immobilisés sur les billes sont élués par deux incubations successives de 20 min à 56°C, dans une solution de glycine-HCl (pH 3) 1 mol.L⁻¹. Les billes sont ensuite conservées à 4°C dans du PBS 1X / Tween 20 0,02% (V/V) / sodium azide 0,2 g.L⁻¹.

IV.4. Immunoprécipitation

La stratégie consiste à utiliser des billes d'agarose, couplées de façon covalente à un anticorps dirigé contre la protéine ABCD1 ou ABCD3, ainsi que des billes d'agarose couplées à un anticorps anti-GFP (MBL # D153-8). Afin de diminuer les interactions non spécifiques, le

lysate cellulaire est préincubé deux fois avec 100 µL de billes d'agarose (MBL # AG-1000) pendant 1h minimum à 4°C sous agitation rotative. Les protéines du surnageant récupérées sont dosées puis une quantité variable de protéines totales (1600, 800 et 400 µg) est ensuite incubée en présence des billes d'agarose couplées à l'anticorps, dans un volume final de 250 µL, pendant 2h à 4°C sous agitation rotative. Le culot (complexe antigène/anticorps-billes d'agarose) obtenu suite à une centrifugation et après récupération de la fraction non retenue, est lavé 3 fois en tampon de lyse. A la fin du dernier lavage, le culot est resuspendu dans 50 µL de tampon Laemmli 2X afin de récupérer les complexes protéiques fixés sur les billes (fraction d'élution). Les fractions d'élution sont ensuite analysées par électrophorèse sur gel de polyacrylamide suivie d'un Western-blotting.

IV.5. Préparation de membranes cellulaires totales

La préparation de membranes cellulaires totales est réalisée à partir du clone 28.38 en culture, traité à la doxycycline (2 µg.mL⁻¹) durant 20 heures. Les cellules à confluence sont lavées 2 fois en PBS 1X avant d'être détachées du fond de la boîte par ajout de trypsine 0,25% / EDTA 1 mM, et centrifugées à 200 g pendant 5 minutes. Les cellules reprises dans un tampon hypo-osmotique (tampon I : Tris-HCl 10 mM pH 7,5 ; sucrose 250 mM ; MgCl₂ 0,2 mM + cocktail d'inhibiteurs de protéase Roche et PMSF 1 mM « PhenylMethaneSulfonylFluoride ») sont éclatées grâce à un homogénéisateur de type Dounce (Dounce A). Après ajout d'EDTA 1 mM (concentration finale), l'homogénat est dilué cinq fois dans du tampon II (Tris-HCl 10 mM pH 7,5 ; sucrose 25 mM) avant d'être centrifugé à 1 000 g 4°C durant 15 min, afin d'éliminer les noyaux et les cellules non lysées. Le surnageant est alors ultracentrifugé pendant 45 min à 100 000 g à 4°C. Le culot de membranes est repris dans du tampon IV (Tris-HCl 10 mM pH 7,5 ; sucrose 250 mM), en présence d'inhibiteurs de protéase (Roche) et de PMSF 1 mM, avant d'être conservé à -80°C.

IV.6. Purification de peroxysomes

La purification de peroxysomes est réalisée à partir de 3 grosses boîtes (14 cm de diamètre) de clone 28.38 à confluence, traité durant 20 heures avec de la doxycycline 2 µg.mL⁻¹. Après 3 lavage en PBS 1X, les cellules sont rapidement lavées avec le tampon d'homogénéisation froid (sucrose 0,25 M ; Tris-HCl 5 mM pH 7,4 ; EDTA 1mM ; Ethanol 0,1%). Elles sont ensuite récupérées dans 2 mL de tampon d'homogénéisation (tampon hypo-osmotique) à

l'aide d'un grattoir. La suspension cellulaire est alors diluée quatre fois dans le même tampon avant d'éclater les cellules dans un homogénéisateur (Dounce B). La fraction peroxysomale contenant en théorie les peroxysomes intacts (fraction légère contenant les peroxysomes ainsi que les mitochondries légères et les lysosomes) est ensuite récupérée par centrifugations différentielles (Ghosh *et al.* 1986). L'homogénat obtenu est centrifugé pendant 15 min à 1 000 g à 4°C. Le culot C1 contient les débris cellulaires et les noyaux. Le surnageant S1 est ensuite centrifugé pendant 10 min à 3 000 g à 4°C. Le deuxième surnageant (S2) est alors récupéré puis ultracentrifugé pendant 10 min à 25 000 g à 4°C. Le culot C3 contenant notamment les peroxysomes intacts, est repris dans 10 mL de tampon d'homogénéisation et conservé à -80°C.

IV.7. Electrophorèse native en présence de Dériphat et transfert des protéines sur membrane

Les échantillons déposés sur gel sont préparés à partir de membranes totales et de fractions enrichies en peroxysomes. Afin de récupérer les membranes ou les peroxysomes, les préparations sont centrifugées à 20 000 g durant 30 min à 4°C. Après centrifugation, les culots sont resuspendus dans du tampon de lyse (NaCl 150 mM, Tris-HCl 50 mM pH8, mélange d'inhibiteurs de protéase (Roche), PMSF 1 mM), en présence d' α -DDM (de 0,1% à 1%). Les protéines sont alors solubilisées durant 30 min à 4°C. Les échantillons sont ensuite centrifugés 20 min à 20 000 g (4°C) et les protéines solubilisées sont récupérées dans le surnageant. Avant dépôt, les échantillons protéiques sont repris dans du tampon de charge 4 X (Glycérol 40%, Tris-HCl 48 mM, glycine 384 mM, bleu de bromophénol et 0,1 à 1% d' α -DDM). Afin d'étalonner le gel, un marqueur de poids moléculaire est également déposé (« Native Mark Unstained Protein Standard », # LC0725, Invitrogen), constitué de protéines oligomériques de poids moléculaires allant de 20 kDa à 1048 kDa.

Le gel d'électrophorèse utilisé est commercialisé par la société Invitrogen (# BN1002BOX). Il présente un gradient de 4 à 16% en acrylamide / bis-acrylamide. Le tampon de migration à l'anode est composé de Tris-HCl 12 mM pH 8,3 et de glycine 96 mM, tandis que le tampon de migration à la cathode est composé de L-Histidine 100 mM pH 8 (ajusté avec une solution de Tris-base 2M) et de Dériphat 0,1% (Anatrace). Une pré-migration de 2 heures à 300 volts et à 4°C, est réalisée en absence d'échantillon, afin d'équilibrer le gel d'électrophorèse. La migration des échantillons s'effectue ensuite durant 12h 30 min, à 50 volts et à 4°C.

Après migration, le gel est incubé 15 min dans un tampon d'équilibration composé de SDS 0,1% et de tampon de transfert NuPAGE 1X (Invitrogen, # NP0006-1). Les protéines sont ensuite transférées pendant 1h (100 V) sur une membrane de PVDF, dans du tampon de transfert NuPAGE 1X / Méthanol 10% / SDS 0,01%. Pour finir, elles sont fixées sur la membrane en l'incubant 15 min dans de l'acide acétique 10%. Après plusieurs lavages à l'eau distillée, la membrane est séchée, puis réhydratée dans du méthanol pur, avant d'être de nouveau lavée à l'eau distillée.

V. OUTILS DE BIOLOGIE MOLECULAIRE

V.1. Mini-préparation plasmidique

Les bactéries DH5- α transformées par un plasmide sont étalées sur boîte de Petri contenant le milieu LB (« Luria Broth »)-agar et un antibiotique de sélection (ampicilline 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ou kanamycine 40 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, selon le vecteur d'expression). Les boîtes sont ensuite placées à 37°C sur la nuit. Le lendemain, un clone isolé est repiqué dans 2 mL de milieu LB contenant un antibiotique de sélection et mis en culture dans un agitateur orbital à 220 rpm et à 37°C sur toute la journée.

Un aliquot de 1 mL est centrifugé 5 minutes à 4°C à 1 700 g. Le culot est resuspendu dans 200 μL de Tris-EDTA (50 mM-10 mM), puis les bactéries sont lysées par ajout de 200 μL de NaOH 0,2N / SDS 1%. Les débris cellulaires sont précipités pendant 2 min par 200 μL de potassium-acétate (3M-5M), puis culotés par une centrifugation de 5 min à 18 000 g à 4°C. Le surnageant contenant l'ADN plasmidique est prélevé et mélangé à un volume de phénol-chloroforme-alcool isoamylique (25:24:1) puis centrifugé 15 minutes à 20 000 g. La phase supérieure (phase aqueuse) est récupérée, puis l'ADN plasmidique est précipité par un volume d'isopropanol. Après 5 min de centrifugation à 18 000 g à température ambiante, le culot d'ADN est séché puis resuspendu dans 30 μL d'eau milliQ-RNase (400 $\mu\text{g/mL}$). Les mini-préparations plasmidiques sont ensuite analysées par digestions enzymatiques, puis amplifiées et purifiées par midi-préparation plasmidique.

V.2. Midi-preparation plasmidique

Les bactéries DH5- α transformées par un plasmide sont étalées sur boîte de Petri contenant le milieu LB-agar et un antibiotique de sélection (ampicilline 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ou kanamycine 40 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, selon le vecteur d'expression). Les boîtes sont ensuite placées à 37°C sur la nuit. Le lendemain, un clone isolé est repiqué dans 2 mL de milieu LB contenant un antibiotique de sélection et mis en culture dans un agitateur orbital à 220 rpm et à 37°C sur toute la journée. Cette pré-culture est utilisée pour ensemercer au 1/1000, 100 mL de milieu LB contenant un antibiotique de sélection. Cette midi-culture est placée sur la nuit dans un agitateur orbital à 220 rpm et à 37°C. Après centrifugation à 6 000 g à 4°C durant 10 min, le culot bactérien est utilisé pour réaliser une midi-préparation d'ADN plasmidique à l'aide du kit « QIAGEN Plasmid Midi » (# 12143). Le principe de cette purification repose sur la fixation de l'ADN plasmidique sur une colonne échangeuse d'anions sous des concentrations en sel et pH optimum, suivie d'une élution avec un tampon de forte concentration saline. L'ADN est ensuite précipité par de l'isopropanol. Après une centrifugation de 30 min minimum à 8 600 g et à 20°C, l'ADN plasmidique est repris dans 200 μL d'eau ultra pure. Les midi-préparations plasmidiques sont ensuite analysées par digestions enzymatiques et dosées.

V.3. Digestion enzymatique

V.3.1. Digestion analytique

Les plasmides issus de la mini-préparation (2 μL) ou de la midi-préparation (500 ng) sont digérés pendant 1h à 37°C par 0,3 μL d'enzyme de restriction, en présence de tampon de digestion 1X adapté à l'enzyme, dans un volume final de 15 μL . L'échantillon est ensuite repris dans du tampon de charge 6X (Promega, # R0611), puis analysé par électrophorèse sur gel d'agarose. Afin d'évaluer la taille des fragments nucléotidiques, un marqueur de taille est également déposé sur le gel d'agarose ($\lambda\text{DNA/Hind III}$, Promega, # SM0102).

V.3.2. Digestion préparative

Dix μg de plasmide sont digérés pendant 3h à 37°C, par 3 μL d'enzyme de restriction, en présence du tampon de digestion 1X adapté à l'enzyme, dans un volume final de 100 μL . La

digestion est ensuite analysée par électrophorèse sur gel d'agarose. Afin d'évaluer la taille des fragments nucléotidiques, un marqueur de taille est également déposé (λ DNA/Hind III).

Après digestion, les inserts sont séparés par électrophorèse sur gel d'agarose (type LM SIEVE, Euromedex, # LMS-C) 1%, puis purifiés à l'aide du kit « Qiaquick Gel Extraction »¹³.

V.4. Purification d'insert et de vecteur

V.4.1. Précipitation d'ADN

Afin de purifier l'ADN plasmidique suite à une digestion enzymatique, celui-ci peut-être précipité à l'acétate de sodium 3 M dilué au 1/10, en présence de 2,5 volumes d'éthanol absolu. Après 1h minimum d'incubation à -20°C et une centrifugation à 20 000 g 4°C durant 20 min, le culot d'ADN est repris dans un volume adéquat d'eau ultra pure.

L'ADN plasmidique peut également être précipité à l'acétate d'ammonium qui présente la particularité de ne pas précipiter les petits fragments d'ADN et permet donc d'éliminer les petits fragments d'ADN obtenus suite à la digestion enzymatique de vecteurs d'expression, quand cela est nécessaire. L'ADN est précipité par de l'acétate d'ammonium 10 M dilué 5 fois et 2,5 volumes d'éthanol absolu. Après 1h minimum d'incubation à -20°C et une centrifugation à 20 000 g 4°C durant 20 min, le culot d'ADN est repris dans un volume adéquat d'eau ultra pure.

V.4.2. Purification à l'aide du kit « Qiaquick Gel Extraction » (Qiagen, # 28704)

Ce kit est utilisé pour purifier un fragment d'ADN (de 70 pb à 10 kb) récupéré après électrophorèse sur gel d'agarose (type LM SIEVE) 1%, mais également pour purifier l'ADN plasmidique suite à une digestion enzymatique préparative. Après fixation sur une colonne échangeuse d'ions, l'ADN est finalement élué par 30 μ L d'eau (pH 7,0-8,5), ou de tampon Tris-HCl 10 mM pH 8,5.

¹³ Voir page 207 : Purification à l'aide du kit « Qiaquick Gel Extraction »

V.4.3. Extraction au phénol : chloroforme : alcool isoamylique

A la suite d'une digestion enzymatique préparative, une extraction de l'ADN au phénol : chloroforme : alcool isoamylique peut être réalisée afin d'éliminer les enzymes. Pour ce faire, un volume de phénol : chloroforme : alcool isoamylique (25:24:1) est ajouté à la digestion enzymatique. Après homogénéisation du mélange, celui-ci est centrifugé 15 minutes à 20 000 g. La phase aqueuse supérieure récupérée après centrifugation, contient l'ADN plasmidique.

V.5. Dosage d'ADN

V.5.1. Dosage spectrophotométrique des acides nucléiques totaux

Les acides nucléiques totaux peuvent être dosés en mesurant l'absorbance de l'échantillon à 260 nm, en sachant qu'une unité d'absorbance à 260 nm correspond à 50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ d'ADN double brin.

V.5.2. Dosage d'un fragment nucléique sur gel d'agarose

La quantité d'un fragment nucléique contenue dans une solution (et donc la concentration) peut être déterminée par électrophorèse sur gel d'agarose, en comparant l'intensité de la bande obtenue à partir de l'échantillon, à l'intensité de bandes obtenues à partir du marqueur de poids moléculaire $\lambda\text{DNA}/\text{Hind III}$ qui est calibré.

V.6. Ligation d'insert dans un vecteur

V.6.1. Ligation classique

L'insert et le vecteur ouvert (rapport 3:1 ; 100 à 150 ng d'ADN total), sont incubés sur la nuit à 15°C, en présence de 1 μL de T4 DNA ligase (Promega) et du tampon adapté à l'enzyme, dans un volume final de 10 μL .

V.6.2. Ligation express

L'insert et le vecteur ouvert (rapport 3:1 ; 100 à 150 ng d'ADN total), sont incubés 15 min à température ambiante, en présence de 1 µL de T4 DNA ligase (Promega) et du tampon "express" adapté à l'enzyme, dans un volume final de 10 µL.

V.7. Transformation de bactéries super-compétentes DH5α

Après décongélation dans la glace, 100 µL de bactéries super-compétentes DH5α (Invitrogen #18263-012) sont mélangés avec 1 µL de produit de ligation et incubées 30 min dans la glace. Elles sont ensuite plongées 45 s dans un bain marie à 42°C, avant d'être replacées 2 min dans la glace et diluées dans 900 µL de milieu SOC stérile (fourni avec les bactéries). Les bactéries sont ensuite incubées 1h à 37°C dans un agitateur orbital à 220 rpm, afin de permettre l'expression des gènes de résistance aux antibiotiques par les bactéries transformées. Après centrifugation 3 min à 950 g, le culot bactérien est repris dans 100 µL de milieu LB stérile. Les bactéries sont étalées sur boîte de Petri contenant le milieu LB -agar et un antibiotique de sélection (ampicilline 100 µg.mL⁻¹ ou kanamycine 40 µg.mL⁻¹, selon le vecteur d'expression). Les boîtes sont ensuite placées à 37°C sur la nuit.

VI. CLONAGE DU GENE ABCD1 DE RAT

VI.1. Extraction d'ARN totaux à partir de cellules H4IIEC3

L'extraction des ARN totaux est réalisée à partir de cellules H4IIEC3 (hépatomes de rat) à confluence, à l'aide du kit « RNeasy mini » (Qiagen, # 74104). Après deux lavages en PBS 1X, les cellules en culture sont lysées à l'aide du tampon de lyse RLT fourni dans le kit. Le lysat est ensuite homogénéisé mécaniquement à l'aide d'une seringue de 20 gauge. Les ARN sont ensuite précipités par un volume d'Ethanol à 70%, puis le lysat est transféré sur une colonne "RNeasy Spin" avant d'être centrifugé à 8 000 g pendant 20 s. Après lavages, l'ADN est digéré à la « RNase free DNase » (Qiagen), diluée dans du tampon RDD pendant 20 min à température ambiante. Après trois nouveaux lavages, les ARN totaux sont élués par 30 µL d'eau « RNase-free ».

VI.2. Dosage des ARN totaux

Les ARN totaux extraits sont dosés par spectrophotométrie (spectrophotomètre UV1800 Shimadzu). L'absorbance des échantillons est mesurée entre 240 nm et 320 nm de longueur d'onde. Une unité d'absorbance à 260 nm correspond à 40 $\mu\text{g. mL}^{-1}$ d'ARN totaux. La qualité de l'extraction est jugée par la mesure du ratio $\text{absorbance}_{260\text{ nm}}/\text{absorbance}_{280\text{ nm}}$, qui doit être compris entre 1,8 et 2,2.

VI.3. Transcription inverse

L'objectif de cette étape est de synthétiser des brins d'ADN à partir des ARNm, de façon à obtenir des ADNc (ADN complémentaire). La transcription inverse est réalisée à l'aide du kit « iScript cDNA Synthesis » (Biorad, # 170-8890). L'ARN (1 μg) est mélangé avec 1 μl d'enzyme « iScript reverse transcriptase », 4 μl du tampon adapté à l'enzyme (« iScript reaction mix » 5X), contenant à la fois des dNTP et des amorces universelles (« random hexamer primers »), dans un volume final de 20 μL . Le mélange est ensuite chauffé à 25°C pendant 5 min, puis à 42°C pendant 1h, et enfin à 85°C pendant 5 min. Les ADNc obtenus sont dosés, puis conservés à -20°C jusqu'à leur utilisation.

VI.4. Amplification de l'ADNc d'*ABCD1* par PCR et clonage dans le vecteur pGemTeasy

La séquence ADNc d'*ABCD1* est tout d'abord amplifiée par PCR, à l'aide du kit « Expand High Fidelity PCR System » (Roche, # 11 732 641 001), à partir des ADNc issus de cellules H4IIEC3. Le couple d'amorces utilisé est le suivant : 5'-accagtcaggtgacatgccggtac-3' pour l'amorce sens et 5'-cttcattgtgatccgagagcttggagaa-3' pour l'amorce anti-sens. L'amplification est réalisée à partir de 250 ng d'ADNc, dans un volume final de 50 μL , en présence de 200 μM de chaque dNTP, 1 μM de chaque amorce, 5% de DMSO, 5 μL de tampon de réaction contenant 15 mM MgCl_2 (1X final) et 0,75 μL de mélange enzymatique à 3,5 unités. μL^{-1} . Le programme utilisé comprend une étape initiale de dénaturation de l'ADN de 3 min à 94°C, suivie de 5 cycles de PCR comprenant une dénaturation de 15s à 94°C, un appariement des amorces à 56°C pendant 30 secondes et une étape d'élongation de 2 min à 72°C, puis 25 cycles avec une dénaturation de 15s à 94°C, un appariement des amorces de 30s à 68°C et une étape d'élongation de 2 min à 72°C (+ 5s à chaque cycle). L'étape de

ANNEXES

MATERIEL ET METHODES

polymérisation finale se fait à 72°C pendant 7 minutes. Les amplicons sont ensuite ligués¹⁴ dans le vecteur pGemTeasy (kit « pGemTeasy Vector System I », Promega, # A1360) suivant un ratio 2:1 (50 ng d'amplicon pour 25 ng de vecteur), en présence de 5 µL de tampon de ligation rapide 2X et de 1 µL de T4 DNA ligase 10X (Promega). Le produit de ligation est transformé dans des bactéries DH5-α super-compétentes. Quelques clones sont ensuite analysés par mini-préparation plasmidique, digestions enzymatiques des plasmides obtenus puis électrophorèse analytique. Quelques clones positifs sont finalement vérifiés par séquençage complet de l'insert (société Eurofins MWG-Biotech).

Une fois clonée dans le vecteur pGemTeasy, la séquence ADNc d'*ABCD1* de rat est de nouveau amplifiée, cette fois-ci avec des amorces permettant d'introduire des sites de restriction de part et d'autre de la séquence (insert) (Tableau 16). Certaines amorces permettent en plus d'optimiser les 12 premiers codons de la séquence ADNc d'*ABD1*, afin de permettre son expression chez la levure. D'autres amorces permettent de supprimer le codon STOP de la séquence ADNc d'*ABCD1* (insert destiné à être cloné dans le vecteur pEGFP-N3, codant une protéine qui sera donc fusionnée à l'EGFP en C-terminal). Après amplification par PCR, les inserts sont clonés dans le vecteur pGemTeasy et leur séquence est entièrement vérifiée par séquençage.

| Insert codant ABCD1 en position | Vecteur d'expression | Particularité de l'insert | Amorce sens | Amorce anti-sens | Site de restriction introduit | |
|---------------------------------|------------------------|---|---|--|-------------------------------|--------------|
| | | | | | En amont | En aval |
| N-terminale | pcDNA3.1(-) / pEGFP-N3 | Pas de codon stop | GTCGACATGCCGGTAC TCTCCACT | | <i>Sall</i> | <i>NotI</i> |
| | pEL30 | Séquence optimisée + Pas de codon stop | GGTACCCGGGATGCCA GTTTTGTCTACTCCCTC AGACCCTCGAGAGTG ACCACGCTT | GCGGCCGCAGTGG GGATGCCTGGGAC | <i>KpnI / SmaI</i> | |
| C-terminale | pcDNA3.1(-) / pEL30 | / | GCGGCCGCATGCCG GTACTCTCCACTC | GGATCC TCA AGTGG GGATGCCTGGGAC | <i>NotI</i> | <i>BamHI</i> |
| | pEGFP-N3 | | | Pas de codon stop | | |

Tableau 16 : Amorces utilisées pour l'amplification de la séquence ADNc d'*ABCD1* de rat. Les couples d'amorces varient selon la position (en N- ou C-terminale) du transporteur ABCD1 codé par l'insert, au sein des transporteurs ABCD entiers chimériques, et selon le vecteur d'expression dans lequel sera cloné l'insert.

¹⁴ Voir page 208 : Ligation d'insert dans un vecteur

Les gènes *ABCD2* et *ABCD3* de rat ont été clonés avec la même méthodologie, avant mon arrivée en thèse. Les amorces ayant été utilisées lors de l'amplification des ADNc sont répertoriées dans le Tableau 17.

| Protéine codée | en position | Vecteur d'expression | Particularité de l'insert | Amorce sens | Amorce anti-sens | Site de restriction introduit | |
|----------------|-------------|---|---------------------------|---|--|-------------------------------|--------------|
| | | | | | | En amont | En aval |
| ABCD2 | N-terminale | pcDNA3.1(-) pEGFP-N3 | Pas de <u>codon stop</u> | GGG GTG ACTGGAAA AAT G ATACACATGCT | TGCGGCCGCGGATGT GTCCTCGCAGTTT | <i>Sall</i> | <i>NotI</i> |
| | C-terminale | pcDNA3.1(-) | Pas de <u>codon stop</u> | TGCGGCCG CA TGAT ACACATGCTAAATG | GGGGATCC GTTA GGA TGTGTCCTCTGCA | <i>NotI</i> | <i>BamHI</i> |
| pEGFP-N3 | | GGGGATCCGGATGTG TCCTCGCAGTTT | | | | | |
| ABCD3 | N-terminale | pcDNA3.1(-) pEGFP-N3 | Pas de <u>codon stop</u> | GAG GTG AG CA TGCGG GCCTTCAGCAAGTA | AAGCGGCCGCTGATC CGAACTCAACTGTG | <i>Sall</i> | <i>NotI</i> |
| | C-terminale | pcDNA3.1(-) | Pas de <u>codon stop</u> | AAAGCGGCCG CC ATG GCGGCCTTCAGCAA | ACGGATCC TA TGATCC GAACTCAAGTGTG | <i>NotI</i> | <i>BamHI</i> |
| pEGFP-N3 | | GGGGATCC CT GATCCG AACTCAAGTGTG | | | | | |

Tableau 17 : Amorces utilisées pour amplifier les séquences ADNc d'*ABCD2* et d'*ABCD3* de rat. Les couples d'amorces varient selon la position (en N- ou C-terminale) du transporteur ABCD codé par l'insert, au sein des transporteurs ABCD entiers chimériques, et selon le vecteur d'expression dans lequel sera cloné l'insert.

VII. ETUDE STRUCTURE-FONCTION DES TRANSPORTEURS ABCD PEROXYSOMAUX DANS UN MODELE DE FIBROBLASTES CUTANES ISSUS D'UN PATIENT ATTEINT D'X-ALD

VII.1. Transfection des fibroblastes déficients en *ABCD1*

Pour les expériences de transfection, trois ampoules identiques de fibroblastes à passage 5 (P+5) contenant chacune 1 million de cellules, sont décongelées etensemencées dans 3 grosses boîtes de Petri (14 cm de diamètre). Trois jours plus tard, les cellules sont réensemencées dans 9 grosses boîtes de Petri.

Lors de leur 7^{ème} passage, soit 6 jours après décongélation, les fibroblastes sont transfectés par différents vecteurs d'expression grâce au système AMAXA, à l'aide du kit « NucleofectorTM » (F-08421) recommandé spécifiquement pour la transfection de fibroblastes. Pour une transfection, 500 000 cellules sont culotées durant 5 min à 200 g avant d'être délicatement resuspendues dans 100 µL de solution de nucléofection fournie dans le

kit. Après ajout du vecteur d'expression (1 à 3 μg d'ADN en solution aqueuse stérile), la suspension cellulaire est homogénéisée, puis transférée dans une cuvette appropriée pour l'électroporation. Le programme de nucléofection est alors lancé (P-022 : haute viabilité, ou U-023 : haute transfection). Les cellules transfectées sont ensuite reprises dans 500 μL de milieu RPMI complet (10% de sérum de veau fœtal et 1 mM de sodium pyruvate), pré-équilibré à 37°C, sous 5% de CO_2 et humidité saturante, puisensemencées dans un puits de plaque 6 puits dans un volume final de 1,5 mL de milieu RPMI complet pré-équilibré. Le lendemain, le milieu de culture est remplacé par du milieu DMEM complet, après un lavage des cellules au PBS 1X.

VII.2. Mesure de β -oxydation peroxysomale de fibroblastes cutanés humains

Le principe de la mesure de la β -oxydation d'un AGTLC radiomarqué (^{14}C) sur cellules entières, est illustré dans la Figure 66.

Deux jours après transfection, les fibroblastes (« Wild-Type » ou déficients en *ABCD1* transfectés ou non) sontensemencés dans des flacons de lyophilisation en pyrex stériles, à raison de 300 000 cellules par flacon. Quatre flacons sont nécessaires par point de mesure de β -oxydation (un flacon pour le dosage des protéines¹⁵ et trois flacons pour les répétitions de mesure de β -oxydation).

Soixante-quatre heures après transfection, les cellulesensemencées dans les flacons en pyrex sont lavées 2 fois en PBS 1X avant d'être mises en contact avec 500 μL de « mix » de β -oxydation (C26:0 non radioactif 10 μM ; C26:0 radioactif 4 μM ; α -cyclodextrine 0,5 mg/mL ; carnitine 2 mM ; milieu HamF10 ; HEPES 10 mM à pH 7,3). Les flacons de lyophilisation sont bouchés de manière étanche avec des bouchons en caoutchouc. Les cellules sont ensuite incubées 2 heures au bain-marie à 37°C sous une légère agitation. Le CO_2 radioactif rejeté est piégé par du NaOH 2M introduit dans un tube Eppendorf à l'intérieur du flacon. Afin de stopper la β -oxydation, 100 μL d'acide perchlorique 2,6 N sont introduits dans le flacon à l'aide d'une seringue en perçant le bouchon de caoutchouc. Les flacons sont ensuite placés une nuit à 4°C pour permettre la captation du CO_2 par le NaOH. Le lendemain, la radioactivité est mesurée dans la solution de NaOH ayant captée le CO_2 (comptage du ^{14}C pendant 5 min).

¹⁵ Voir page 199 : Dosage des protéines avec le réactif BCA

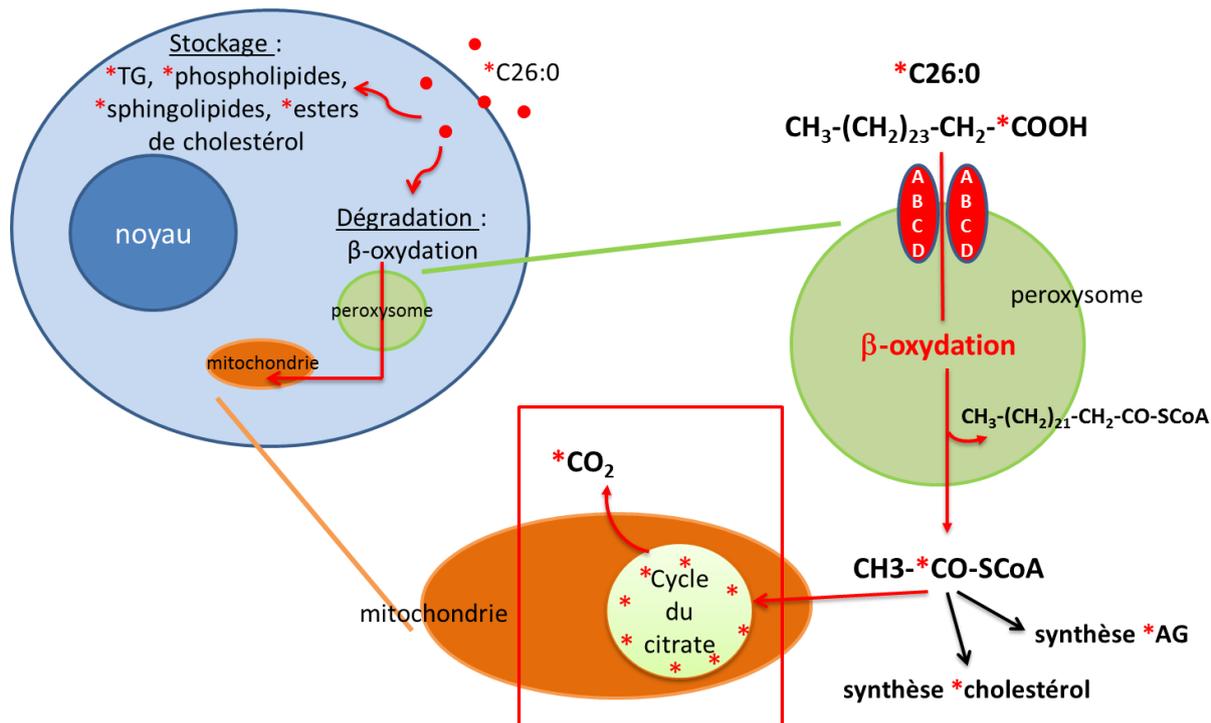


Figure 66 : Principe de la mesure de la β -oxydation du C26:0.

Afin d'évaluer le niveau de β -oxydation du C26:0 dans des fibroblastes cutanés humains, sont mesurées la radioactivité (^{14}C) présente dans le CO_2 rejeté par les cellules, ainsi que la radioactivité présente dans la fraction acido-soluble, recueillant les intermédiaires du cycle du citrate (rectangle rouge).

Avant de mesurer la radioactivité présente dans la fraction acido-soluble contenant entre autres les intermédiaires du cycle du citrate, les acyl-CoA et les esters de cholestérol, dans lesquels le C26:0 radioactif peut être présent (Figure 66), sont éliminés. Une étape de saponification est nécessaire pour les rendre insolubles et s'en débarrasser. Le lysat cellulaire contenu dans le flacon est centrifugé à 700 g durant 5 min afin d'éliminer les débris cellulaires. Après ajout de 200 μL de NaOH 2N à 500 μL de surnageant, le mélange est incubé 30 min à 50°C dans un bain-marie et agité toutes les 10 min. Après incubation, 150 μL d'acétate de sodium 1M et 300 μL de H_2SO_4 sont ajoutés.

Afin de purifier les intermédiaires du cycle du citrate, 3 mL de solution MCH (méthanol : chloroforme : heptane ; 1,41 : 1,25 : 1 ; vol : vol) sont adjoints au mélange. La solution est ensuite centrifugée 5 min à 500 g, permettant d'obtenir deux phases. La phase inférieure (phase organique contenant les AG) est alors éliminée et remplacée par le mélange MCH : H_2O (3,25 : 1,25 vol : vol). Après agitation, la solution est centrifugée 5 min à 500 g, permettant l'obtention de 2 phases. La phase supérieure (1mL) est alors prélevée (phase aqueuse contenant les produits acido-solubles) et la radioactivité présente dans cette fraction est ensuite mesurée (comptage du ^{14}C pendant 5 min).

REVUE MEDECINE/SCIENCES

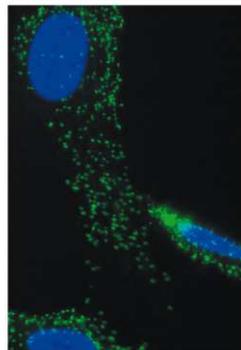


médecine/sciences 2012 ; 28 : 1087-94

► L'adréno-leucodystrophie liée au chromosome X (X-ALD) est une maladie neurodégénérative associée à des mutations dans le gène *ABCD1* qui code pour un transporteur ABC peroxysomal. Mieux connue grâce aux efforts de la fondation ELA (association européenne contre les leucodystrophies) et aux récents succès de thérapie génique publiés dans le journal *Science* en 2009, cette maladie reste néanmoins mal comprise. Le rôle exact d'*ABCD1* et de ses homologues, et le lien exact entre les défauts biochimiques et métaboliques peroxysomaux et les symptômes cliniques de la maladie restent à préciser. Cette revue fait le point de nos connaissances sur la sous-famille D des transporteurs ABC et sur l'X-ALD, la plus fréquente des maladies peroxysomales. ◀

Transporteurs ABC peroxysomaux et adrénoleucodystrophie liée au chromosome X

Flore Geillon, Doriane Tromprier,
Catherine Gondcaille, Gérard Lizard,
Stéphane Savary



Laboratoire Bio-PeroxiL,
biochimie du peroxysome,
inflammation et métabolisme
lipidique EA7270,
université de Bourgogne,
6, boulevard Gabriel,
21000 Dijon, France.
stsavary@u-bourgogne.fr

REVUES



SYNTHÈSE

L'adréno-leucodystrophie liée au chromosome X (X-ALD) est la principale maladie peroxysomale¹ [1]. Elle est causée par des mutations touchant le gène *ABCD1* localisé sur le chromosome X, gène qui code pour un hémi-transporteur ABC (*ATP binding cassette*). La déficience de ce transporteur entraîne un défaut de β -oxydation peroxysomale et une accumulation d'acides gras à très longue chaîne (AGTLC) contenant un nombre d'atomes de carbone supérieur à 22, saturés (acide tetracosahexanoïque C24:0, et acide hexacosanoïque C26:0) et monoinsaturés (C26:1) [2, 3] (Figure 1).

Les transporteurs ABC constituent l'une des plus grandes familles de protéines et sont conservés des bactéries jusqu'à l'homme [4]. Chez les mammifères, les membres les plus connus sont la protéine CFTR (*cystic fibrosis transmembrane regulator*), dont le défaut est associé à la mucoviscidose, et la P-glycoprotéine, impliquée dans le mécanisme de résistance aux traitements anticancéreux. Les transporteurs ABC sont des protéines transmembranaires dont la fonction est de permettre à des substrats variés de franchir différentes membranes de la

cellule grâce à la fixation et à l'hydrolyse de l'ATP. L'unité fonctionnelle minimale d'un transporteur ABC est constituée de deux domaines transmembranaires (TM) et deux domaines cytosoliques (ABC). Les transporteurs ABC ont été classés en sous-familles sur la base d'homologies de séquence. La sous-famille D, chez les mammifères, comprend quatre membres qui sont des hémi-transporteurs (un seul domaine TM et un seul domaine ABC) : ALDP (*ABCD1*), ALDRP (*ABCD2*), PMP70 (*peroxisomal membrane protein 70-kDa, ABCD3*) et PMP69 (*ABCD4*) [5]. Les trois premières protéines sont localisées dans la membrane peroxysomale tandis qu'*ABCD4*, bien qu'initialement décrite dans le peroxysome, est en fait localisée dans le réticulum endoplasmique.¹

Les transporteurs ABC de la membrane peroxysomale

Le peroxysome est un petit organe intracellulaire présent dans toutes les cellules à l'exception des hématies. Ses fonctions métaboliques ont souvent été sous estimées en regard de celles attribuées à la mitochondrie, au lysosome et à l'appareil de Golgi. En fait, c'est un organe cellulaire essentiel et il en est pour preuve l'extrême sévérité des maladies génétiques associées à l'absence de peroxysomes² ou à leurs dysfonctionnements, dont notamment l'X-ALD. Les principales fonctions peroxysomales concernent le métabolisme lipidique, avec l' α - et le β -oxydation des

Vignette (Photo © Stéphane Savary).

¹ Base de données <http://omim.org/entry/300100>

² Les maladies de la biogenèse peroxysomale sont bien plus rares que l'X-ALD. Par ordre décroissant de sévérité, on trouve : le syndrome de Zellweger, l'adréno-leucodystrophie néonatale et la maladie infantile de Refsum. Il faut y ajouter la chondrodysplasie rhyzomélique ponctuelle.

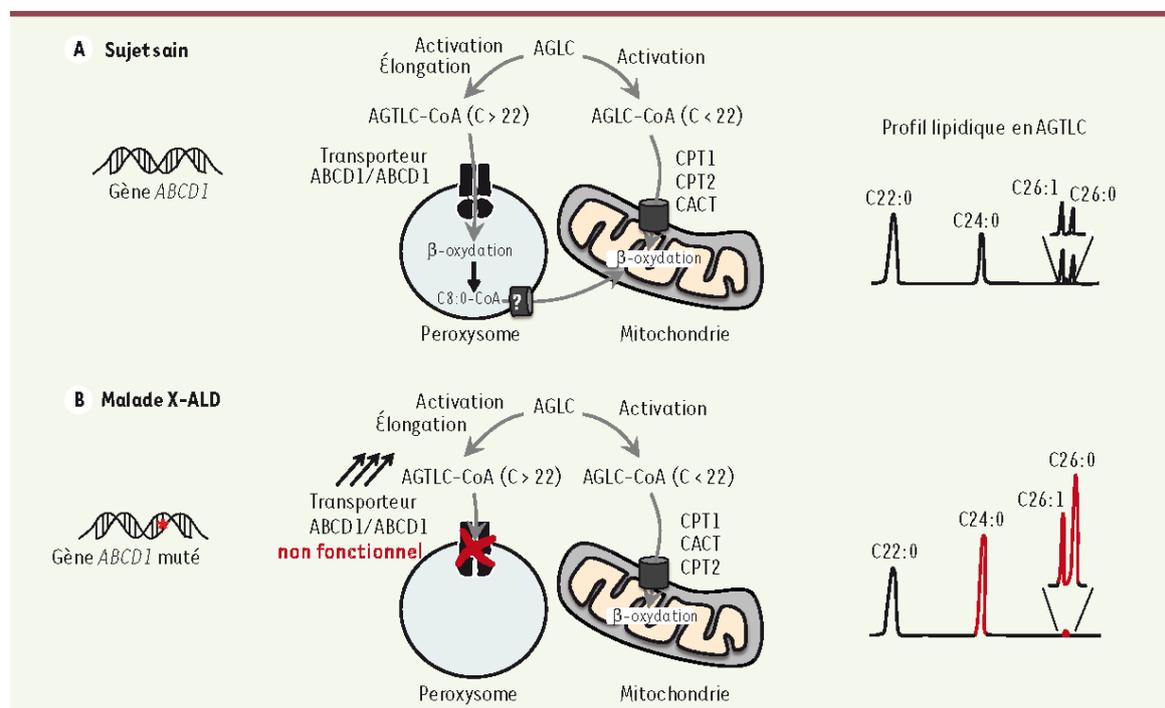


Figure 1. L'adrénoleucodystrophie liée à l'X (X-ALD). L'X-ALD est due à des mutations du gène *ABCD1*, conduisant à l'absence d'expression du transporteur ABCD1/ABCD1 ou à la présence d'un transporteur non fonctionnel dans la membrane du peroxysome. Ceci se traduit par un défaut de β -oxydation peroxysomale. La comparaison du profil lipidique de sujets sains (A) et de patients X-ALD (B) montre clairement une accumulation des AGTLC chez les patients. Les acides gras à très longue chaîne (AGTLC : C24:0, C26:0, etc.) sont apportés par l'alimentation ou synthétisés dans le réticulum endoplasmique par allongement, via l'activité des élongases, de la chaîne carbonée à partir des acides gras à longue chaîne, en particulier l'acide palmitique (C16:0) et l'acide stéarique (C18:0). Les AGTLC sont abondants dans la myéline, mais leur accumulation apparaît néfaste. Leur dégradation par β -oxydation a lieu uniquement dans le peroxysome. Avant d'être transportés dans le peroxysome par ABCD1, les AGTLC sont convertis en acyl-CoA (activation) grâce à la synthétase FATP4 localisée à la fois au niveau du peroxysome, du réticulum endoplasmique et de la mitochondrie. Les acyl-CoA sont ensuite raccourcis de deux atomes de carbone à chaque cycle jusqu'à l'octanoyl-CoA (C8:0-CoA) qui sort du peroxysome par un mécanisme inconnu pour finir sa dégradation dans la mitochondrie. La mitochondrie est en effet le principal lieu de la β -oxydation des acides gras à courte, moyenne ou longue chaîne (nombre de carbones < 22) dont l'activation dépend d'autres synthétases. À la différence du peroxysome, l'entrée dans la mitochondrie des AGLC-CoA dépend de la carnitine-palmitoyl transférase I (CPT1) et II (CPT2), et de la carnitine-acylcarnitine translocase (CACT).

acides gras, ainsi que la biosynthèse des plasmalogènes (lipides essentiels du cerveau) et des acides biliaires [6]. Ces fonctions métaboliques complexes nécessitent le transport de diverses molécules - en particulier des AGTLC - à travers la membrane peroxysomale. Ce transport spécifique serait dévolu aux transporteurs ABC peroxysomaux de la sous-famille D et serait précédé par l'activation des acides gras grâce à une synthétase spécifique (FATP4) qui les transforme en acyl-CoA. Dans l'X-ALD, la déficience en ABCD1 conduit à un défaut de β -oxydation peroxysomale des AGTLC et ainsi à leur accumulation [2, 3] (Figure 1). En effet, la β -oxydation mitochondriale, qui représente l'unique voie cellulaire de dégradation directe des AGTLC, ne peut prendre en charge que les acides gras dont la longueur de la chaîne est inférieure à 22 atomes de carbone. Cette accumulation d'AGTLC résulte également de l'augmentation de leur synthèse endogène au niveau du réticulum endoplasmique par les élongases :

l'action de ces dernières permet d'allonger la chaîne carbonée des AGLC. Cette accumulation tissulaire d'AGTLC caractérise aussi les souris déficientes en *ABCD1* qui ont été produites. Ces souris ne développent toutefois pas la forme cérébrale de l'X-ALD, et n'expriment que tardivement des anomalies neurologiques périphériques évoquant l'adrénomyélonéuropathie (AMN) [7]. La démonstration récente que les AGTLC s'accumulent dans les fibroblastes de patients X-ALD sous la forme d'acyl-CoA, conjuguée à des travaux de complémentation fonctionnelle par *ABCD1* humain chez des levures déficientes en *PXA1* et *PXA2* (orthologues des transporteurs ABCD humains), ont renforcé l'hypothèse de l'implication d'ABCD1 dans le transport des AGTLC sous forme d'acyl-CoA [8].

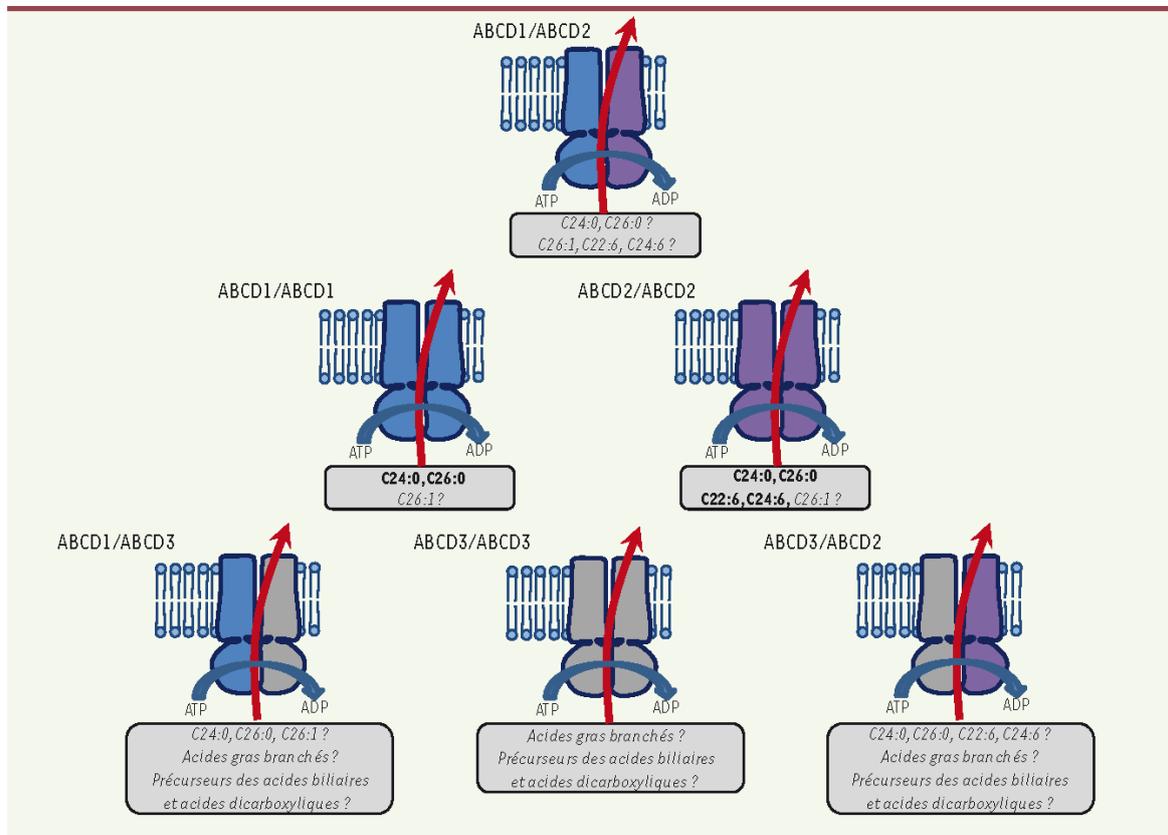


Figure 2. Représentation schématique des hémitransporteurs ABCD assemblés en homo et hétérodimères. Les substrats transportés connus sont représentés en gras, et ceux qui sont hypothétiques en italique.

Le rôle d'ABCD2 reste à préciser mais différents travaux *in vitro* et *in vivo* ont montré que ce transporteur peut compenser, en partie, le défaut d'ABCD1, et prendre en charge les AGTLC saturés et monoinsaturés [9-11]. Il pourrait également jouer un rôle dans le transport des acides gras polyinsaturés, notamment de l'acide docosahexaénoïque (DHA, C22:6 n-3), acide gras essentiel dans le cerveau et la rétine. Cet acide gras a pour particularité d'être dégradé dans le peroxysome, mais aussi d'y être synthétisé. En effet, à la suite d'étapes d'élongation et de désaturation de l'acide α -linoléique (C18:3 n-3) dans le réticulum endoplasmique, il y a formation de C24:6 n-3 qui subit ensuite un cycle de β -oxydation (perte de 2 atomes de carbone) dans le peroxysome pour former le DHA. ABCD2 pourrait ainsi participer à la fois au transport du DHA pour sa dégradation et au transport de son précurseur immédiat pour sa synthèse [12-14]. Concernant ABCD3, là encore, il apparaît que la surexpression d'ABCD3 peut compenser biochimiquement la déficience en ABCD1, signe qu'ABCD3 peut transporter des AGTLC saturés et monoinsaturés, mais avec une moins bonne efficacité [9]. Le rôle exact d'ABCD3 reste à préciser, d'autant plus que cette protéine est exprimée de façon ubiquiste et qu'il s'agit d'une des protéines peroxysomales possédant le plus fort niveau d'expression. Associée dans un premier temps à tort au syndrome

de Zellweger [15], la déficience en ABCD3 n'est en fait pas liée à un défaut de biogenèse peroxysomale. Les études réalisées chez les souris déficientes en ABCD3 suggèrent que cette protéine est impliquée dans le transport des acides gras branchés, des précurseurs des acides biliaires et des acides dicarboxyliques [5]. Les protéines ABCD sont des hémitransporteurs : ils doivent donc se dimériser pour former une unité fonctionnelle (Figure 2). Chez la levure, il n'existe que deux transporteurs ABC peroxysomaux, PXA1 et PXA2, qui s'associent sous forme d'un hétérodimère pour former un transporteur fonctionnel. Chez les mammifères, plusieurs études ont suggéré qu'ABCD1, ABCD2 et ABCD3 sont fonctionnels sous forme d'homodimères. En fait, différentes équipes, dont la nôtre, ont démontré l'existence d'interactions physiques entre les différents hémitransporteurs, indiquant qu'homodimères et hétérodimères coexistent [14, 16]. Les niveaux d'expression relatifs de ces trois transporteurs varient fortement, que ce soit au cours du développement ou en fonction des tissus [17, 18]. Ainsi, selon les situations, le jeu des combinaisons

permet d'aboutir potentiellement jusqu'à six transporteurs spécifiques dont il reste à élucider la fonction (Figure 2). La redondance fonctionnelle partielle entre les protéines ABCD1, ABCD2 et ABCD3 ne permet pas de compenser la déficience en ABCD1 à l'état basal. Néanmoins, elle présente un intérêt thérapeutique évident à condition d'être en mesure d'induire l'expression d'ABCD2 et/ou d'ABCD3 de manière spécifique chez les patients. Dans cette optique, il est nécessaire de mieux comprendre l'origine de cette redondance et donc, implicitement, d'avoir une meilleure connaissance des molécules transportées et du type de transporteur associé (homodimère ou hétérodimère).

L'adréno-leucodystrophie liée au chromosome X : une maladie neurodégénérative complexe

Bien que classée parmi les maladies rares, l'X-ALD est la plus fréquente des maladies peroxysomales avec une incidence d'environ 1 cas pour 17 000 naissances. Cette incidence la situe à peu près au même niveau que la phénylcétonurie, maladie pour laquelle un dépistage systématique est réalisé à la naissance. L'X-ALD a été décrite pour la première fois en 1923 par Siemerling et Creutzfeldt, mais ce sont surtout les travaux de Moser et l'histoire de Lorenzo Odone, enfant souffrant d'X-ALD, narrée dans le film *Lorenzo* avec Nick Nolte et Susan Sarandon, qui ont permis de mieux faire connaître cette maladie. En 1993, le clonage positionnel du gène *ABCD1* et la démonstration que des mutations de ce gène sont responsables de la maladie ont constitué une avancée majeure dans la compréhension de l'X-ALD [3]. À ce jour, plus de 500 mutations non récurrentes ont été identifiées dans le gène *ABCD1* chez les patients. Ces mutations sont référencées dans la base de données X-ALD (<http://www.x-ald.nl/>). Depuis le clonage du gène *ABCD1*, de nombreux travaux ont été réalisés dans le but de mieux comprendre cette maladie complexe mais aussi de développer des stratégies thérapeutiques. En dépit de ces efforts, beaucoup d'inconnues demeurent sur la physiopathogénèse de l'X-ALD et plusieurs pistes thérapeutiques continuent à être explorées.

Description clinique de l'X-ALD

L'X-ALD touche essentiellement les garçons, mais quelques formes graves ont également été recensées chez les femmes. Du point de vue clinique, les formes de la maladie sont très variables, aussi bien en ce qui concerne l'âge de début (enfance, adolescence, âge adulte) que la symptomatologie (Tableau 1). Les deux formes principales sont la forme cérébrale infantile (CCALD, environ 38 % des cas) et l'adréno-myélonéuropathie (AMN) (environ 50 % des cas). La forme infantile est la plus sévère. Les garçons affectés de CCALD développent, vers l'âge de 6 ans, une démyélinisation cérébrale inflammatoire qui entraîne le plus souvent leur mort à l'adolescence. L'AMN s'exprime après l'âge de 20 ans et se caractérise par une neuropathie périphérique non inflammatoire. Une paralysie spastique progressive accompagnée de troubles de l'équilibre conduit à des handicaps moteurs plus ou moins sévères. Dans environ un tiers des cas masculins, une atteinte cérébrale peut se développer. Chez environ 70 % des hommes, la maladie s'accompagne d'une insuffisance surrénale (maladie d'Addison). Les femmes por-

teuses de mutations *ABCD1* développent généralement une AMN plus tardivement (après 40 ans) ; le tableau clinique est moins sévère, et l'insuffisance surrénale rare. Bien que les mutations du gène *ABCD1* soient une constante chez les patients, aucune corrélation entre génotype et phénotype n'a pu être mise en évidence. Ceci a conduit à rechercher des gènes modificateurs, gènes qui, selon leur séquence ou leur niveau d'expression, pourraient atténuer ou, au contraire, aggraver le phénotype clinique.

Physiopathogénèse, AGTLC, stress oxydant et inflammation

D'un point de vue biochimique, la maladie est caractérisée par l'accumulation d'AGTLC (C24:0 et C26:0) dans le plasma et les tissus, et c'est d'ailleurs ce paramètre qui permet d'en faire le diagnostic. Plusieurs travaux suggèrent ou démontrent que les AGTLC ont des effets toxiques directs sur les différents types cellulaires des tissus qui sont altérés chez les malades. C'est le cas des oligodendrocytes qui sont responsables de la production de myéline dans le cerveau, et des cellules adrénocorticales qui interviennent dans la production de corticotrophine dans les surrénales. Les AGTLC peuvent induire une déstabilisation de la structure et des fonctions des membranes cellulaires et de celles d'organites (mitochondries, lysosomes), et conduire à la génération d'un stress oxydant délétère pour les cellules. Malgré ces effets néfastes qui suggèrent que l'accumulation d'AGTLC serait la cause *princeps* de la maladie, il ne semble pas y avoir de corrélation entre le niveau plasmatique des AGTLC, l'évolution de la maladie et la gravité des symptômes. Par ailleurs, l'analyse de modèles murins chez lesquels un défaut peroxysomal peut être induit spécifiquement dans un type cellulaire donné, indique que c'est l'altération des fonctions peroxysomales dans les oligodendrocytes et les cellules microgliales qui contribue majoritairement à l'inflammation cérébrale au cours du processus de démyélinisation [19]. Les causes du développement de la forme cérébrale sévère d'X-ALD, en particulier les cibles cellulaires et les facteurs de risque, sont donc actuellement encore assez mal connus. On ne peut exclure l'intervention de facteurs intrinsèques autres que les anomalies touchant les transporteurs ABC peroxysomaux, et contrôlés par des gènes modificateurs, ainsi que celle de facteurs extrinsèques autres que les seuls AGTLC. Plusieurs arguments suggèrent que l'X-ALD est un syndrome neurodégénératif impliquant des composantes telles que le stress oxydant, l'inflammation et des désordres métaboliques [20]. L'augmentation des taux plasmatiques de produits issus de la peroxydation lipidique et la diminution des défenses antioxydantes sont en faveur d'une rupture

| Sexe | Phénotype | Âge d'apparition des symptômes | Symptômes | Maladie d'Addison (insuffisance de la fonction endocrinienne surrénale) |
|-----------------|---|--------------------------------|--|---|
| Masculin | Forme infantile CCALD (<i>childhood cerebral ALD</i>) (~ 38 %) | 3 à 10 ans | Démyélinisation inflammatoire progressive du système nerveux central. Perturbations neurologiques, troubles du comportement et des capacités cognitives conduisant à une perte totale d'autonomie et au décès en 1 à 2 ans | ~ 70 % des patients |
| | ALD cérébrale (~ 50 %) | 11 à 22 ans | Mêmes symptômes que la CCALD mais la progression est plus lente | ~ 70 % des patients |
| | Forme adolescente AdoICALD (<i>adolescent cerebral ALD</i>) (~ 7 %) | plus de 21 ans | Mêmes symptômes que la CCALD mais la progression est plus lente | ~ 70 % des patients |
| | Forme adulte ACALD (<i>adult cerebral ALD</i>) (~ 5 %) | | | |
| | AMN pure (~ 35 %) | 28 ± 9 ans | Démyélinisation non inflammatoire de la moelle épinière et des nerfs périphériques Troubles moteurs pouvant aller jusqu'à l'impotence Pas de dysfonctionnement cérébral Espérance de vie jusqu'à 80 ans | ~ 70 % des patients |
| | AMN cérébrale (~ 15 %) | 28 ± 9 ans | Mêmes symptômes que l'AMN pure avec en plus une démyélinisation cérébrale inflammatoire Espérance de vie plus faible que dans l'AMN pure | ~ 70 % des patients |
| | Asymptomatique ou maladie d'Addison seule | | Pas de symptômes neurologiques | ~ 20 % des patients |
| | Myélopathie légère (~ 35 %) | Après 30 ans | Troubles sensoriels et réflexes augmentés des membres inférieurs conduisant ou non à un handicap modéré | Rare |
| | AMN modérée (~ 10 %) | Après 30 ans | Symptômes modérés de l'AMN | Rare |
| | ALD cérébrale (rare) | Après 30 ans | Mêmes symptômes que la CCALD | Rare |
| Féminin | Asymptomatique (~ 55 %) | | Pas de symptômes neurologiques | Pas d'insuffisance surrénale |

Tableau 1. Les différents phénotypes de l'X-ALD. Les données sont extraites de Jangouk et al. [1].

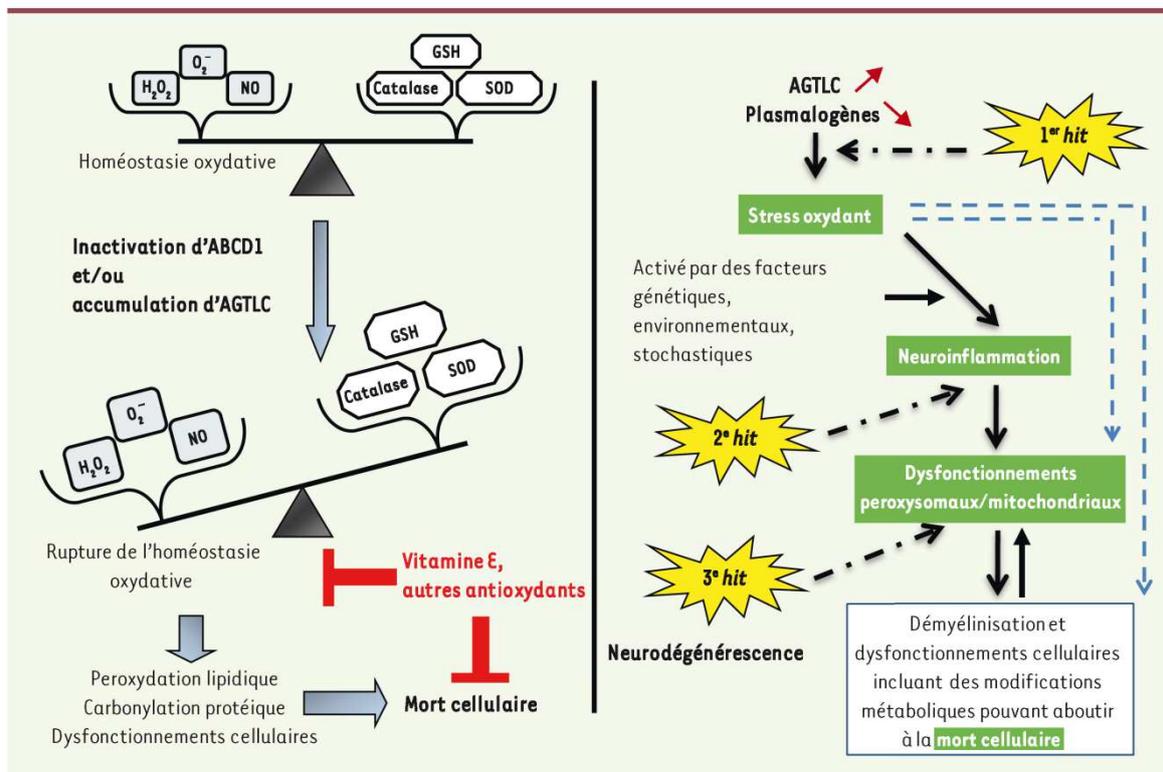


Figure 3. Bases moléculaires de l'X-ALD : the three hit hypothesis. Schéma hypothétique de la cascade d'événements conduisant à la démyélinisation dans l'X-ALD. Adapté par M. Baarine (université de Bourgogne, Dijon, France) et G. Lizard d'après Singh et Pujol [20]. Le stress oxydant et l'inflammation peuvent correspondre à des facteurs extrinsèques indépendants des AGTLC ou issus des activités biologiques de ces derniers, illustrant ainsi l'importance des facteurs environnementaux dans le développement de l'X-ALD. En raison des cibles multiples du stress oxydant (lipides, protéines et acides nucléiques), mais aussi des radicaux oxygénés impliqués et de l'état des défenses antioxydantes, les modifications post-transcriptionnelles issues de l'oxydation pourraient aboutir à un enchaînement d'événements (inflammation et mort cellulaire) susceptibles de varier chronologiquement. Ainsi, en fonction des facteurs environnementaux impliqués, rien ne permet d'exclure que l'inflammation, voire l'induction de mort cellulaire, puisse constituer le 1^{er} hit. Par conséquent, si l'on peut considérer que les événements stress oxydant/inflammation/dégénérescence/mort des oligodendrocytes sont des composantes majeures de l'X-ALD dans sa forme démyélinisante sévère, il est difficile d'affirmer, dans l'état actuel des connaissances, que la succession d'événements initialement envisagée soit la seule possible.

de l'équilibre RedOx [21]. Il en est de même de l'augmentation du taux de la sous-unité membranaire de la NADPH oxydase gp91^{PHOX} dans les leucocytes de patients [22] et de la présence de protéines carbonylées dans les monocytes [23]. Au niveau des lésions cérébrales plusieurs anomalies ont été décrites : l'augmentation importante des transcrits de cytokines pro-inflammatoires et de NO synthase [24], celle du niveau d'expression de la 5-lipoxygénase [25] et la présence d'infiltrats périvasculaires de lymphocytes T et B et de macrophages. Une analyse fonctionnelle génomique par puce à ADN réalisée à partir d'échantillons de cerveaux de patients CCALD et AMN a également révélé des désordres métaboliques : insulino-résistance et anomalies de la glycolyse. Les souris déficientes en *ABCD1* expriment d'ailleurs des perturbations métaboliques analogues à celles qui sont observées chez l'homme, ainsi qu'un stress oxydant important [26]. L'inactivation d'*ABCD1* dans des astrocytes à l'aide de siARN démontre l'implication d'*ABCD1* dans le contrôle de l'équilibre Redox et de

l'inflammation [25, 27]. Bien que la déficience en *ABCD1* et l'implication des AGTLC aient été démontrées dans la génération d'un stress oxydant dans des oligodendrocytes [28], cela n'exclut pas que d'autres facteurs puissent moduler ce phénomène *in vivo* et contribuer ainsi au déclenchement de la forme sévère d'X-ALD. L'ensemble de ces résultats, qui confèrent au peroxysome un rôle important dans l'homéostasie inflammatoire et oxydative, a conduit à proposer l'hypothèse du *three hit hypothesis* [20], selon laquelle les facteurs environnementaux comme le stress oxydant et l'inflammation constitueraient des facteurs de risque additionnels. La cascade d'événements aboutissant à la démyélinisation ferait donc intervenir un stress oxydant et l'inflammation, et conduirait à des dysfonctionnements peroxysomaux et mitochondriaux généralisés (Figure 3).

Stratégies thérapeutiques

Une des premières thérapies mise au point pour les patients atteints d'X-ALD visait à diminuer les niveaux d'AGTLC. Cette thérapie nutritionnelle est basée sur l'apport d'acides oléique (C18:1) et érucique (C22:1) dans des proportions 4:1 (huile de Lorenzo) en complément d'un régime pauvre en AGTLC. Cette combinaison permet de diminuer en quelques semaines les niveaux plasmatiques d'AGTLC chez les patients. Son administration n'a hélas pas d'effet bénéfique sur l'évolution des symptômes neurodégénératifs, et ne ferait que retarder l'apparition des signes neurologiques de la maladie et ralentir l'évolution des formes AMN [29].

Environ 70 % des patients atteints d'X-ALD présentent une insuffisance surrénale primaire (maladie d'Addison). Une thérapie de substitution est donc quasi systématiquement proposée aux patients. Même si elle n'influence hélas en rien l'apparition et la progression des symptômes neurologiques, elle permet de compenser efficacement le défaut de sécrétion des hormones produites par les glandes surrénales. Les divers essais de thérapie pharmacologique visant à moduler le métabolisme lipidique, le système immunitaire, ou à réduire l'inflammation ont malheureusement échoué. Un espoir réside néanmoins dans l'identification de molécules pharmacologiques capables d'induire une surexpression ciblée des gènes *ABCD2* ou *ABCD3* et, ainsi, de compenser en partie la déficience en *ABCD1*. En ce qui concerne *ABCD2*, nous avons pu mettre en évidence plusieurs voies d'induction pharmacologique ou hormonale dans différents modèles cellulaires, y compris dans des cellules d'origine cérébrale [30-33]. Hélas, même si certaines molécules testées peuvent traverser la barrière hémato-encéphalique, les tests chez l'animal ont souvent abouti à des résultats mitigés, une induction étant retrouvée dans le foie mais pas dans le cerveau. Le stress oxydant étant aujourd'hui reconnu comme un élément clé de la physiopathogenèse de l'X-ALD, une thérapie pharmacologique basée sur l'utilisation d'antioxydants suscite beaucoup d'espoirs. En effet, la combinaison de trois molécules antioxydantes (l' α -tocophérol, le N-acétyl-cystéine et l'acide lipoiq) administrée aux souris déficientes en *ABCD1* et développant le phénotype AMN permet de faire disparaître le stress oxydant, la dégénérescence axonale et les défauts locomoteurs de ces souris [34]. Cette étude a permis de démarrer un essai clinique afin de voir si les antioxydants peuvent effectivement avoir un effet bénéfique chez les patients atteints d'AMN.

Pour les patients présentant la forme infantile de l'X-ALD, la greffe de cellules souches hématopoïétiques constitue la seule thérapie capable de stopper le processus de neurodégénérescence inflammatoire. Bien que le mécanisme des effets bénéfiques de cette procédure soit toujours inconnu, on sait que la greffe doit être pratiquée à un stade précoce de la maladie. Ceci limite le nombre de patients pouvant en bénéficier. De plus, le risque de complications après la greffe est élevé et peut entraîner le décès du receveur (15 à 20 % des cas chez les enfants). La thérapie génique permet d'éliminer le problème de compatibilité entre donneur et receveur qui se pose lors d'une greffe de cellules souches hématopoïétiques, et de diminuer le risque de complications et la morbidité postgreffe. La thérapie génique s'adresse aux patients atteints de la forme infantile de l'X-ALD à un stade précoce et pour lesquels aucun donneur de moelle osseuse

compatible n'a pu être trouvé. Il s'agit de faire exprimer par les cellules souches hématopoïétiques de la moelle osseuse du patient un gène *ABCD1* normal, via un vecteur lentiviral, puis de les réintroduire chez le patient. On suppose que ces cellules génétiquement modifiées, par leur capacité à se différencier en cellules résidentes microgliales, pourraient avoir une action bénéfique « détoxifiante » ou stabilisatrice vis-à-vis du triptyque oligodendrocytes (cellules produisant la myéline), astrocytes (cellules nourricières), neurones (cellules assurant la transmission de l'influx nerveux). Chez deux enfants atteints d'X-ALD qui ont pu bénéficier de ce programme il y a quatre années, la thérapie génique a permis de stopper le processus de neurodégénérescence inflammatoire [35]. Cette thérapie représente donc un nouvel et réel espoir pour les patients atteints d'X-ALD.

Conclusion

L'X-ALD demeure aujourd'hui encore, par bien des aspects, un véritable défi pour les médecins et les scientifiques. Bien que la cause de la maladie soit clairement identifiée - déficience en un transporteur ABC peroxysomal -, le fonctionnement de ce transporteur ou de ces homologues, le mécanisme moléculaire du transport, les partenaires protéiques éventuels indispensables à sa fonction ou encore la compréhension de la redondance partielle avec *ABCD2* et *ABCD3* restent à clarifier. De même, la physiopathogenèse de l'X-ALD comprend encore de nombreuses inconnues. L'absence de corrélation entre génotype et phénotype clinique, et le fait que même de vrais jumeaux puissent développer des formes différentes de la maladie laissent perplexes. Quel est le lien exact entre l'accumulation des AGTLC, la démyélinisation, l'inflammation et le stress oxydant ? Quel est le facteur déclenchant ou encore l'ordre des événements conduisant à la progression irréversible de la pathologie ? Les efforts de la recherche fondamentale visant à apporter des réponses à ces différentes questions doivent absolument être poursuivis. Néanmoins et malgré toutes ces questions, le succès retentissant rencontré par l'essai clinique de thérapie génique fait souffler un véritable vent d'optimisme et soulève des espoirs, non seulement pour les patients X-ALD, mais aussi pour d'autres maladies neurodégénératives. ♦

SUMMARY

Peroxisomal ABC transporters and X-linked adrenoleukodystrophy

X-linked adrenoleukodystrophy (X-ALD) is a complex neurodegenerative disease associated with mutations in the *ABCD1* gene, which encodes for a peroxisomal ABC transporter. Thanks to the efforts of the ELA foundation



and to the recent successes of gene therapy published in *Science* in 2009, X-ALD is better known but still remains poorly understood. The exact role of ABCD1 and its homologs, as well as the exact link between the biochemical and metabolic peroxisomal defects and the clinical symptoms of the disease remain to be elucidated. This review summarizes the knowledge concerning the subfamily D of the ABC transporter family and concerning X-ALD, the most frequent peroxisomal disorder. ♦

REMERCIEMENTS

Les travaux du laboratoire Bio-PeroxlL (EA7270, université de Bourgogne) sur les transporteurs ABC peroxysomaux et l'X-ALD sont soutenus par l'université de Bourgogne, la fondation ELA (<http://www.ela-asso.com/>), l'Inserm, le centre hospitalo-universitaire (CHU) de Dijon et le conseil régional de Bourgogne.

LIENS D'INTÉRÊT

Les auteurs déclarent n'avoir aucun lien d'intérêt concernant les données publiées dans cet article.

RÉFÉRENCES

- Jangouk P, Zackowski KM, Naidu S, Raymond GV. Adrenoleukodystrophy in female heterozygotes: underrecognized and undertreated. *Mol Genet Metab* 2012; 105 : 180-5.
- Kemp S, Wanders R. Biochemical aspects of X-linked adrenoleukodystrophy. *Brain Pathol* 2010; 20 : 831-7.
- Mosser J, Douar AM, Sarde CO, et al. Putative X-linked adrenoleukodystrophy gene shares unexpected homology with ABC transporters. *Nature* 1993; 361 : 726-30.
- Dean M, Rzhetsky A, Allikmets R. The human ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily. *Genome Res* 2001; 11 : 1156-66.
- Kemp S, Theodoulou FL, Wanders RJ. Mammalian peroxisomal ABC transporters: from endogenous substrates to pathology and clinical significance. *Br J Pharmacol* 2011; 164 : 1753-66.
- Wanders RJ, Waterham HR. Biochemistry of mammalian peroxisomes revisited. *Annu Rev Biochem* 2006; 75 : 295-332.
- Pujol A, Hindelang C, Callizot N, et al. Late onset neurological phenotype of the X-ALD gene inactivation in mice: a mouse model for adrenomyeloneuropathy. *Hum Mol Genet* 2002; 11 : 499-505.
- van Roermund CW, Visser WF, Ijlst L, et al. The human peroxisomal ABC half transporter ALDP functions as a homodimer and accepts acyl-CoA esters. *Faseb J* 2008; 22 : 4201-8.
- Kemp S, Wei HM, Lu JF, et al. Gene redundancy and pharmacological gene therapy: implications for X-linked adrenoleukodystrophy. *Nat Med* 1998; 4 : 1261-8.
- Netik A, Forss-Petter S, Holzinger A, et al. Adrenoleukodystrophy-related protein can compensate functionally for adrenoleukodystrophy protein deficiency (X-ALD): implications for therapy. *Hum Mol Genet* 1999; 8 : 907-13.
- Pujol A, Ferrer I, Camps C, et al. Functional overlap between ABCD1 (ALD) and ABCD2 (ALDR) transporters: a therapeutic target for X-adrenoleukodystrophy. *Hum Mol Genet* 2004; 13 : 2997-3006.
- van Roermund CW, Visser WF, Ijlst L, et al. Differential substrate specificities of human ABCD1 and ABCD2 in peroxisomal fatty acid beta-oxidation. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids* 2010; 1811 : 148-52.
- Fourcade S, Ruiz M, Camps C, et al. A key role for the peroxisomal ABCD2 transporter in fatty acid homeostasis. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2009; 296 : E211-21.
- Genin EC, Geillon F, Gondcaille C, et al. Substrate specificity overlap and interaction between adrenoleukodystrophy protein (ALDP/ABCD1) and adrenoleukodystrophy-related protein (ALDRP/ABCD2). *J Biol Chem* 2011; 286 : 8075-85.
- Gärtner J, Moser H, Valle D. Mutations in the 70K peroxisomal membrane protein gene in Zellweger syndrome. *Nat Genet* 1992; 1 : 16-23.
- Liu LX, Janvier K, Berteaux-Lecellier V, et al. Homo- and heterodimerization of peroxisomal ATP-binding cassette half-transporters. *J Biol Chem* 1999; 274 : 32738-43.
- Lombard-Platet G, Savary S, Sarde CO, et al. A close relative of the adrenoleukodystrophy (ALD) gene codes for a peroxisomal protein with a specific expression pattern. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93 : 1265-9.
- Berger J, Albet S, Bentejac M, et al. The four murine peroxisomal ABC-transporter genes differ in constitutive, inducible and developmental expression. *Eur J Biochem* 1999; 265 : 719-27.
- Bottelbergs A, Verheijden S, Hulshagen L, et al. Axonal integrity in the absence of functional peroxisomes from projection neurons and astrocytes. *Glia* 2010; 58 : 1532-43.
- Singh I, Pujol A. Pathomechanisms underlying X-adrenoleukodystrophy: a three-hit hypothesis. *Brain Pathol* 2010; 20 : 838-44.
- Deon M, Sitta A, Barschak AG, et al. Induction of lipid peroxidation and decrease of antioxidant defenses in symptomatic and asymptomatic patients with X-linked adrenoleukodystrophy. *Int J Dev Neurosci* 2007; 25 : 441-4.
- Uto T, Contreras MA, Gilg AG, Singh I. Oxidative imbalance in nonstimulated X-adrenoleukodystrophy-derived lymphoblasts. *Dev Neurosci* 2008; 30 : 410-8.
- Fourcade S, Ruiz M, Guilera C, et al. Valproic acid induces antioxidant effects in X-linked adrenoleukodystrophy. *Hum Mol Genet* 2010; 19 : 2005-14.
- Paintlia AS, Gilg AG, Khan M, et al. Correlation of very long chain fatty acid accumulation and inflammatory disease progression in childhood X-ALD: implications for potential therapies. *Neurobiol Dis* 2003; 14 : 425-39.
- Khan M, Singh J, Gilg AG, et al. Very long-chain fatty acid accumulation causes lipotoxic response via 5-lipoxygenase in cerebral adrenoleukodystrophy. *J Lipid Res* 2010; 51 : 1685-95.
- Galino J, Ruiz M, Fourcade S, et al. Oxidative damage compromises energy metabolism in the axonal degeneration mouse model of X-adrenoleukodystrophy. *Antioxid Redox Signal* 2011; 15 : 2095-107.
- Singh J, Khan M, Singh I. Silencing of Abcd1 and Abcd2 genes sensitizes astrocytes for inflammation: implication for X-adrenoleukodystrophy. *J Lipid Res* 2009; 50 : 135-47.
- Baarine M, Andreoletti P, Athias A, et al. Evidence of oxidative stress in very long chain fatty acid-treated oligodendrocytes and potentialization of ROS production using RNA interference-directed knockdown of ABCD1 and ACOX1 peroxisomal proteins. *Neuroscience* 2012; 213 : 1-18.
- Moser HW, Raymond GV, Lu SE, et al. Follow-up of 89 asymptomatic patients with adrenoleukodystrophy treated with Lorenzo's oil. *Arch Neurol* 2005; 62 : 1073-80.
- Fourcade S, Savary S, Gondcaille C, et al. Thyroid hormone induction of the adrenoleukodystrophy-related gene (ABCD2). *Mol Pharmacol* 2003; 63 : 1296-303.
- Genin EC, Gondcaille C, Trompier D, Savary S. Induction of the adrenoleukodystrophy-related gene (ABCD2) by thymimetics. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2009; 116 : 37-43.
- Gondcaille C, Depreter M, Fourcade S, et al. Phenylbutyrate up-regulates the adrenoleukodystrophy-related gene as a nonclassical peroxisome proliferator. *J Cell Biol* 2005; 169 : 93-104.
- Gueugnon F, Gondcaille C, Leclercq S, et al. Dehydroepiandrosterone up-regulates the adrenoleukodystrophy-related gene (ABCD2) independently of PPARalpha in rodents. *Biochimie* 2007; 89 : 1312-21.
- Lopez-Erauskin J, Fourcade S, Galino J, et al. Antioxidants halt axonal degeneration in a mouse model of X-adrenoleukodystrophy. *Ann Neurol* 2011; 70 : 84-92.
- Cartier N, Hacein-Bey-Abina S, Bartholomae CC, et al. Hematopoietic stem cell gene therapy with a lentiviral vector in X-linked adrenoleukodystrophy. *Science* 2009; 326 : 818-23.

TIRÉS À PART
S. Savary



Tarifs d'abonnement m/s - 2013

Abonnez-vous
à médecine/sciences

> Grâce à m/s, vivez en direct les progrès
des sciences biologiques et médicales

Bulletin d'abonnement
page 1138 dans ce numéro de m/s



Liste des publications

- 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). *J. Biol. Chem.* 286:8075-84
- **Geillon F.**, D. Trompier, C. Gondcaille, G. Lizard, and S. Savary. 2012. Peroxisomal ABC transporters and X-linked adrenoleukodystrophy. *Med. Sci.* 28:1087-94 (Revue).
- Trompier, D., A. Vejux, A. Zarrouk, C. Gondcaille, **F. Geillon**, T. Nury, S. Savary, and G. Lizard 2013 Brain Peroxisomes. *Biochimie* (Revue soumise le 31 mai 2013)

Liste des communications orales

(L'orateur est souligné)

- **Geillon F.**, Gondcaille C., Trompier D. & Savary S., Hétérodimérisation de l'hémi-transporteur ABC peroxysomal ALDRP ("Adrenoleukodystrophy-related protein"). Réunion annuelle du groupement de Recherche sur le rôle cellulaire des Peroxisomes, GDR-CNRS n°2583, Dijon, France, 9 octobre 2009.
- **Geillon F.**, Trompier D. & Savary, S. Etude fonctionnelle de l'hémi-transporteur peroxysomal ABCD2 : détermination de son agencement moléculaire. 7ème Congrès Franco-Belge sur les transporteurs ABC, Paris, France, 14 Octobre 2009.
- **Geillon F.**, Gondcaille C., Trompier D. & Savary S. Statut dimérique de l'hémitransporteur peroxysomal ABCD2 (ALDRP, "Adrenoleukodystrophy-related protein"). 14ème réunion de l'AEP Bio, Paris, France, 14 juin 2010.
- Genin E.C., **Geillon F.**, Gondcaille C., Athias A., Gambert P., Trompier D. & Savary S. Specificity, redundancy and crosstalk between ABCD2 (ALDRP) and ABCD1 (ALDP). 8ème Congrès Franco-Belge sur les transporteurs ABC, Paris, France, 20 Octobre 2010.
- Genin E.C., **Geillon F.**, Gondcaille C., Athias A., Gambert P., Trompier D. & Savary S. Specificity, redundancy and crosstalk between ABCD2 (ALDRP) and ABCD1 (ALDP). Open European Peroxisome Meeting 2010, Lunteren, Pays-Bas, 21 Octobre 2010.

Liste des posters

(Le présentateur est souligné)

- Genin E.C., Athias A. **Geillon F.**, Gondcaille C. Gambert P., Trompier D. & Savary S. A cellular strategy to identify ALDRP substrates : structure-function analysis. 2nd ELA Research Foundation Congress, Luxembourg, Luxembourg, 26-27 Juin 2009.
- Genin E.C., Athias A., **Geillon F.**, Gondcaille C., Gambert P., Trompier D. & Savary S. Substrate specificity of the Adrenoleukodystrophy-related Protein (ALDRP, Abcd2). 3rd FEBS special meeting ; ATPbinding Cassette (ABC) proteins : from Multidrug Resistance to Genetic Diseases, Innsbruck , Austria, 27 Février – 5 Mai, 2010.
- Geillon F., Gondcaille C., Trompier D., & Savary S. Dimeric status of the Adrenoleukodystrophy-related Protein (ALDRP, Abcd2). 3rd FEBS special meeting ; ATPbinding Cassette (ABC) proteins : from Multidrug Resistance to Genetic Diseases, Innsbruck, Austria, 27 Février – 5 Mai, 2010.
- Geillon F., van Roermund C., Charbonnier S., Gondcaille C., Emgoué Emani M. G., Méthy D., Wanders R. J., Trompier D. & Savary S. Chimeric dimers of ABCD transporters : functional complementation of peroxisomal defect. 4th FEBS special meeting ; ATPbinding Cassette (ABC) proteins : from Multidrug Resistance to Genetic Diseases, Innsbruck , Austria, 3-9 Mars 2012.
- **Geillon F.**, van Roermund C., Charbonnier S., Gondcaille C., Emgoué Emani M. G., Méthy D., Wanders R. J., Trompier D. & Savary S. Chimeric dimers of ABCD transporters : functional complementation of peroxisomal defect. Open European Peroxisome Meeting, Dijon, France, 5-6 Juillet 2012.