Inactivation génique des transporteurs ABC peroxysomaux ABCD1 et ABCD2 dans les cellules microgliales BV-2 : étude de la physiopathogenèse de l'adrénoleucodystrophie liée à l'X.

Quentin Raas

▶ **To cite this version:**

Quentin Raas. Inactivation génique des transporteurs ABC peroxysomaux ABCD1 et ABCD2 dans les cellules microgliales BV-2 : étude de la physiopathogenèse de l'adrénoleucodystrophie liée à l'X.. Biochimie, Biologie Moléculaire. Université Bourgogne Franche-Comté, 2018. Français. NNT : 2018UBFCI011 . tel-02139426

HAL Id: tel-02139426
https://theses.hal.science/tel-02139426

Submitted on 24 May 2019

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.

Thèse de Doctorat de l'établissement

UNIVERSITE BOURGOGNE FRANCHE-COMTE

préparée à l'Université de Bourgogne

Ecole doctorale n°554 Environnement-Santé

Inactivation génique des transporteurs ABCD1 et ABCD2 dans les cellules microgliales BV-2 : étude de la physiopathogenèse de l'adrénoleucodystrophie liée à l'X

Doctorat de Biochimie-Biologie moléculaire

par

M. Raas Quentin

Thèse présentée et soutenue à Dijon le 17 Décembre 2018

Composition du Jury :

Mme Cartier Nathalie	Directeur de recherche, INSERM - CEA - Université Paris-Sud	Présidente du Jury
Mme Pot Caroline	Professeur assistant, Université de Lausanne	Rapporteur
M. Vamecq Joseph	Chargé de recherche, INSERM - Université de Lille 2	Rapporteur
Mme Garrido Carmen	Directeur de recherche, INSERM - Université de Bourgogne	Examinatrice
M. Savary Stéphane	Professeur des universités, Université de Bourgogne	Directeur de thèse
Mme Trompier Doriane	Maître de conférences, Université de Bourgogne	Codirectrice de thèse

Inactivation génique des transporteurs ABCD1 et ABCD2 dans les cellules microgliales BV-2 : étude de la physiopathogenèse de l'adrénoleucodystrophie liée à l'X

REMERCIEMENTS

J’adresse ici mes remerciements les plus sincères.

À Mesdames Carmen Garrido, Nathalie Cartier et Caroline Pot ainsi qu’à Monsieur Joseph Vamecq pour m’avoir fait l’honneur d’évaluer ces travaux.

À Stéphane Savary pour avoir encadré ce travail de la meilleure des manières, pour ton enthousiasme à toute épreuve. Merci d’avoir fait en sorte que tout se passe toujours pour le mieux, surtout lorsque les conditions ne s’y prêtaient pas.

À Doriane Trompier pour ta capacité d’écoute, pour tes qualités didactiques ou pour tout ce travail de relecture.

À Catherine Gondcaille, pour ton engagement au sein du laboratoire ou pour tous ces partages de réflexions scientifiques ou non.

À tous les trois, pour votre accueil, votre soutien, votre disponibilité, pour toute votre implication dans ce travail, pour tout ce que vous avez pu me transmettre et plus généralement pour toutes vos qualités humaines et scientifiques. Ce fut un réel plaisir de travailler avec vous pendant ces trois ans.

À Gérard Lizard, pour m’avoir accueilli au sein de son laboratoire.

À l’ensemble des membres du laboratoire BioperoxIL et affiliés, Anne, Fatima, Mustapha, Nathalie, Norbert, Pierre, Stéphane M. et Thomas, pour toutes ces discussions bien avisées et pour avoir maintenu une atmosphère de travail aussi agréable. J’espère pouvoir retrouver de pareilles conditions par la suite.

À Yannick Hamon, pour ton invitation chaleureuse au CIML, pour ta sympathie à mon égard, pour ton partage d’expertise en biophotonique, pour m’avoir permis de passer ces quelques mois très plaisants au cœur des Calanques marseillaises.

À Messieurs Hai-Tao He et Didier Marguet pour m’avoir accueilli au sein de leur laboratoire, ainsi qu’à tous les membres de l’équipe, Andréa, Anthony, Mathieu, Rémi, Roxane, Sébastien et Tom, pour leur accueil chaleureux et leur aide précieuse.

À Messieurs Philippe Naquet et Philippe Garnier, pour avoir été les garants du bon déroulement de cette thèse.

À tous les collaborateurs impliqués dans ces travaux, aux personnels des plateformes technologiques dijonnaises, Céline Keim, Christelle Thibault-Carpentier, Franck Menetrier, Serge Monier, Anabelle Sequeira, Jean-Paul Pais de Barros et Patrick Callier.

À mes colocs, Bastian, Caroline, Hugo, Jeff, Marion, Martin, Pauline M., Pauline P., Simon, Stephenobiteljlangoustin et Yoka, ma deuxième famille dijonnaise.

Malgré l'éloignement aussi,
À ma famille, à mes amis,
À mes parents et ma grande sœur, pour votre confiance et vos encouragements.
À toi, Agathe, pour ton soutien inconditionnel, pour ta tendresse, pour tous ces instants, je ne te remercierai jamais assez.

« Sur les épaules de géants »

SOMMAIRE

Remerciements **1**

Sommaire **3**

Table des Figures **1**

Liste des Tableaux **3**

Table des abréviations **4**

Avant-propos **6**

Contexte **7**

Introduction **10**

Chapitre 1 : Microglie, neuroinflammation et maladies démyelinisantes **10**

I. Généralités et ontogénie des cellules myéloïdes au sein du SNC 10

II. La microglie en contexte physiologique 12

II.1. La microglie, cellule sentinelle 12

II.2. La microglie, phagocyte spécialisé 14

II.3. La microglie, essentielle au développement du SNC 14

III. La microglie dans le contexte inflammatoire 15

III.1. Réponse immunitaire innée au sein du SNC et plasticité fonctionnelle de la microglie 15

III.2. Réponse immunitaire adaptative au sein du SNC et neuroinflammation 17

IV. Modèles d'étude de la microglie 18

IV.1. *In vivo* 18

IV.2. *In vitro* 19

V. Microglie, atteintes de la substance blanche et leucodystrophies 19

V.1. La microglie dans les maladies démyélinisantes 19

V.2. Les leucodystrophies 21

Chapitre 2 : Le peroxysome et les pathologies peroxysomales **24**

I. Introduction sur le peroxysome 24

I.1. Fonctions métaboliques du peroxysome 24

I.2. Introduction sur les pathologies peroxysomales 26

II. Biogenèse peroxysomale et pathologies associées 28

II.1 Biogenèse, prolifération et dynamique du peroxysome 28
II.2 Troubles de la biogenèse peroxysomale et syndrome de Zellweger 30
III. La β-oxydation peroxysomale 31
III.1. Enzymes de la β-oxydation peroxysomale 32
III.2. La déficience en acyl-CoA oxydase I 33
III.3. Transporteurs du peroxysome 34
III.3.1. Généralités sur les transporteurs ABC 34
III.3.2. Structure et oligomérisation des transporteurs ABC peroxysomaux 35
III.3.3. Fonction et expression des transporteurs ABC peroxysomaux 36
Chapitre 3 : L'adrénoleucodystrophie liée à l'X (X-ALD) 40
I. Introduction 40
II. Phénotypes 41
II.1 L'adrénoleucodystrophie cérébrale (CALD) 41
II.2 L'adrénomyeloneuropathie (AMN) 42
II.3 La maladie d'Addison et les troubles endocriniens 43
II.4 Hétérozygotie 44
III. Génétique et diagnostic 45
IV. Les facteurs environnementaux et gènes modificateurs 46
V. La physiopathologie de l' X-ALD 47
V.1. L'accumulation d'AGTLC et les conséquences métaboliques de l'X-ALD 47
V.2. Le stress oxydant dans l'X-ALD 49
V.3. La réponse inflammatoire dans l'X-ALD 51
V.4. L'altération des cellules myéloïdes dans l'X-ALD 52
VI. Thérapies et pistes thérapeutiques 53
VI.1. L'huile de Lorenzo et les thérapies nutritionnelles 53
VI.2. La greffe de cellules souches hématopoïétiques et la thérapie génique 54
VI.3. Thérapies pharmacologiques de l'X-ALD 55
VII. Modèles expérimentaux de l'X-ALD 57
VII.1. Modèles animaux de l'X-ALD 57
VII.2. Modèles cellulaires de l'X-ALD 58
Objectifs et stratégie 60

Résultats **64**

I. Génération et caractérisation des modèles cellulaires déficients en ABCD1, ABCD2 ou ACOX1 64

I.1. La technique d'édition génique CRISPR-Cas9 et les stratégies d'obtention des clones déficients 64

I.2. A microglial cell model for acyl-CoA oxidase 1 deficiency 68

I.3. CRISPR/Cas9-mediated knockout of *Abcd1* and *Abcd2* genes in BV-2 cells: novel microglial models for X-linked Adrenoleukodystrophy 79

I.4. Discussion annexe aux articles 92

II. Conséquences fonctionnelles des déficiences peroxysomales dans les cellules microgliales 93

II.1. Profils transcriptomiques des cellules déficientes 93

II.2. Conséquences métaboliques des inactivations géniques 101

II.3. Métabolisme oxydatif et métabolisme de l'azote dans les cellules déficientes 107

II.4. Réponse inflammatoire et sécrétion cytokinique des cellules déficientes 110

II.5. Fonction de phagocytose des cellules déficientes 113

II.6. Fonction de présentation antigénique des cellules déficientes 118

II.7. Propriétés de diffusion latérale des membranes des cellules déficientes 123

Discussion générale **128**

Limitations des modèles cellulaires 128

Conséquence métabolique des inactivations géniques dans les cellules microgliales 129

Altération de la plasticité des cellules microgliales résultant des inactivations géniques dans les cellules microgliales 131

Un rôle pour mTORC1 dans l'apparition de ces phénotypes ? 132

Conséquences des inactivations géniques sur l'organisation membranaire des cellules microgliales 135

Conclusion 136

Bibliographie **138**

Annexes **156**

TABLE DES FIGURES

Figure 1 : Cellule microgliale découverte par Pio del Rio-Hortega. 11
Figure 2 : Reprogrammation fonctionnelle de la microglie. 21
Figure 3 : Biogenèse et prolifération peroxysomale. 29
Figure 4 : La β-oxydation peroxysomale. 32
Figure 5 : Modèle structural du transporteur ABCD1 humain 37
Figure 6 : Anomalies de la substance blanche des régions parieto-occipitales et des capsules internes par IRM en plan axial en séquence FLAIR. 42
Figure 7 : Inactivation génique par CRISPR-Cas9. 65
Figure 8 : Protocoles de sélection des clones inactivés. 67
Figure 9 : Analyse des gènes différentiellement exprimés dans les cellules BV-2 WT et déficientes en condition standard. 95
Figure 10 : Analyse des gènes différentiellement exprimés dans les cellules BV-2 WT et KO suite au traitement des cellules par le LPS ou le 25HC. 99
Figure 11 : Gènes différentiellement exprimés dans les cellules BV-2 déficientes en ABCD1, ABCD2, ABCD1/ABCD2, ou ACOX1 associés au métabolisme lipidique ou au peroxysome. 102
Figure 12 : Mesure des contenus cellulaires en stérols des cellules BV-2 WT et des cellules déficientes en ABCD1, ABCD2, ABCD1/ABCD2, ou ACOX1. 105
Figure 13 : Mesure des contenus cellulaires en acides organiques des cellules BV-2 WT et des cellules déficientes en ABCD1, ABCD2, ABCD1/ABCD2 ou ACOX1 106
Figure 14 : Gènes différentiellement exprimés associés au métabolisme oxydatif et à la synthèse du NO des cellules BV-2 WT et des cellules déficientes en ABCD1, ABCD2, ABCD1/ABCD2 ou ACOX1 avec ou sans LPS. 107
Figure 15 : Métabolisme de la L-arginine et synthèse du NO par les cellules microgliales BV-2 WT et des cellules déficientes en ABCD1, ABCD2, ABCD1/ABCD2 ou ACOX1 avec ou sans LPS. 109
Figure 16 : Analyse des cytokines secrétées par les cellules microgliales BV-2 WT et déficientes en ACOX1. 111
Figure 17 : Gènes de cytokines différentiellement exprimés dans les cellules BV-2 déficientes en ABCD1, ABCD2, ABCD1/ABCD2 ou ACOX1. 112

Figure 18 : Gènes différentiellement exprimés dans les cellules BV-2 déficientes en ABCD1, ABCD2, ABCD1/ABCD2 ou ACOX1, associés au terme de « KEGG pathway » « Phagosome » (mmu04145). 114
Figure 19 : Etude de la capacité de phagocytose de billes fluorescentes des cellules microgliales WT et déficientes en ABCD1, ABCD2, ABCD1/ABCD2 et ACOX1, préalablement activées par LPS ou non. 115
Figure 20 : Analyse d'expression des marqueurs de surface des cellules microgliales BV-2 WT et déficientes en ABCD1, ABCD2, ABCD1/ABCD2 ou ACOX1. 119
Figure 21 : Analyse de la présentation antigénique des cellules microgliales WT et déficientes en ABCD1, ABCD2, ABCD1/ABCD2 ou ACOX1. 121
Figure 22 : Analyse de l'organisation latérale membranaire des cellules BV-2 WT et déficientes en ABCD1 ou en ABCD2 par spectroscopie à corrélation de fluorescence et variation de spot (svFCS). 125
Figure 23 : Le complexe mTORC1 pourrait jouer un rôle central dans le défaut métabolique observé dans les cellules microgliales déficientes en ABCD1, ABCD2, ABCD1/ABCD2 ou ACOX1. 134

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Maladies classées comme Leucodystrophie. 22
Tableau 2 : Troubles du métabolisme lipidique peroxysomale. 27
Tableau 3 : Comparaison des profils d'expression en ARNm, des gènes codant les trois transporteurs ABCD peroxysomaux, chez la souris et l'Homme. 38
Tableau 4 : Phénotypes de l'X-ALD. 41
Tableau 5 : Analyse d'enrichissement en termes « Gene Ontology-Biological Process » des gènes différentiellement exprimés dans les cellules BV-2 déficientes par rapport aux cellules WT, en condition standard. 97
Tableau 6 : Analyse d'enrichissement en termes « KEGG Pathway » des gènes différentiellement exprimés dans les cellules BV-2 déficientes par rapport aux cellules WT, en condition standard. 98
Tableau 7 : Analyse d'enrichissement en termes de « Gene Ontology-Biological Process » des gènes différentiellement exprimés dans les cellules BV-2 WT ou déficientes en réponse au LPS. 100

TABLE DES ABREVIATIONS

25HC	*25-hydroxycholestérol*
AA	*Acide arachidonique (C20:4)*
ABC	*ATP binding cassette*
ACOT	*Acyl-CoA thioestérase*
ACOX1	*Acyl-CoA oxydase 1*
ACSVL1	*Acyl-CoA synthethase very long chain*
ACTH	*Hormone adrénocorticotrope*
ADHAPS	*Alkyl-dihydroxyacétone phosphate synthase*
AG	*Acide gras*
AGTLC	*Acide gras à très longue chaîne*
AMACR	*2-méthylacyl-CoA racémase*
AMN	*Adrénomyéloneuropathie*
AMPK	*AMP-activated protein kinase*
ApoE	*Apolipoprotéine E*
Arg1	*Arginase-1*
ATP	*Adénosine triphosphate*
BDNF	*Brain-derived neurotrophic factor*
BHE	*Barrière hémato-encéphalique*
C22:0	*Acide docosanoïque*
C24:0	*Acide lignocérique*
C26:0	*Acide cérotique*
CALD	*Adrénoleucodystrophie cérébrale*
Cas	*CRISPR-associated*
CD	*Cluster de différenciation*
CIML	*Centre d'Immunologie de Marseille-Luminy*
CMH	*Complexe majeur d'histocompatibilité*
CRISPR	*Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*
crRNA	*ARN CRISPR*
CSF1	*Colony-stimulating factor 1/Macrophage colony-stimulating factor*
CSF2	*Colony-stimulating factor 1/Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*
CX3CL1	*Fractalkine*
CX3CR1	*Fractalkine receptor*
DAMP	*Damage-associated molecular patterns*
DHA	*Acide docosahexaénoïque (C22:6)*
DHAPAT	*Dihydroxyacétone phosphate acyltransférase*
DHCR24	*24-dehydrocholestérol réductase*
DLP1	*Dynamin-like protein*
EGFP	*Enhanced green fluorescent protein*
ELISA	*Enzyme-linked immunosorbent assay*
ELOVL	*Elongase of very long-chain fatty acid*
EPA	*Acide eicosapentaénoïque (C20:5)*
ERO	*Espèces réactives de l'oxygène (ROS)*
FACS	*Fluorescence-activated cell sorting*
FISH	*Hybridation in situ en fluorescence*
FITC	*Fluorescein isothiocyanate*
GC-MS	*Chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse*
GO-BP	*Gene Ontology-Biological-Process*
HMGCR	*Hydroxyméthylglutaryl-CoA réductase*
IFN	*Interféron*
IGF1	*Insulin growth factor 1*
IL	*Interleukine*
Indel	*Insertion/délétion*
iNOS	*NO synthase inductible*
iPSC	*Cellules souches pluripotentes induites*
IRD	*Maladie de Refsum infantile*
IRM	*Imagerie par résonnance magnétique*
JENH	*Jonction d'extrémités non homologues*

KEGG	*Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*
KO	*Knockout*
LCR	*Liquide céphalo-rachidien*
LPC	*Lysophosphatidylcholine*
LPS	*Lipopolysaccharide*
LXR	*Liver X receptor - récepteur nucléaire aux oxystérols*
MAAACS	*Methods for Automated and Accurate Analysis of Cell Signals*
MACS	*Magnetic-activated cell sorting*
MAPK	*Mitogen-activated protein kinases*
MFGE-8	*Milk fat globule-EGF factor 8*
MFP2	*Protéine multifonctionnelle 2*
MRC1	*Mannose receptor, C type 1*
mTOR	*Mammalian target of rapamycin*
NADPH	*Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate + H+*
NALD	*Adrénoleucodystrophie néonatale*
NBD	*Domaine de fixation aux nucléotides*
NF-κB	*Nuclear factor-kappa B*
NGF	*Nerve growth factor*
NKT	*Natural Killer T*
NLRP3	*NOD-like receptor family, pyrin domain containing 3*
NO	*Monoxyde d'azote*
OMIM	*Online Mendelian Inheritance in Man*
OVA	*Ovalbumine peptide*
OXPHOS	*Phosphorylation oxydative*
PAMP	*Pathogen-associated molecular patterns*
PANTHER	*Protein ANalysis THrough Evolutionary Relationships*
PCR	*Polymerase chain reaction*
PGC1α	*PPARγ coactivator 1-α*
PHYH	*Phytanoyl-CoA hydroxylase*
PMP	*Protéine membranaire peroxysomale*
PMP	*Protéine membranaire peroxysomale*
P-NALD	*Adrénoleucodystrophie pseudo-néonatale*
PPAR	*Peroxisome proliferator-activated receptor*
PRR	*Pattern-recognition receptor*
PTS	*Peroxisomal targeting signal*
RE	*Réticulum endoplasmique*
RH	*Recombinaison homologue*
RNAseq	*Séquençage du transcriptome*
RT-qPCR	*Reverse transcriptase PCR quantitative*
RXR	*Récepteur X des rétinoïdes*
SNC	*Système nerveux central*
SOD	*Superoxide dismutase*
SREBP	*Sterol regulatory element binding protein*
svFCS	*Spot variation fluorescence correlation spectroscopy*
TGF	*Transforming growth factor*
TLR	*Toll-like receptor*
TMD	*Domaine transmembranaire*
TNFα	*Tumor necrosis factor*
tracrRNA	*Trans-activating crRNA*
TREM2	*Triggering receptor expressed on myeloid cells 2*
WT	*Génotype sauvage (Wild type)*
X-ALD	*Adrénoleucodystrophie liée à l'X*
ZS	*Syndrome de Zellweger*

AVANT-PROPOS

L'adrénoleucodystrophie liée à l'X est une maladie neurodégénérative sévère sans thérapie satisfaisante. Cette maladie est causée par une mutation dans le gène codant pour la protéine ABCD1. ABCD1 et son plus proche homologue, ABCD2, sont tous deux impliqués dans le transport d'acides gras à très longue chaîne au sein du peroxysome. Le lien entre le défaut métabolique, conséquence de la mutation du gène *ABCD1*, et l'apparition de la maladie démyélinisante est encore indéterminé. L'absence de modèles expérimentaux pertinents est le principal obstacle à la compréhension des mécanismes physiopathologiques et au développement de thérapies.

« L'inactivation génique des transporteurs ABCD1 et ABCD2 dans les cellules microgliales BV-2 » doit donc permettre de générer des modèles cellulaires contribuant à compenser ce manque.

Les différents thèmes abordés au sein de l'introduction cherchent ainsi à montrer l'intérêt de développer un tel modèle. Une première partie aborde des notions sur la microglie, ses fonctions en conditions physiologiques et pathologiques et dans quelle mesure des perturbations de ses fonctions sont présentes dans un certain nombre de maladies de la substance blanche. Un deuxième chapitre vise à présenter le peroxysome, les protéines qui le composent et les pathologies sévères dans lesquelles sa fonction fait défaut. Un accent particulier est notamment mis sur les transporteurs ABC du peroxysome. L'adrénoleucodystrophie liée à l'X et sa physiopathogenèse sont abordées dans une troisième partie. Ces chapitres introductifs sont suivis d'une présentation des objectifs, de la stratégie adoptée dans cette étude et de ses résultats. La stratégie d'obtention et les premiers éléments de caractérisation phénotypique du modèle cellulaire déficient en ACOX1 ont fait l'objet d'une publication dans *BBA - Molecular and Cell Biology of Lipids* en 2018. La stratégie d'obtention et la caractérisation phénotypique initiale des modèles cellulaires déficients en ABCD1, ABCD2 et ABCD1/ABCD2 ont fait l'objet d'un second article soumis le 30 octobre 2018 au même journal. Ces deux articles sont suivis de résultats traitant des conséquences fonctionnelles des déficiences peroxysomales dans ces cellules microgliales et d'une discussion générale.

CONTEXTE

La mise en place de la technique d'édition génique CRISPR-Cas9 au sein du laboratoire afin de générer les modèles cellulaires déficients en ABCD1, en ABCD2, en ABCD1/ABCD2 et en ACOX1 a nécessité d'importants travaux de mise au point. Il en a été de même pour les conditions de culture des cellules BV-2 et les étapes préalables de transfection (dont l'efficacité reste problématique dans ce type de cellules malgré les systèmes Amaxa) ou encore les analyses moléculaires utilisées pour le criblage des clones cellulaires. La génération de ces modèles a, de ce fait, été étalée sur près de deux ans. Si certains travaux de caractérisation ont pu commencer relativement tôt, dès l'obtention des premiers clones cellulaires, il a fallu attendre d'avoir toutes les cellules déficientes et notamment le clone *Abcd1*$^{-/-}$/*Abcd2*$^{-/-}$ pour véritablement engager les études comparatives les plus importantes. Durant les périodes de mise au point et les périodes d'attentes, j'ai pu prendre part à des travaux initiés au sein de l'équipe avant mon arrivée, travaux qui concernaient des aspects biochimiques structuraux et fonctionnels des transporteurs ABCD1 et ABCD2. Ces travaux, qui ont permis, entre autres, de caractériser le statut oligomérique d'ABCD1 et ABCD2, ont été publiés dans *J. Biol. Chem.* (Geillon, Gondcaille et al. 2017). Une seconde étude a consisté à reprendre les données structure-fonction de la littérature sur les transporteurs ABCD et à repréciser par analyse bioinformatique l'organisation structurale de ces hémi-transporteurs afin d'aboutir à un modèle structural prédictif. Ce travail a fait l'objet d'une publication dans *Int. J. Mol. Sci.* (Andreoletti, Raas et al. 2017). Les deux articles sont mentionnés dans le deuxième chapitre introductif et inclus en annexe.

La caractérisation des clones cellulaires et l'exploration de plusieurs hypothèses ont souvent été ralenties par les soucis financiers du laboratoire empêchant notamment l'achat de kits ELISA ou d'anticorps. C'est dans ce contexte et dans le but d'aborder les questions se rapportant à la réponse immunitaire et l'organisation membranaire des modèles générés, qu'une collaboration a été mise en place avec le Dr Yannick Hamon au sein du Centre d'Immunologie de Marseille-Luminy (CIML). J'ai donc pu explorer ces aspects au cours d'un stage collaboratif de 4 mois au dernier trimestre 2017. Ces travaux ont pu être réalisés dans le cadre d'un projet intitulé « Organisation membranaire et signalisation cellulaire dans des modèles cellulaires microgliaux de maladies démyélinisantes », grâce au financement de la Fondation pour l'aide à la recherche sur la sclérose en plaque (ARSEP).

Enfin, une analyse transcriptomique avec l'aide la plateforme GenomEast de l'IGBMC à Strasbourg et dans le cadre d'une collaboration avec le Dr. C. Thibault-Carpentier a pu être

réalisée sur ces modèles et financée par la Fondation maladies rares. Si le financement de ce projet a été accepté en juin 2017, la préparation des échantillons biologiques, leur validation et leur envoi à la plateforme n'ont pu être effectués qu'au début du mois de mars 2018. Cette analyse, elle-même retardée par des soucis techniques, a finalement conduit à l'obtention de premières données au cours de l'été 2018. Les dernières analyses des résultats n'ont été communiquées qu'au début du mois d'octobre mais elles contribuent de façon majeure à remettre en perspective l'ensemble des résultats obtenus.

INTRODUCTION

CHAPITRE 1 : MICROGLIE, NEUROINFLAMMATION ET MALADIES DEMYELINISANTES

I. Généralités et ontogénie des cellules myéloïdes au sein du SNC

Les cellules microgliales sont les macrophages résidents du système nerveux central (SNC) et jouent un rôle essentiel dans le maintien de l'homéostasie du SNC. La microglie représente entre 5 et 20% des cellules du SNC et forment les sentinelles du système immunitaire, de par leur capacité à détecter toutes anomalies ou lésions au sein du parenchyme cérébral.

Le terme de microglie est introduit en 1919 lorsque P. Del Rio-Hortega met en évidence ces cellules par des techniques d'imprégnation métallique (Figure 1). Ses principales découvertes et les caractéristiques qu'il attribue à la microglie sont les suivantes : i) la microglie a une origine mésodermale, contrairement aux autres cellules du SNC provenant du neuro-ectoderme et est assimilée aux leucocytes, ii) ces cellules interagissent étroitement avec les neurones, les astrocytes et la circulation sanguine, iii) la microglie a une plasticité importante, adaptée au parenchyme cérébral, iv) à l'état pathologique, la microglie prolifère, sa morphologie s'adapte et la microglie adopte alors un état activé, v) la microglie migre lors du développement et après une lésion cérébrale, vi) la microglie est la cellule phagocytaire spécialisée du SNC (Tremblay, Lecours et al. 2015).

Ces affirmations restent valables aujourd'hui. L'homologie phénotypique avec les macrophages caractérisée notamment par la présence d'antigènes comme F4/80, CD11b ou le récepteur Fc va confirmer l'origine myéloïde de la microglie (Perry, Hume et al. 1985).

Une origine hématopoïétique de la microglie a longtemps été débattue et ce n'est que très récemment que son origine a finalement été mise en évidence. La microglie dérive de progéniteurs myéloïdes appelés macrophages primitifs issus du sac vitellin très tôt au cours du développement (avant le 9ème jour embryonnaire chez la souris et 4 semaines et demi chez le fœtus humain) (Ginhoux, Greter et al. 2010). Chez les mammifères, ces macrophages primitifs vont migrer à travers le système circulatoire, dès lors que celui-ci est mis en place, pour venir coloniser le parenchyme cérébral. Une fois atteint, cette population cellulaire prolifère d'abord sous forme de cellules amiboïdes avant de coloniser l'ensemble du parenchyme cérébral et d'adopter une morphologie ramifiée (à partir du deuxième trimestre chez l'Homme) (Monier, Evrard et al. 2006).

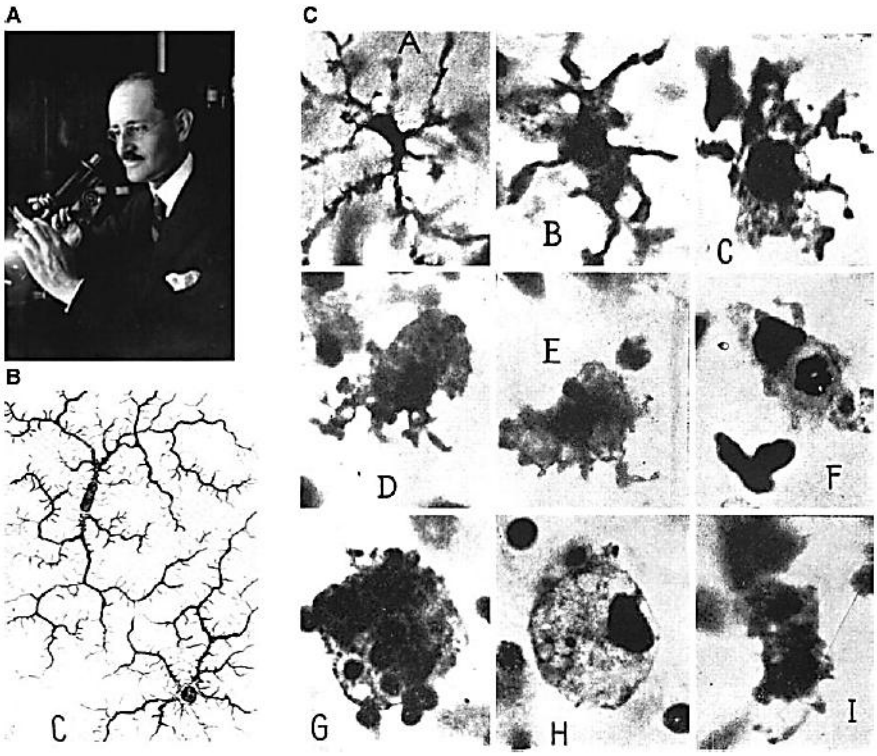


Figure 1 : Cellule microgliale découverte par Pio del Rio-Hortega.
A : Pio del Rio-Hortega (1882–1945). B : Illustration de microglie ramifiée [D'après Del Rio-Hortega] C : Evolution de la microglie durant son activité phagocytaire. A, cellule avec de fins et longs prolongements ; B, cellules avec de plus petits prolongements et un élargissement du corps cellulaire ; C, cellule hypertrophique avec des pseudopodes; D et E, formes amiboïde et pseudopodique ; F, phagocytose de leucocyte; G, phagocytose d'érythrocytes; H, cellule granuleuse ; I, cellule en mitose. (Photographies de del Rio-Hortega, d'après Kettenmann, Hanisch et al. 2011).

Alors que la plupart des macrophages tissulaires ont une origine hématopoïétique commune aux monocytes, la population microgliale se différencie avant la formation de l'hématopoïèse et la formation de la barrière hémato-encéphalique (BHE) (avant 13,5 jours embryonnaires chez la souris). Chez les vertébrés, la conservation de ces macrophages primitifs dont provient la microglie suggère un rôle important de ces cellules au cours du développement embryonnaire. La microglie a donc une origine distincte des autres cellules phagocytaires mononuclées. La capacité des cellules monocytaires à se différencier dans le parenchyme cérébral en cellules semblables aux cellules microgliales a longtemps contribué à maintenir l'ambiguïté sur l'origine de la microglie (Ginhoux, Lim et al. 2013).

La microglie a la capacité de maintenir stablement sa population par un auto-renouvellement local et la contribution de cellules du compartiment hématopoïétique en condition physiologique semble négligeable. Chez l'Homme, son renouvellement est lent

(28% par an), certaines cellules pouvant se maintenir pendant plusieurs décennies, ce qui prédit un renouvellement obligatoire de toutes les cellules microgliales au cours d'une vie (Réu, Khosravi et al. 2017). Cette longévité et cette capacité d'auto-renouvellement sont des caractéristiques remarquables à mettre en parallèle avec l'importante plasticité phénotypique de ces cellules.

Dans certaines conditions pathologiques, des précurseurs sanguins ou de la moelle osseuse ont la capacité des générer des cellules myéloïdes colonisant le parenchyme cérébral et adoptant un phénotype de cellule microgliale, de façon similaire aux macrophages infiltrants colonisant un tissu en réponse à la sécrétion de molécules chimio-attractives par ce tissu. Des cellules microgliales infiltrantes ont pu être mises en évidence dans des modèles de transplantation de cellules souches hématopoïétiques, après irradiation et altération de la BHE, ou dans des modèles de maladies neurodégénératives chroniques ou encore chez la souris déficiente pour le gène *PU.1*, où la microglie endogène embryonnaire est absente (Beers, Henkel et al. 2006, Ginhoux, Lim et al. 2013).

De récentes études suggèrent que les autres populations de macrophages du SNC comprenant les macrophages périvasculaires, les macrophages méningés et les macrophages du plexus choroïde proviendraient de macrophages primitifs et formeraient des populations stables de façon comparable aux cellules microgliales. Ces cellules sont susceptibles de contribuer au maintien de l'homéostasie du SNC et d'assurer des fonctions similaires à celles de la microglie en conditions normales et pathologiques (Goldmann, Wieghofer et al. 2016).

II. La microglie en contexte physiologique

II.1. La microglie, cellule sentinelle

La microglie présente des différences ontogéniques mais également phénotypiques et fonctionnelles avec les autres macrophages tissulaires. Dans le cerveau mature sain, la microglie se distingue des autres macrophages par sa morphologie ramifiée : un corps cellulaire réduit et des prolongements fins couvrant une surface importante. A l'état physiologique, les cellules microgliales sont souvent vues comme adoptant un état de « repos ». Cette vision tient aussi au fait qu'un grand nombre d'études se sont concentrées sur la régulation de l'activité inflammatoire de la microglie. Toutefois, *in vivo*, même dans son état de « repos », la microglie est hautement dynamique et présente une très grande motilité lui permettant d'explorer son microenvironnement (Nimmerjahn, Kirchhoff et al. 2005). Sa

distribution spatiale homogène permet de maintenir une surveillance de régions distinctes, sans chevauchement entre cellules. Les fins prolongements grandement motiles et pourvus de nombreux filopodes des cellules microgliales facilitent une réaction rapide à toute perte d'équilibre homéostatique. La microglie possède alors la capacité d'adopter une morphologie amiboïde et un phénotype dit « activé ». Ce processus s'accompagne d'un réarrangement rapide du cytosquelette d'actine, d'une expression accrue de récepteurs membranaires et d'une augmentation de son activité phagocytaire ou cytotoxique. La microglie peut donc présenter des profils d'activation variés, susceptibles de promouvoir une réponse pro-inflammatoire ou anti-inflammatoire, permettant la régénération tissulaire et la survie des cellules neuronales et gliales. Cette plasticité a un rôle potentiel dans le nettoyage du parenchyme cérébral des produits métaboliques et composants tissulaires dégradés (Nimmerjahn, Kirchhoff et al. 2005).

La microglie possède un seuil d'activation très bas et a la capacité de détecter une très grande gamme de signaux. Les cellules microgliales se différencient notamment des autres cellules myéloïdes du fait de la présence d'un grand nombre de récepteurs aux neurotransmetteurs qui sont utiles à son interaction avec les autres cellules du SNC (Neumann, Kotter et al. 2009). L'adénosine triphosphate (ATP) semble être le médiateur essentiel de la réponse rapide de la microglie, en impliquant les récepteurs purinergiques métabotropes P2Y (davantage que les récepteurs ionotropes P2X) exprimés par la microglie. Un accroissement local du niveau d'ATP extracellulaire semble suffisant pour entraîner une réponse microgliale (Davalos, Grutzendler et al. 2005).

La capacité de régénération limitée du tissu nerveux pourrait expliquer une spécialisation des cellules immunitaires au sein du SNC dans l'intérêt de limiter les dommages de nature inflammatoire dans ce tissu. Un dommage tissulaire de nature nécrotique est fortement à même d'entraîner la libération de médiateurs d'une réaction inflammatoire. Dans le SNC mature, les cellules microgliales posséderaient une signature moléculaire unique dépendant du « Transforming Growth Factor β » (TGFβ), les distinguant des autres cellules myéloïdes infiltrantes. Cette signature moléculaire serait responsable de la fonction homéostatique de ces cellules, en régulant notamment l'expression du récepteur purinergique métabotrope P2RY12. (Butovsky, Jedrychowski et al. 2014). En parallèle, les neurones et cellules stressées ou endommagées devant être phagocytés libèrent un signal chimio-attractif (appelé « find-me signal »), faisant intervenir l'ATP ou la chimiokine fractalkine (CX3CL1). En outre, la différenciation sexuelle est suspectée d'influencer la réponse microgliale.

L'œstradiol semble notamment capable de réguler le nombre de cellules microgliales et la réponse immunitaire observée dans le SNC (Colonna and Butovsky 2017).

II.2. La microglie, phagocyte spécialisé

La microglie exerce également une activité de phagocytose essentielle à la réparation tissulaire. La phagocytose est le processus cellulaire par lequel un composant extracellulaire de grande taille (>0,5µm), une autre cellule ou partie d'une cellule est absorbé et digéré. Ce processus dépend alors de la reconnaissance du signal de phagocytose (appelé « eat-me signal », comme l'exposition de phosphatidylsérine) et d'opsonines (comme les composants du complément C1q et C3b ou encore la protéine « Milk fat globule-EGF factor 8 » (MFGE-8)), à la surface d'une cellule cible par des récepteurs de phagocytose exprimés par la microglie (Vilalta and Brown 2017).

De façon notable, le « triggering receptor expressed on myeloid cells 2 » (TREM2) apparaît comme un des principaux récepteurs de phagocytose. Ce récepteur a la capacité de reconnaître un grand nombre de ligands et d'affecter la réponse microgliale. Ces signaux moduleraient la réponse métabolique et promouvraient la survie, la prolifération ainsi que l'activité de phagocytose de ces cellules, notamment via l'activation de la protéine adaptatrice DAP12 et des voies de signalisation Wnt/β-Catenin et mTor (Ulland, Song et al. 2017, Zheng, Jia et al. 2017). La signalisation via ce récepteur aurait en outre un effet anti-inflammatoire en facilitant la phagocytose de débris myéliniques et en augmentant l'activité lysosomale des cellules phagocytaires. La baisse ou la perte d'expression de TREM2 serait associée à une réparation tissulaire défaillante et une expression accrue de cytokines pro-inflammatoires (Takahashi, Prinz et al. 2007). Enfin, ce récepteur aurait notamment pour ligand l'apolipoprotéine E (ApoE) et jouerait un rôle central dans la pathogénèse de la maladie d'Alzheimer (Atagi, Liu et al. 2015).

II.3. La microglie, essentielle au développement du SNC

En condition non-pathologique, la microglie semble aussi fortement impliquée dans la neurogenèse et le développement du SNC. Au cours du développement embryonnaire, la formation des réseaux neuronaux corticaux dans le télencéphale semble dépendre de l'activité microgliale (Squarzoni, Oller et al. 2014). Durant la période postnatale également, un important « turnover » synaptique a lieu et la maturation synaptique est associée à une élimination importante de synapses non-fonctionnelles, nommée élagage synaptique

(« synaptic pruning »). L'élimination sélective de connexions synaptiques inappropriées, dépendrait notamment de plusieurs signaux comme le complément ou la chimiokine fractalkine (CX3CL1). La cascade du complément initiée dans les neurones concernés permettrait de cibler les synapses non-sollicitées. Ces dernières peuvent alors être phagocytées par la microglie exprimant le récepteur au composant C3 du complément (Stevens, Allen et al. 2007). Dans la souris déficiente pour le récepteur à la fractalkine CX3CR1 (qui se trouve n'être exprimé que par la microglie au sein du SNC), une augmentation du nombre d'épines dendritiques et de synapses immatures est observée, caractéristique d'un réseau neuronal immature et en concordance avec un élagage synaptique insuffisant (Paolicelli, Bolasco et al. 2011). Enfin, les expériences sensorielles seraient à même de modifier les interactions entre microglie et synapses, impliquant alors une influence possible de la microglie dans la régulation de la plasticité synaptique (Tremblay, Lowery et al. 2010).

Bien que la microglie ait longtemps été vue comme contrôlant une réponse inflammatoire souvent délétère, ces cellules assurent aussi une fonction neurotrophique essentielle. Les facteurs neurotrophiques majeurs sécrétés par la microglie comprennent l'« insulin growth factor 1 » (IGF1), le « brain-derived neurotrophic factor » (BDNF) ou le « nerve growth factor » (NGF) et jouent un rôle dans la survie et la différenciation des cellules neuronales et gliales. Enfin, plusieurs expériences soutiennent un rôle régulateur de la microglie dans le développement des cellules souches neuronales au sein des sites de neurogenèse postnatale (Walton, Sutter et al. 2006).

III. La microglie dans le contexte inflammatoire

III.1. Réponse immunitaire innée au sein du SNC et plasticité fonctionnelle de la microglie

La réponse immunitaire innée au sein du SNC est grandement assurée par la microglie, dont les fonctions principales sont la phagocytose, la synthèse de molécules inflammatoires et la présentation antigénique. La reconnaissance d'une perturbation interne est un prérequis essentiel à l'induction de la réaction inflammatoire. Cette reconnaissance est assurée par un ensemble de récepteurs, du nom de « pattern-recognition receptors » (PRR). Ces récepteurs peuvent être solubles, membranaires ou cytosoliques, et reconnaissent tout autant les signatures moléculaires de classes de pathogènes appelées « pathogen-associated molecular

patterns » (PAMP) que des molécules générées au cours de stress cellulaires autres qu'infectieux appelées « damage-associated molecular pattern » (DAMP). Bien que ces PRR soient exprimés par toutes les cellules du SNC, la microglie en exprime une panoplie plus importante. Parmi ces PRR, on trouve la famille des « Toll-like receptor » (TLR) qui reconnaissent une variété importante de ligands. Le TLR4 a notamment la capacité de reconnaître les lipopolysaccharides (LPS) d'origine bactérienne et d'entraîner une réponse inflammatoire via la voie de signalisation « nuclear factor-kappa B » (NF-κB) (Ransohoff and Perry 2009).

En conséquence de ces signaux, la microglie a la capacité de s'activer et d'adopter un phénotype polarisé adapté. L'activation de la microglie est souvent catégorisée en état d'activation M1, phénotype classique pro-inflammatoire et état M2, phénotype alternatif, anti-inflammatoire et neuroprotecteur, par analogie avec les états d'activation macrophagique. Le phénotype M1 est caractérisé par la sécrétion de cytokine comme l'interleukine 1β (IL-1β), le « tumor necrosis factor-α » (TNFα) ou l'IL-6. Le phénotype alternatif M2 est souvent sous-catégorisé en différents états, M2a M2b ou M2c, associés à la sécrétion de cytokines anti-inflammatoires ou immuno-modulatrices comme l'IL-4, l'IL-13, l'IL-10 ou le TGFβ. Bien qu'utile pour conceptualiser la réponse microgliale, cette classification tend à être délaissée, l'activation microgliale révélant des réponses transcriptionnelles bien plus variées et dépendantes du contexte (Butovsky, Jedrychowski et al. 2014, Ransohoff 2016). Il convient de noter que la courte durée de vie des ARN messagers (ARNm) de ces cytokines permet une régulation fine de la réponse au cours du temps et une plasticité importante des cellules sécrétrices.

La microglie exerce aussi sa réponse immunitaire par la libération de monoxyde d'azote (NO) ayant un effet bactéricide et régulateur de l'apoptose. Sa synthèse est régulée par l'expression de la NO synthase inductible (iNOS), enzyme largement surexprimée en réponse au LPS (Lee, Lee et al. 2001). En réponse à un stimulus inflammatoire, la microglie libère également des espèces réactives de l'oxygène (ERO). Cette synthèse d'ERO s'accompagne de réarrangements mitochondriaux, métaboliques et morphologiques dans la microglie impliquant la voie de signalisation « Mitogen-activated protein kinases » (MAPK) (Katoh, Wu et al. 2017).

En condition inflammatoire, une augmentation du nombre de cellules microgliales est couramment observée, phénomène appelé microgliose réactive. La prolifération et le recrutement de cellules microgliales sont associés à la sécrétion de molécules chimio-attractives et à l'infiltration de cellules myéloïdes circulantes. La chimiokine CCL2 (ou

« monocyte chemoattractant protein 1 ») sécrétée et reconnue par la microglie, contribue fortement à ce recrutement (Hinojosa, Garcia-Bueno et al. 2011).

La réponse immunitaire innée est également douée d'une mémoire, induite par des modifications épigénétiques ou transcriptionnelles dans les cellules myéloïdes. Cette mémoire immunitaire peut être disséquée en deux mécanismes : l'entraînement qui amplifie la réponse immunitaire et la tolérance qui la diminue. Chez la souris, une stimulation périphérique par le LPS précédant la stimulation centrale entraîne une réponse inflammatoire accrue de la microglie. En parallèle, quatre injections systémiques de LPS préalables entraînent une réponse immunitaire centrale diminuée. Ces mécanismes sont fortement susceptibles d'influencer la réponse microgliale dans de nombreuses pathologies incluant des maladies neurodégénératives ou les atteintes cérébrovasculaires. (Wendeln, Degenhardt et al. 2018)

III.2. Réponse immunitaire adaptative au sein du SNC et neuroinflammation

La présence d'une BHE contribue à un certain isolement du SNC. Le système vasculaire cérébral comporte une anatomie singulière qui forme la BHE. Celle-ci est composée notamment de cellules endothéliales jointes par des jonctions serrées (composées de protéines transmembranaires comme les claudines, occludines et les molécules de jonctions adhérentes ou protéines cytoplasmiques associées à la membrane comme les zona occludens) et entourées d'une lame basale. Ces cellules endothéliales sont entourées de péricytes et de pieds astrocytaires au contact de la lame basale, l'ensemble limitant et sélectionnant alors fortement les échanges moléculaires. Cette BHE est donc essentielle au maintien d'un environnement immuno-suppresseur dans le parenchyme cérébral, protégeant des composants sériques, et permet de différencier la réaction inflammatoire au sein du SNC des réactions inflammatoires périphériques. Le SNC est également caractérisé par un faible niveau d'expression des molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH). Pour autant, des processus d'immuno-surveillance existent au sein du SNC, en association avec une faible quantité de lymphocytes patrouillant dans le parenchyme cérébral et le liquide céphalo-rachidien (LCR) en condition physiologique. En condition inflammatoire, la microglie est en mesure de surexprimer un répertoire de molécules permettant la présentation antigénique et la co-stimulation des lymphocytes T, comme les molécules du CMH de classe I et de classe II, le CD80 et CD86. Ces modifications s'accompagnent de l'expression de cytokines et de chimiokines régulant la réponse immunitaire et la perméabilité de la BHE. Tout dérèglement

de l'intégrité de la BHE est alors accompagné d'un recrutement significatif de cellules immunitaires circulantes (Ransohoff and Engelhardt 2012).

Le SNC s'est longtemps vu attribuer le statut d'organe immuno-privilégié mais plusieurs découvertes ces dernières années ont contribué à remettre en cause et à redéfinir ce statut (Louveau, Harris et al. 2015). Un système lymphatique méningé a récemment été mis en évidence, drainant le LCR, les cellules immunitaires et composants immunogènes jusqu'aux ganglions lymphatiques cervicaux. La présentation d'antigènes du SNC (auto-antigènes et antigènes étrangers) est donc également assurée par des cellules dendritiques méningées, cellules présentatrices spécialisées (Louveau, Harris et al. 2015).

IV. Modèles d'étude de la microglie

La microglie étant très sensible à son microenvironnement, les moyens d'études de cette population cellulaire sont rapidement limités par les variations phénotypiques associées au contexte de leur étude. Des limitations techniques importantes persistent et restreignent l'étude des cellules microgliales. Pourtant, de par leur rôle dans l'initiation de la réponse immunitaire au sein du SNC, il est difficile d'imaginer l'absence d'une influence de ces cellules et ce quel que soit le contexte neuropathologique. Ainsi, on porte dorénavant beaucoup plus d'attention à l'influence de la microglie dans le contexte de très nombreuses maladies longtemps considérées comme purement neurologiques.

IV.1. *In vivo*

Chez la souris comme chez l'Homme, les études immuno-histochimiques (IHC) se sont avérées essentielles à l'étude de la microglie. Les marqueurs classiquement employés comprennent les antigènes Iba1, CD11b et F4/80. Cependant, la microglie présente des niveaux d'expression faibles pour les marqueurs de surface comparativement aux autres cellules immunitaires et présente peu ou pas de marqueurs spécifiques. L'isolement de ces cellules est rendu difficile et les artefacts techniques ainsi que les contaminations par d'autres populations cellulaires sont fréquents (Ransohoff and Perry 2009).

Plus récemment, des modèles de souris transgéniques déficientes pour le récepteur CX3CR1 (exprimé uniquement par la microglie dans le parenchyme cérébral), ou dont l'expression est couplée à une protéine fluorescente, ont permis d'apporter des éclaircissements sur la fonction microgliale dans le SNC intact (Paolicelli, Bolasco et al. 2011).

IV.2. *In vitro*

Les systèmes d'étude de la microglie *in vitro* représentent un outil critique dans l'étude de cette population cellulaire. La culture primaire consiste en l'isolement et l'expansion de cellules microgliales néonatales. Ces cellules sont cultivées sur un tapis astrocytaire, essentiel au développement d'un phénotype microglial, en présence de CSF-1 (« Macrophage colony-stimulating factor 1 »). Toutefois, la microglie *in vitro* ne subit pas l'influence du microenvironnement cérébral mature en présence d'une BHE fonctionnelle, et les conditions de culture sont susceptibles de promouvoir un phénotype pro-inflammatoire de ces cellules. La microglie *in vitro* (microglie primaire et lignées cellulaires) semble présenter une signature moléculaire homéostatique (dépendante du TGFβ) fortement dérégulée (Butovsky, Jedrychowski et al. 2014).

Pour s'abstenir des contraintes associées à la culture primaire, plusieurs lignées cellulaires ont été établies, les plus communes étant les lignées murines BV-2 et N9. La lignée BV-2 a été obtenue par immortalisation de cellules microgliales néonatales issues de souris C57BL/6 à l'aide du rétrovirus J-2, porteur des oncogènes v-raf et v-myc. Les cellules immortalisées conservent leurs propriétés phénotypiques et immunologiques, de phagocytose et de sécrétion cytokinique (Blasi, Barluzzi et al. 1990). Cette lignée a été largement caractérisée (1236 articles avec le terme « BV-2 » sont recensés sur pubmed le 08/10/18) mais la pertinence de ce modèle reste débattue. Bien que ne récapitulant pas l'ensemble des caractéristiques de la microglie *in vivo*, cette lignée présente une réponse aux stimuli pro-inflammatoires (comme une exposition au LPS) et des interactions cellulaires très similaires à la microglie primaire et représente un substitue valide (Henn, Lund et al. 2009).

Par ailleurs, le développement récent de cellules microgliales humaines dérivées de cellules pluripotentes induites apparaît comme une alternative prometteuse pour l'étude de ces cellules (Abud, Ramirez et al. 2017). Enfin, la culture organotypique de tranches de tissu cérébral constitue une approche intermédiaire et avantageuse, les cellules microgliales conservant leur phénotype de cellules résidentes.

V. Microglie, atteintes de la substance blanche et leucodystrophies

V.1. La microglie dans les maladies démyélinisantes

Les maladies démyélinisantes sont caractérisées par un déséquilibre entre démyélinisation et remyélinisation. Les causes de ce déséquilibre et des déficits de

remyélinisation sont souvent mal connues mais l'élimination ou clairance des débris myéliniques semble être une étape critique dans ces processus. L'activité de phagocytose de la microglie est alors cruciale pour permettre la régénération tissulaire. Celle-ci impliquerait le récepteur CX3CR1 et constituerait une condition essentielle au recrutement et à la différenciation des précurseurs oligodendrocytaires permettant la remyélinisation (Lampron, Larochelle et al. 2015). Dans des modèles expérimentaux de démyélinisation progressive, comme le modèle murin cuprizone, une microgliose réactive en réponse à l'atteinte des oligodendrocytes est observée. La prolifération et le recrutement des cellules microgliales dans ce contexte sont souvent associés à une réponse neuro-inflammatoire délétère. Cependant, la phagocytose de débris myéliniques par ces cellules a été démontrée comme permettant de supprimer une réponse inflammatoire dans un modèle murin d'encéphalite auto-immune (Liu, Hao et al. 2006). La microglie assure donc des fonctions différentes et adopte des phénotypes complémentaires au cours de l'atteinte pour permettre une réparation (Figure 2).

La microglie assure également une fonction de présentation antigénique délétère dans des conditions présentant une composante auto-immune comme dans la sclérose en plaque. Dans différents contextes d'atteinte démyélinisante, la microglie semble également subir la réponse inflammatoire et serait plus susceptible à l'apoptose que d'autres macrophages (White, McCombe et al. 1998).

En lien avec l'importante vulnérabilité de la microglie, un nombre croissant de gènes reliés à la fonction microgliale sont associés à des maladies neurologiques dont plusieurs sont des atteintes de la substance blanche, tissu riche en myéline (Prinz and Priller 2014). L'haploinsuffisance en récepteur à la chimiokine CSF1 (CSF1R) est associée à une maladie appelée leuco-encéphalopathie héréditaire diffuse à sphéroïdes axonaux et cellules gliales pigmentées. La déficience en CSF1R semble avoir pour effet principal une dysfonction microgliale majeure, une diminution de la densité microgliale au sein du SNC et la présence de régions dépourvues de microglie entrainant une perte d'homéostasie et une atteinte de la substance blanche (Oosterhof, Kuil et al. 2018). La déficience en TREM2 ou DAP12 est responsable d'une démence avec leucoencéphalopathie, la maladie de Nasu-Hakola (Klunemann, Ridha et al. 2005).

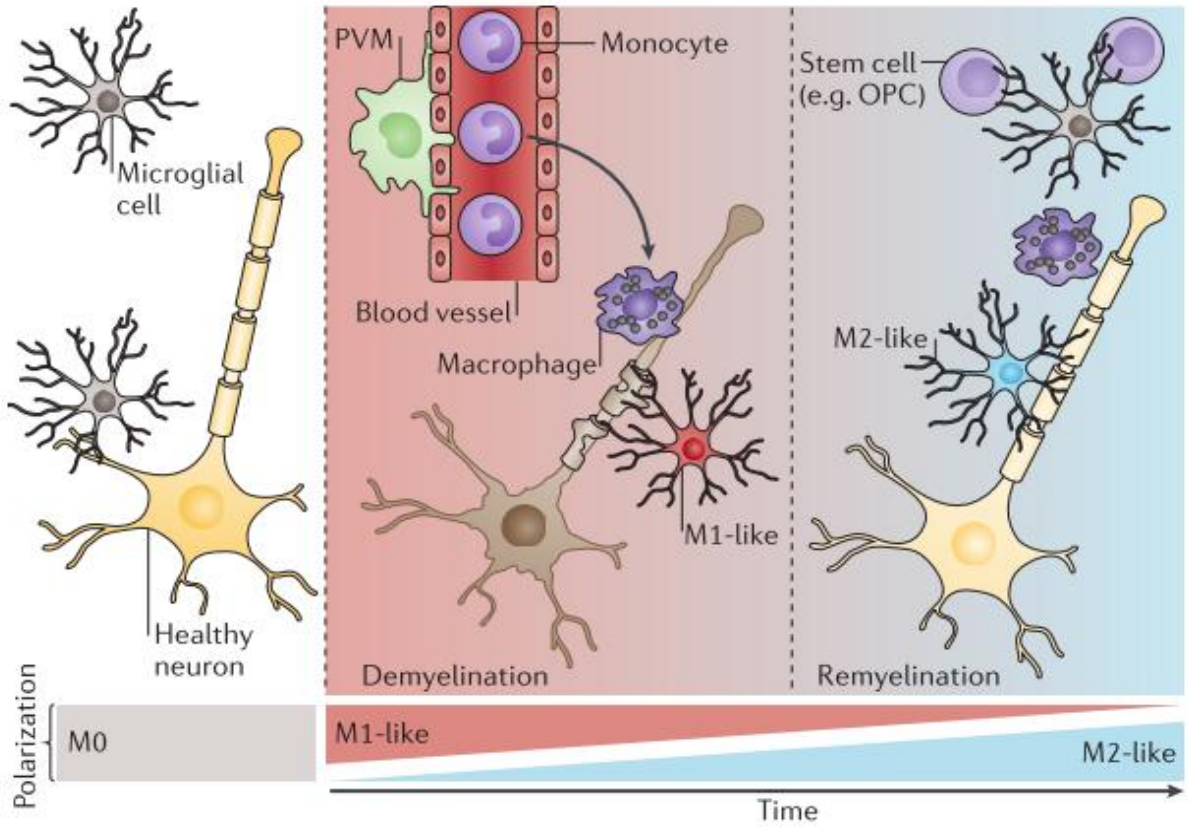


Figure 2 : Reprogrammation fonctionnelle de la microglie.
En réponse à une atteinte, la microglie jusqu'alors « au repos » (M0) s'active, produit des cytokines pro-inflammatoires (M1), et recrute potentiellement des monocytes infiltrants participants à la réponse inflammatoire (démyélinisation). Après un certain temps, la microglie et les éventuelles cellules recrutées adoptent un phénotype anti-inflammatoire, facilitant la clairance des débris myéliniques, le recrutement des précurseurs oligodendrocytaires et la régénération tissulaire (remyélinisation). Adapté de Prinz and Priller 2014.

V.2. Les leucodystrophies

Les leucodystrophies forment un groupe hétérogène de maladies aux manifestations cliniques et pathologiques variables. Ces maladies ont pour point commun la présence d'une anomalie de la substance blanche. En 2015, le consortium d'experts « Global Leukodystrophy Initiative » propose la définition suivante : les leucodystrophies sont des maladies génétiques affectant la substance blanche du SNC avec ou sans atteinte du système nerveux périphérique. Ces maladies ont en commun des anomalies gliales ou des gaines de myéline. Leurs neuropathologies lorsqu'elles sont connues sont essentiellement caractérisées par une implication des oligodendrocytes, astrocytes ou d'autres cellules non-neuronales bien qu'une pathologie axonale puisse être associée (Vanderver, Prust et al. 2015). Il existe ainsi plus de 30 leucodystrophies distinctes et des efforts de classification selon leurs causes ont été entrepris (Tableau 1).

Les leucodystrophies comprennent des maladies dont les causes sont associées à des défauts métaboliques, mitochondriaux ou lysosomaux comme la maladie de Krabbe, causée par une déficience en galactosylcéramidase. Dans cette maladie, une dysfonction microgliale semble être à l'origine d'un phénotype aberrant entraînant une activité cytotoxique envers les oligodendrocytes et une atteinte démyélinisante (Nicaise, Bongarzone et al. 2016).

Un certain nombre de leucodystrophies est associé à des défauts du peroxysome, comme le syndrome de Zellweger (ZS) ou l'adrénoleucodystrophie liée à l'X (X-ALD), leucodystrophie la plus fréquente. Des détails concernant les fonctions du peroxysome et les pathologies associées sont abordés au chapitre suivant (2ème chapitre). Enfin, une attention plus particulière sera portée à la physiopathologie de l'X-ALD dans le 3ème chapitre introductif.

Tableau 1 : Maladies classées comme Leucodystrophies *(d'après Vanderver, Prust et al. 2015)*

Organite ou processus cellulaire	**Maladies classées comme leucodystrophies**
Lysosome	Leucodystrophie à cellules globoïdes (maladie de Krabbe) Leucodystrophie métachromatique Maladie de Salla Fucosidose
Peroxysome	Adrénoleucodystrophie liée à l'X Déficience en protéine D-Bifonctionnelle Déficience en Sterol Carrier Protein X Déficience en Acyl-CoA Oxydase Peroxysomale Maladie de la biogenèse du peroxysome (Maladie de Refsum infantile, Adrénoleucodystrophie néonatale, Syndrome de Zellweger)
Mitochondrie	Leucoencéphalopathie avec atteinte du tronc cérébral et de la moelle épinière et augmentation de lactate (LBSL) Hypomyélinisation avec atteinte du tronc cérébral et leucoencéphalopathie avec atteintes du thalamus et du tronc cérébral et augmentation de lactate (LTBL)
Maladies héréditaires du metabolisme	Maladie de Canavan Maladie des corps de polyglucosane Acidurie L 2 hydroxyglutarique Xanthomatose cérébrotendineuse

CHAPITRE 2 : LE PEROXYSOME ET LES PATHOLOGIES PEROXYSOMALES

I. Introduction sur le peroxysome

I.1. Fonctions métaboliques du peroxysome

Les peroxysomes sont de petits organites sphéroïdes de taille comprise entre 0,1 et 1 µm. Ils sont présents dans toutes les cellules eucaryotes, à l'exception de quelques cellules anucléées comme les érythrocytes ou les cellules du cristallin. Ils sont composés d'une membrane simple, constituée d'une bicouche lipidique, et comportent des protéines membranaires et matricielles importées depuis le cytosol. Il existe une diversité importante de peroxysomes, variant en taille, composition et fonction, et dépendant du type cellulaire et de l'environnement. Chez l'Homme, on estime à près de 50 le nombre d'activités enzymatiques peroxysomales, dont plusieurs présentent une expression dépendante du tissu. Les peroxysomes sont largement impliqués dans le métabolisme lipidique et bien que les fonctions assurées par les peroxysomes diffèrent entre espèces, la β-oxydation des acides gras (AG) est souvent considérée comme la fonction la plus importante (Wanders and Waterham 2006). Les peroxysomes sont notamment essentiels à la β-oxydation des acides gras à très longue chaîne (AGTLC) (plus de 22 atomes de carbone) saturés, mono-insaturés et poly-insaturés, des AG à chaîne branchée, des acides dicarboxyliques ou encore des précurseurs d'acides biliaires. De manière notable, la β-oxydation peroxysomale participe à la synthèse d'AG polyinsaturés n-3 primordiaux comme l'acide docosahexaénoïque (DHA). Ce dernier entre dans la composition des phospholipides membranaires affectant fortement leurs propriétés physico-chimiques et la fluidité des membranes biologiques. Le DHA est fortement présent au sein du SNC et est essentiel à son développement. Il présente un effet antioxydant à faible dose et est également le précurseur de médiateurs anti-inflammatoires comme les résolvines, les neuroprotectines ou les marésines. La β-oxydation peroxysomale est également impliquée dans la dégradation des eicosanoïdes, médiateurs lipidiques de l'inflammation, dérivés de l'acide arachidonique (AA ou C20:4) incluant les prostaglandines 2F alpha, le thromboxane A2 (Diczfalusy, Vesterqvist et al. 1993) ou les leucotriènes B4 ou TE4 (Mayatepek, Ferdinandusse et al. 2004). De plus, une activité époxyde hydrolase serait localisée au sein du peroxysome, contrôlant la dégradation des acides époxyeicosatriénoïques, médiateurs lipidiques aux propriétés neuroprotectrices (Nelson, Zhang et al. 2015).

Les peroxysomes jouent aussi un rôle essentiel dans la synthèse des éthers phospholipides. Ces derniers incluent les plasmanyl-phospholipides et les plasmenyl-phospholipides aussi appelés plasmalogènes. Ils représentent, selon les tissus, une part importante des phospholipides. Le SNC et surtout la myéline sont richement pourvus en plasmenyl-éthanolamine mais les macrophages et les neutrophiles comportent également des taux élevés en plasmenyl-éthanolamine ainsi qu'en plasmanyl-choline, précurseur d'un facteur d'activation plaquettaire. Cette classe de molécules essentielles connait des implications dans la dynamique membranaire, les voies de signalisation intracellulaire, le transport du cholestérol, l'homéostasie redox ou encore le métabolisme des AG polyinsaturés. La biosynthèse des éthers phospholipides fait d'abord intervenir 2 enzymes peroxysomales, l'« alkyl-dihydroxyacetone phosphate synthase » (ADHAPS) et la « dihydroxyacetone phosphate acyltransferase » (DHAPAT) avant de se poursuivre au niveau du réticulum endoplasmique (RE) (Wanders and Waterham 2006).

Le peroxysome permet également la dégradation des AG par α-oxydation. Cette voie catabolique intervient majoritairement dans l'oxydation des AG possédant un groupement méthyl en position 3. Elle concerne ainsi essentiellement la prise en charge de l'acide phytanique, faisant intervenir la phytanoyl-CoA hydroxylase (PHYH).

Au-delà de cette implication dans le métabolisme lipidique, le peroxysome possède de nombreux rôle détoxifiants chez l'Homme et participe à la fonction hépatique en assurant également la dégradation du glyoxylate grâce à l'alanine-glyoxylate aminotransferase, prévenant ainsi la formation de l'oxalate, un métabolite toxique. Les peroxysomes sont aussi largement impliqués dans la régulation du stress oxydant par l'activité d'enzymes telle que la catalase, la glutathion peroxydase ou la peroxirédoxine V (Fransen, Nordgren et al. 2012). Plusieurs oxydases associées à la β-oxydation peroxysomale sont responsables de la réduction de l'O_2 en H_2O_2 et la catalase permet alors la décomposition de l'H_2O_2 formé en H_2O et O_2. Son activité contribue notamment à la visualisation des peroxysomes au moyen de la 3,3'-diaminobenzidine. En parallèle, une importante quantité d'anions superoxydes est produite au sein du peroxysome et est ainsi couplée à une activité superoxyde dismutase (SOD) (Schrader and Fahimi 2006). Enfin, l'iNOS serait partiellement localisée au niveau du peroxysome, en faisant donc un site majeur de la production, non seulement d'ERO, mais aussi d'espèces réactives de l'azote (Fransen, Nordgren et al. 2012, Loughran, Stolz et al. 2013).

Les protéines peroxysomales sont spécifiquement adressées au peroxysome grâce à une séquence d'acides aminés appelée « peroxisomal targeting signal » (PTS). Ces motifs

incluent le signal PTS1, une séquence C-terminale de 3 acides aminés (consensus [S/A/C] [K/R/H] L), le signal PTS2 (séquence N-terminale consensus (R/K)/(L/V/I)X5(H(Q)(L/A)), ou encore le PTS membranaire (mPTS) (Otera, Okumoto et al. 1998, Legakis and Terlecky 2001). Certaines protéines peroxysomales présentent différentes isoformes et d'autres localisations cellulaires du fait de la présence d'autres signaux d'adressage ou de leur capacité d'interaction protéique.

Si la mitochondrie est également en mesure de β-oxyder des AG, le peroxysome est l'unique site de β-oxydation des AGTLC. Sa fonction métabolique est donc primordiale pour la cellule, en équilibre avec la synthèse des AGTLC réalisée par les élongases au niveau du RE. Enfin, un certain nombre de fonctions du peroxysome dépendent également de son interaction avec d'autres organelles ; principalement avec la mitochondrie (Lismont, Nordgren et al. 2015, Shai, Yifrach et al. 2018), mais aussi avec le RE (Wanders, Waterham et al. 2015) ou encore les lysosomes (Chu, Liao et al. 2015).

I.2. Introduction sur les pathologies peroxysomales

En 1973, Goldfisher et ses collaborateurs décrivent l'absence de peroxysome dans le foie et les reins d'un patient présentant un syndrome cérébro-hépato-rénal létal plus connu sous le nom de syndrome de Zellweger (ZS) (Goldfischer, Moore et al. 1973). La mise en évidence de plusieurs défauts génétiques entraînant l'absence de peroxysomes fonctionnels, regroupés sous le terme de maladie de la biogenèse peroxysomale, et responsable de syndromes sévères, va souligner l'importance des peroxysomes dans la physiologie humaine. Ces défauts entraînent alors l'accumulation des substrats ou bien la diminution des produits du métabolisme peroxysomal (Tableau 2), avec des conséquences dramatiques pour plusieurs organes, dont le SNC. En parallèle, des déficits en protéines de certaines voies du métabolisme lipidique peroxysomal sont aussi responsables de pathologies, parfois moins sévères, comme les maladies de la β-oxydation peroxysomale. Dans l'X-ALD notamment, l'accumulation d'AGTLC dans le plasma et certains tissus est suspectée d'être à l'origine des anomalies de la substance blanche observées chez une partie des patients. Le défaut d'α-oxydation peroxysomale provoquée par une déficience en phytanoyl-CoA hydroxylase (PHYH) entraîne l'accumulation d'acide phytanique et est responsable d'une leucodystrophie appelé maladie de Refsum (Tableau 2). D'autre part, différentes anomalies génétiques à l'origine d'un défaut de synthèse des plasmalogènes sont responsables d'un syndrome appelé Chondrodysplasie ponctuée rhizomélique. Les patients atteints présentent des anomalies

squelettiques en lien avec des anomalies de calcification ainsi qu'un déficit intellectuel (Tableau 2) (Van Veldhoven 2010).

Il existe par ailleurs d'autres maladies peroxysomales d'origine génétique, souvent moins fréquentes, telles que l'acatalasémie (déficit d'activité catalase) qui ne présentent pas d'anomalies du métabolisme lipidique. Les pathologies peroxysomales abordées ci-dessous sont donc essentiellement associées à des défauts du métabolisme lipidique peroxysomal.

Tableau 2 : Troubles du métabolisme lipidique peroxysomal *(adapté d'après Wanders and Poll-The 2017)*

	OMIM *gène #phénotype	*Gène muté* / protéine dysfonctionnelle	Principaux métabolites concernés
A. Troubles de la β-oxydation peroxysomale			
Adrénoleucodystrophie liée à l'X	*300371 #300100	ABCD1	↗ AGTLC
Déficience en acyl-CoA oxydase 1	*609751 #264470	ACOX1	↗ AGTLC
Déficience en enzyme bifonctionnelle	*601860 #261515	*HSD17B4* / DBP	↗ AGTLC, précurseurs d'acides biliaires, acide pristanique et acide phytanique
Déficience en 2-méthylacyl-CoA racémase	*604489 #614307	AMACR	↗ précurseurs des acides biliaires, acide pristanique et acide phytanique
Déficience en « sterol carrier protein »	*184755 #613724	*SCP2* / SCPx	↗ précurseurs des acides biliaires, acide pristanique et acide phytanique
B. Troubles de la synthèse des éthers phospholipides			
Chondrodysplasie ponctuée rhizomélique de type 2	*602744 #222765	*GNPAT* / DHAPAT	↘ plasmalogènes
Chondrodysplasie ponctuée rhizomélique de type 3	*603051 #600121	*AGPS* / ADHAPS	↘ plasmalogènes
Chondrodysplasie ponctuée rhizomélique de type 4 (PFCRD)	*616107 #616154	*FAR1* / acyl-CoA réductase 1	↘ plasmalogènes
C. Troubles de l'α-oxydation peroxysomale			
Maladie de Refsum	*616107 #266500	*PAHX* / PHYH	↗ acide phytanique
D. Troubles du métabolisme lipidique peroxysomale secondaires / Troubles de la biogénèse peroxysomale			
Maladies du spectre de Zellweger (ZS, Heimler syndrome, NALD, IRD)	*602136 #214100 (...+12)	PEX1,2,3,5,6,10,12,13,14, 16,19,25	↗ AGTLC, précurseurs des acides biliaires, acide pristanique, acide phytanique et ↘ plasmalogènes
Chondrodysplasie ponctuée rhizomélique de type 1	*601757 #215100	PEX7	↗ acide phytanique et ↘ plasmalogènes

En conséquence, plusieurs modèles expérimentaux de pathologies peroxysomales ont été développés. Baes et ses collaborateurs ont largement contribué à la génération de ces modèles et à l'étude des anomalies neuro-développementales associées, en particulier grâce à des modèles murins d'inactivations conditionnelles de gènes de la biogenèse peroxysomale (Baes, Dewerchin et al. 2002). Les peroxysomes sont présents dans tous les types cellulaires du SNC et sont généralement de plus petite taille en comparaison à d'autres tissus. Les souris présentant une déficience peroxysomale conditionnelle dans les cellules astrocytaires, oligodendrocytaires et neuronales (« Nestin reporter ») développent des anomalies de la myélinisation (hypomyélinisation et dysmyélinisation) et une dégénérescence axonale accompagnant une gliose réactive (Hulshagen, Krysko et al. 2008). Les souris avec une déficience peroxysomale dans les cellules oligodendrocytaires seules (« Cnp reporter ») ne montrent pas d'anomalies neuro-développementales à la naissance mais développent à l'âge adulte des lésions démyélinisantes et neuro-inflammatoires (Kassmann, Lappe-Siefke et al. 2007). Toutefois, de nombreux modèles murins de pathologies de la β-oxydation peroxysomale présentent des phénotypes et atteintes du SNC moins sévères que chez l'Homme (Fan, Pan et al. 1996, Pujol, Hindelang et al. 2002).

II. Biogenèse peroxysomale et pathologies associées

II.1 Biogenèse, prolifération et dynamique du peroxysome

Les peroxysomes sont des organites dynamiques, sensibles à l'environnement cellulaire et capables de se multiplier en réponse à diverses stimulations. L'exploration de ces phénomènes a principalement été réalisée à partir de modèles de levures et les explications qui suivent concernent essentiellement les mécanismes observés chez les mammifères et chez l'Homme. La biogenèse des peroxysomes fait intervenir les protéines PEX, dont 36 membres sont aujourd'hui connus (Islinger, Voelkl et al. 2018). Ces protéines sont impliquées dans l'adressage des protéines peroxysomales matricielles et membranaires. Les protéines réceptrices PEX5 et PEX7 jouent notamment un rôle central dans la reconnaissance des PTS1 et PTS2 respectivement et l'adressage des protéines matricielles. Les protéines peroxysomales membranaires (PMP) sont quant à elles adressées soit directement après leur synthèse sur les polyribosomes libres ou après adressage au RE. Les protéines PEX19 et PEX3 sont alors concernées dans la reconnaissance du mPTS (Figure 3) (Smith and Aitchison 2013, Mayerhofer 2016).

Deux voies semblent contribuer à la multiplication des peroxysomes, par croissance et fission ou par biosynthèse *de novo*. Les peroxysomes sont générés *de novo* à partir de structures vésiculaires issues du RE. Ces structures pré-peroxysomales fusionneraient entre elles avant de pouvoir comporter une machinerie d'importation fonctionnelle. Des découvertes récentes ont également mis en évidence un rôle central de la mitochondrie dans la génération *de novo* de peroxysomes. Des vésicules pré-peroxysomales dérivées des mitochondries comportant les protéines PEX3, PEX14 et leurs interactions avec PEX16 seraient nécessaires à cette génération (Sugiura, Mattie et al. 2017).

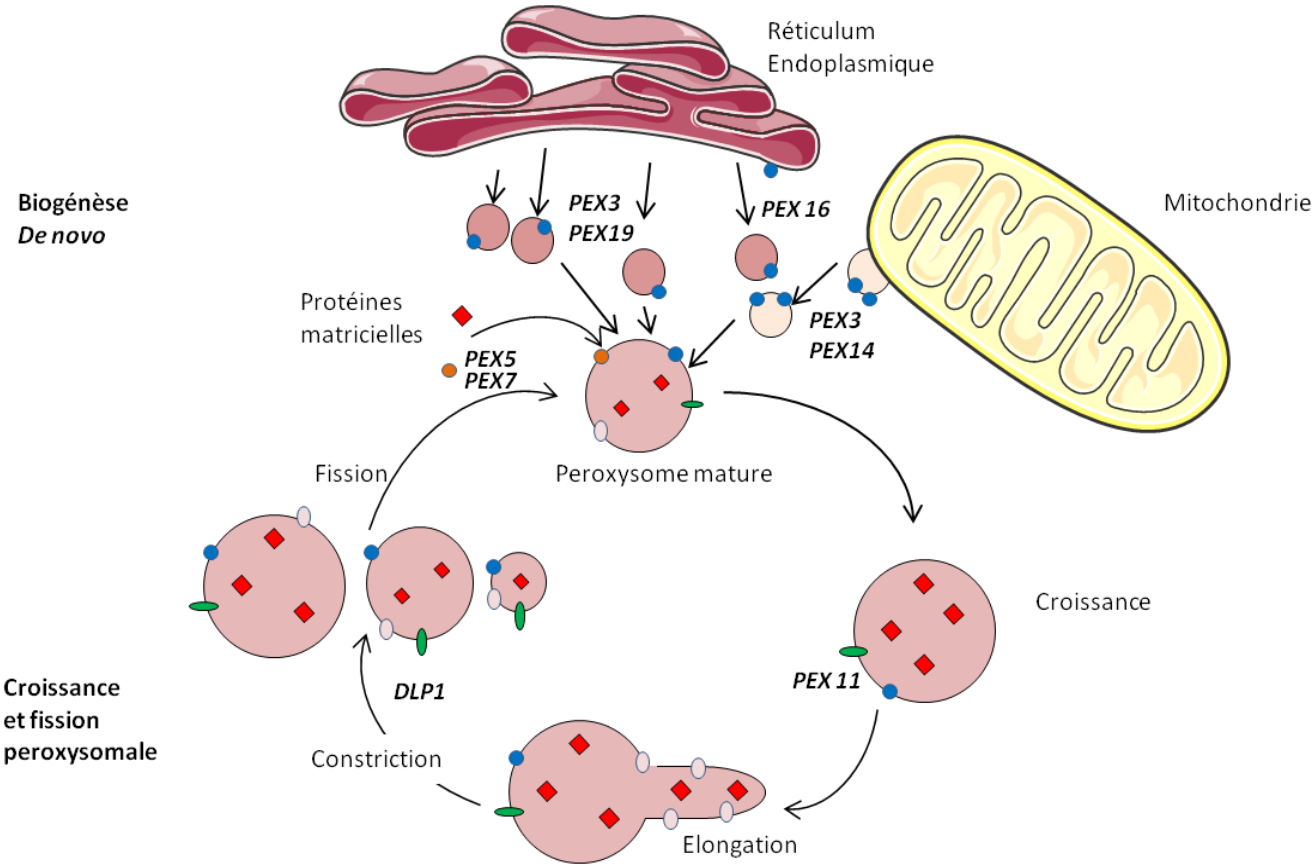


***Figure 3* : Biogenèse et prolifération peroxysomale**
La biogenèse de novo des peroxysomes fait principalement intervenir les protéines PEX3, PEX14, PEX16 et PEX19 depuis le RE et la mitochondrie. Les protéines PEX5 et PEX7 sont impliquées dans l'import des protéines peroxysomales. La prolifération par croissance et fission des peroxysomes fait essentiellement intervenir les protéines PEX11 et DLP1 (adapté d'après Cho, Kim et al. 2018).

La prolifération peroxysomale par croissance et fission chez les mammifères implique majoritairement la protéine PEX11β. Cette dernière intervient dans le remodelage préalable, l'activation de la « Dynamin-like protein » 1 (DLP1) et le recrutement des partenaires nécessaires à la fission peroxysomale (Figure 3). Les autres acteurs centraux incluent les

récepteurs nucléaires activant la prolifération peroxysomale (PPAR), médiateurs des réponses transcriptionnelles en réponse à différentes stimulations. Ils sont notamment en mesure d'entraîner l'augmentation de l'expression des enzymes de la β-oxydation peroxysomale (Schrader, Costello et al. 2016).

Les peroxysomes ont une demi-vie estimée à 2 jours et leur dégradation est contrôlée par une autophagie sélective appelée pexophagie. Une pexophagie anormale est impliquée dans une part importante de troubles de la biogenèse peroxysomale (Nazarko 2017). Les protéines peroxysomales après ubiquitination sont reconnues par les protéines réceptrices NRB1 ou p62 et permettent la formation des autophagosomes pour leur dégradation (Sargent, van Zutphen et al. 2016). D'autre part, la pexophagie semble influencée par la production d'espèces réactives de l'oxygène (ERO) par le biais des protéines ATM et PEX5 (Zhang, Tripathi et al. 2015).

La biogenèse et la dégradation des peroxysomes dépendent aussi fortement du contrôle de leur motilité par le cytosquelette d'actine. La dynamique des peroxysomes et leur bonne répartition au sein de la cellule sont régulées par leurs interactions avec le cytosquelette (protéines associées aux microtubules) en réponse à l'environnement et au cycle cellulaire (Lin, Schuster et al. 2016, Neuhaus, Eggeling et al. 2016). Leur motilité est notamment contrôlée via une interaction entre la protéine peroxysomale membranaire inp2p et la myosine de type V, Myo2 (Fagarasanu, Fagarasanu et al. 2006). La fonction des peroxysomes est également finement régulée par leur dynamique et leur compartimentation.

II.2 Troubles de la biogenèse peroxysomale et syndrome de Zellweger

Des mutations intervenant dans au moins 14 gènes différents codants pour des PEX ont pu être identifiées chez l'Homme comme étant à l'origine de maladies de la biogenèse peroxysomale (« Peroxisomal Biogenesis Disorders ») (Tableau 2). Leur incidence est estimée à près de 1/50 000 (Van Veldhoven 2010). Les anomalies d'assemblage ou de prolifération de peroxysomes ont des conséquences biochimiques telles que l'accumulation d'AGTLC, d'AG à chaîne branchée, de précurseurs d'acides biliaires, la diminution de la synthèse d'AG polyinsaturés ou des plasmalogènes (Waterham and Ebberink 2012).

Les mutations invalidant 13 de ces gènes sont responsables des maladies du spectre de Zellweger (OMIM # 601539 - # 214100), qui regroupent plusieurs phénotypes, dont le ZS, l'adrénoleucodystrophie néonatale (NALD), le syndrome de Heimler et la maladie de Refsum infantile (IRD). Ces pathologies sont aujourd'hui considérées comme les différentes

présentations d'un continuum clinique et biochimique, respectivement de la plus sévère (ZS) à la moins sévère (IRD). Les manifestations cliniques du ZS comprennent une hypotonie sévère, une épilepsie et des traits cranio-faciaux caractéristiques. Les patients atteints de ZS présentent aussi une dysfonction hépatique et des kystes rénaux. Ceux-ci meurent fréquemment au cours de leur première année de vie, sans évolution développementale.

Egalement classée dans les maladies de la biogenèse peroxysomale, la chondrodysplasie ponctuée rhizomélique de type 1 est due à la déficience en PEX7. Elle entraîne principalement un défaut d'importation de l'ADHAPS qui se traduit alors par un défaut de synthèse des plasmalogènes (Waterham and Ebberink 2012).

III. La β-oxydation peroxysomale

Les lipides métabolisés par le peroxysome nécessitent une activation avant de pouvoir être pris en charge (Guimaraes, Sa-Miranda et al. 2005). Cette activation nécessite une réaction de thioestérification au CoenzymeA (CoA) faisant intervenir une acyl-CoA synthétase. Les AGTLC seraient activés essentiellement par l'« acyl-CoA synthethase very long chain » 1 (ACSVL1 ou FATP2 ou SLC27A1) (Watkins and Ellis 2012). Les substrats de la β-oxydation sont alors importés au sein du peroxysome grâce aux transporteurs ATP-binding cassette (ABC) peroxysomaux. Trois transporteurs ABC, présentant des fonctions complémentaires, sont localisés à la membrane du peroxysome : les transporteurs ABCD1, ABCD2 et ABCD3.

Une fois importé au sein du peroxysome, le substrat peut être pris en charge et dégradé par les enzymes de la β-oxydation peroxysomale (Figure 4). Un cycle de β-oxydation peroxysomale se décompose en 4 étapes, une déshydrogénation, une hydratation, une seconde déshydrogénation et un clivage thiolytique, permettant le raccourcissement de la chaîne d'AG de 2 carbones et la libération d'un acétyl-CoA. Le nombre de cycles de β-oxydation pour chaque lipide dépend de la longueur de la chaîne carbonée et se poursuit généralement jusqu'à l'obtention d'un acyl-CoA à chaîne moyenne (entre 6 et 8 carbones). L'acétyl-CoA et les acyl-CoA à chaîne moyenne ainsi formés seraient ensuite complexés à la carnitine respectivement via la carnitine acétyltransférase (CRAT) ou la carnitine octanoyltransférase (CROT) puis transportés hors du peroxysome, vers le cytosol ou la mitochondrie. Les produits formés par la β-oxydation seraient aussi susceptibles de quitter le peroxysome sous forme libre après clivage des acyl-CoA en AG libres et coenzyme A par les acyl-CoA thioestérase 4 ou 8 (ACOT4 ou ACOT8) (Figure 4) (Hunt, Tillander et al. 2014).

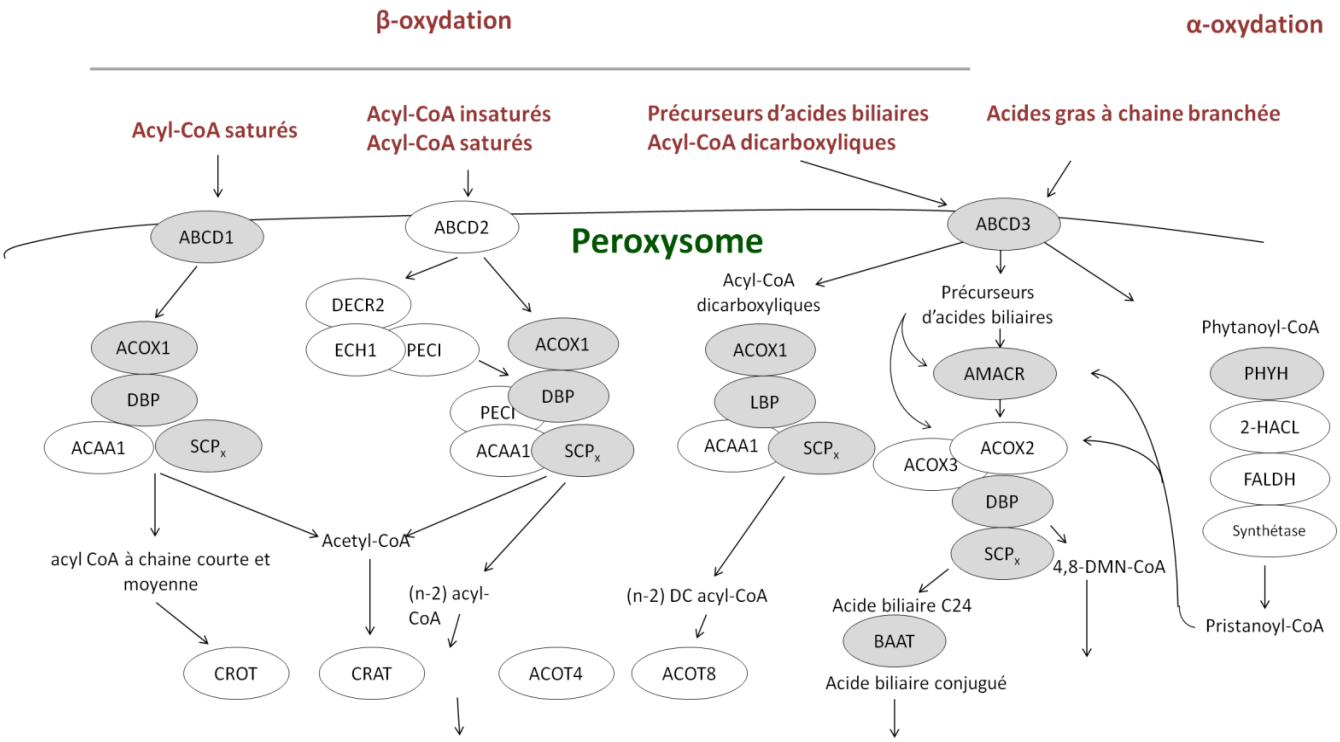


Figure 4 : La β-oxydation peroxysomale *(adapté d'après Berger, Dorninger et al. 2016).*

III.1. Enzymes de la β-oxydation peroxysomale

Il existe plusieurs enzymes susceptibles d'intervenir dans chacune des étapes de la β-oxydation peroxysomale chez l'Homme (Figure 4). La première déshydrogénation est réalisée par l'une des 3 acyl-CoA oxydase (ACOX). L'ACOX1 (ou palmitoyl-CoA oxydase) prend en charge les AG à chaîne droite tandis que l'ACOX2 (ou « branched-chain acyl-CoA oxidase ») et l'ACOX3 seraient toutes deux impliquées dans la dégradation des AG à chaîne branchée. Seule l'ACOX2 semble impliquée dans la dégradation des précurseurs d'acides biliaires (Ferdinandusse, Denis et al. 2018). Ces enzymes oxydent leur substrat par passage d'électrons au FAD et formation d'H_2O_2. L'ACOX1 et l'ACOX2 exerceraient leur activité à l'état de dimère et l'ACOX1, protéine de 75 kDa serait clivée sélectivement après son import dans le peroxysome en 2 sous-unités de 50 et 25 kDa (Kurochkin, Mizuno et al. 2007). Chez le nématode *C. elegans*, les spécificités de substrats des ACOX dépendraient de leur agencement structural, sous la forme d'homodimères ou d'hétérodimères (Zhang, Li et al. 2016). En parallèle, chez l'Homme, un épissage alternatif permet l'expression de 2 isoformes de l'ACOX1, ACOX1a et ACOX1b, qui présentent également des différences de spécificité

de substrats (Oaxaca-Castillo, Andreoletti et al. 2007). Enfin, une quatrième ACOX a été identifiée. Nommée ACOX-like (ACOXL ou ACOX4) et présentant une plus forte similarité de séquence avec l'ACOX3, sa fonction est inconnue et le gène est susceptible d'encoder une protéine tronquée chez l'Homme (Van Veldhoven 2010). Dans le cas des AG insaturés et à chaîne branchée, des enzymes auxiliaires interviennent préalablement pour permettre leur prise en charge. La réaction catalysée par la 2-méthylacyl-CoA racémase (AMACR) est notamment essentielle à la prise en charge par l'ACOX2 des AG à chaîne branchée et précurseurs d'acides biliaires.

La première étape de la β-oxydation est ensuite suivie d'une hydratation et d'une seconde déshydrogénation réalisées par les enzymes bifonctionnelles DBP (ou protéine multifonctionnelle 2, MFP2) et LBP (ou protéine multifonctionnelle 1, MFP1). Ces enzymes tirent leur nom de leur double activité : 2-énoyl-CoA hydratase et 3-hydroxyacyl-CoA déshydrogénase. Ces 2 enzymes possèdent une stéréo-sélectivité mais catalysent toutes deux ces réactions sur les AG à chaîne droite. La dernière étape de clivage thiolytique fait intervenir les enzymes 3-cétoacyl-CoA thiolase (thiolase peroxysomale ou ACAA1) ou SCPx (Chevillard, Clemencet et al. 2004). Cette dernière est transcrite à l'aide d'un promoteur indépendant du gène *SCP2* et est la seule à intervenir dans le clivage dégradant les AG à chaîne branchée et précurseurs d'acides biliaires.

Enfin, les enzymes de la β-oxydation peroxysomale sont susceptibles d'agir sous forme de complexe facilitant la dégradation sélective de leurs substrats (Van Veldhoven 2010).

III.2. La déficience en acyl-CoA oxydase I

Les incidences précises des déficiences en enzyme de la β-oxydation peroxysomale sont inconnues. Alors qu'environ 130 cas de déficience en DBP ont été diagnostiqués, seulement une trentaine de cas de déficience en ACOX1 ont été rapportés à travers le monde (Ferdinandusse, Denis et al. 2007, Van Veldhoven 2010). En 1988, Poll-The et ses collaborateurs décrivent les deux premiers cas de déficience en ACOX1 (OMIM # 264470) au sein d'une même fratrie née de parents consanguins. Le principal défaut biochimique associé est une accumulation d'AGTLC, alors que les niveaux en AG à chaîne branchée et en précurseurs d'acides biliaires restent inchangés. Le tableau clinique comporte une gamme étendue de symptômes comprenant une hypotonie néonatale, des crises d'épilepsie, un déficit neurosensoriel et un retard neuro-développemental (Poll-The, Roels et al. 1988). Chez les

patients, l'imagerie par résonance magnétique révèle des anomalies de la substance blanche et une atteinte démyélinisante progressive. L'âge moyen de survenu du décès est de 5 ans. Les manifestations cliniques ressemblant à celle de la NALD (maladie du spectre de Zellweger), le terme d'adrénoleucodystrophie pseudo-néonatale (P-NALD) a également été attribué à cette maladie.

La souris déficiente en ACOX1 présente une accumulation d'AGTLC plasmatique, un retard de croissance ainsi qu'une infertilité et développe à l'âge adulte une stéatose hépatique avec des anomalies de la prolifération peroxysomale (Fan, Pan et al. 1996). Ces souris présentent également plusieurs anomalies lipidiques dont une accumulation importante d'AGTLC polyinsaturés, résultant du défaut de β-oxydation peroxysomale et d'une activité accrue d'élongases (Infante, Tschanz et al. 2002).

III.3. Transporteurs du peroxysome

III.3.1. Généralités sur les transporteurs ABC

Les transporteurs ABC forment une large famille de transporteurs conservés au sein des procaryotes et eucaryotes. 48 transporteurs ont été identifiés chez l'Homme et classés, par homologie de séquence, en 7 sous-familles (de A à G). A l'exception des membres des sous-familles E et F, ces protéines sont des protéines membranaires permettant le plus souvent un transport actif de substrats de façon unidirectionnelle, grâce à l'hydrolyse de l'ATP. Chez les mammifères, ils jouent un rôle majeur dans l'efflux d'une grande variété de substrats, sont associés à de nombreuses fonctions physiologiques et ont été aussi largement étudiés en condition pathologique. Citons par exemple le transporteur ABCC7, dont des mutations sont à l'origine de la mucoviscidose ou bien les transporteurs ABCB1, ABCC1, ABCC2, ABCC3 et ABCG2 associés à des résistances tumorales multiples aux agents anticancéreux.

En 1993, Mosser *et al.* identifient par clonage positionnel chez plusieurs patients des délétions dans le gène codant pour la protéine ABCD1 (ou Adrenoleukodystrophy protein, ALDP) comme étant la cause de l'X-ALD (Mosser, Douar et al. 1993). Deux autres transporteurs, ABCD2 (ou ALD-Related Protein) (Lombard-Platet, Savary et al. 1996) et ABCD3 (PMP70) (Kamijo, Taketani et al. 1990) ont été identifiés. Ils présentent une localisation peroxysomale et une forte homologie avec le transporteur ABCD1 avec respectivement 63% et 36% d'identité de séquence chez l'Homme. Seuls 3 transporteurs ABC de la sous-famille D sont présents à la membrane des peroxysomes et assurent l'importation des différents AG au sein de la matrice peroxysomale préalablement à leur β-oxydation. Le

quatrième transporteur de la sous-famille D, ABCD4, initialement identifié comme transporteur peroxysomal est finalement localisé dans les lysosomes et le RE ; il semble impliqué dans le transport de la vitamine B12 (Kashiwayama, Seki et al. 2009, Coelho, Kim et al. 2012). Une attention particulière a été portée à la fonction et à la structure du transporteur ABCD1 en regard de son implication dans l'X-ALD, la plus fréquente des maladies peroxysomales. Aucun cas de déficience en ABCD2 n'a été rapporté jusqu'à présent. En ce qui concerne ABCD3, en 1992, deux cas de mutation dans le gène codant ABCD3 sont identifiés et alors associés à un défaut de la biogenèse peroxysomale et un ZS (Gartner, Moser et al. 1992) ; association qui se révèlera inexacte puisque ces mêmes patients présentaient aussi une mutation dans un gène *PEX*. En 2015, Ferdinandusse et ses collaborateurs rapportent un autre cas de déficience en ABCD3 chez une patiente présentant une hépato-splénomégalie associée à un déficit majeur de la voie de biosynthèse des acides biliaires (Ferdinandusse, Jimenez-Sanchez et al. 2015).

III.3.2. Structure et oligomérisation des transporteurs ABC peroxysomaux

L'unité fonctionnelle minimale d'un transporteur ABC comprend 2 domaines transmembranaires (TMD) et 2 domaines de fixation aux nucléotides (NBD). Chez les mammifères, les protéines ABC peuvent comporter 2 TMD et 2 NBD et ainsi former un transporteur entier, ou bien résulter de la dimérisation de deux hémi-transporteurs composés chacun d'un seul TMD et un seul NBD. Les 4 membres de la sous-famille D sont des hémi-transporteurs comportant chacun un TMD fusionné en C-terminal à un NBD. Le TMD de ces protéines est constitué de 6 hélices α transmembranaires potentiellement impliquées dans la reconnaissance des substrats et formant la structure nécessaire à son passage à travers la membrane. Le NBD, localisé du coté cytoplasmique de la membrane peroxysomale, comporte 2 motifs du nom de Walker A et Walker B ainsi qu'un troisième motif nommé Signature ABC, tous très conservés et impliqués dans la reconnaissance et l'hydrolyse de l'ATP (Smith, Karpowich et al. 2002). La fixation de l'ATP sur un NBD fait intervenir les motifs A et B de ce NBD en association avec le motif Signature ABC du second NBD. Bien que les modalités du cycle de transport de substrats soient encore largement discutées. Un modèle hypothétique postule que la fixation du substrat au niveau du TMD entraîne un changement de conformation favorisant la fixation de l'ATP. L'hydrolyse de l'ATP puis le relargage de l'ADP, au niveau d'un NBD permettrait la translocation du substrat tandis que l'hydrolyse et

le relargage de l'ADP sur l'autre NBD permettrait au transporteur de retrouver sa conformation d'origine avec notamment une forte affinité du TMD pour le substrat.

Les 3 transporteurs ABC peroxysomaux étant membranaires, ils possèdent en plus un signal d'adressage membranaire au peroxysome, le mPTS localisé en N-terminal du TMD, motif conservé reconnu par le récepteur PEX19 et permettant l'adressage au peroxysome grâce à l'interaction de PEX19 avec la protéine d'amarrage PEX3 (Fujiki, Matsuzono et al. 2006). Depuis la démonstration récente de la présence de ribosomes en association avec la membrane peroxysomale, on peut légitimement supposer que l'adressage et l'intégration dans la membrane peroxysomale sont intimement liés à la traduction de ces protéines membranaires et que la dimérisation de ces protéines, nécessaire à la constitution d'un transporteur fonctionnel, se fait dans un second temps. Ces transporteurs sont fonctionnels sous une forme prédominante d'homodimère (Guimaraes, Domingues et al. 2004) mais ces 3 protéines peuvent également interagir entre elles et plusieurs études ont mis en évidence l'existence d'hétérodimères fonctionnels (Hillebrand, Verrier et al. 2007, Genin, Geillon et al. 2011). Ainsi, des différences de spécificité de substrats ont pu être avancées pour chacun des homodimères et hétérodimères possibles (Geillon, Trompier et al. 2012). Mais il semblerait que les transporteurs ABCD1 et ABCD2 soient présents sous forme de complexes plus importants, essentiellement sous forme d'homotétramère et d'hétérotétramère, avec une prédominance de la première forme. La signification fonctionnelle de ces différents complexes nécessite d'être étudiée. Des travaux relatifs réalisés au laboratoire et auxquels j'ai participé (Geillon, Gondcaille et al. 2017) sont présentés en annexe.

Les études structure-fonction demeurent essentielles à la compréhension des mécanismes de transport et de sélectivité de substrat de ces transporteurs. Malgré l'obtention de structures tridimensionnelles résolues par cristallographie de plusieurs transporteurs ABC, il existe très peu d'informations en ce qui concerne la structure des transporteurs ABC peroxysomaux. Un modèle structural (Figure 5) pour le transporteur ABCD1 a été obtenu au laboratoire par modélisation moléculaire à partir de la structure cristallographique (à 2,85 angström) du transporteur mitochondrial ABCB10 (Andreoletti, Raas *et al.* 2017). La publication exposant ces travaux est présentée en annexe.

III.3.3. Fonction et expression des transporteurs ABC peroxysomaux

L'activation des substrats semble être un pré requis à la β-oxydation peroxysomale et les transporteurs ABC peroxysomaux transporteraient les AGTLC préalablement estérifiés au

CoA (van Roermund, Visser et al. 2008). En parallèle, l'hydrolyse du substrat activé semble se produire avant ou au cours du transport et cette activité intrinsèque a pu être mis en évidence pour l'orthologue végétal d'ABCD1 ainsi que par surexpression des transporteurs humain ABCD1-4 chez la levure (De Marcos Lousa, van Roermund et al. 2013, Okamoto, Kawaguchi *et al.* 2018). Le substrat serait alors réactivé au sein du peroxysome pour être pris en charge par les enzymes de la β-oxydation (Baker, Carrier et al. 2015). Les transporteurs ABC peroxysomaux formeraient donc des machineries plus complexes en étant couplés à des activités enzymatiques de synthèse et d'activation lipidique impliquant notamment les synthétases ACSVL1 et ACSVL5 (Hillebrand, Gersting et al. 2012).

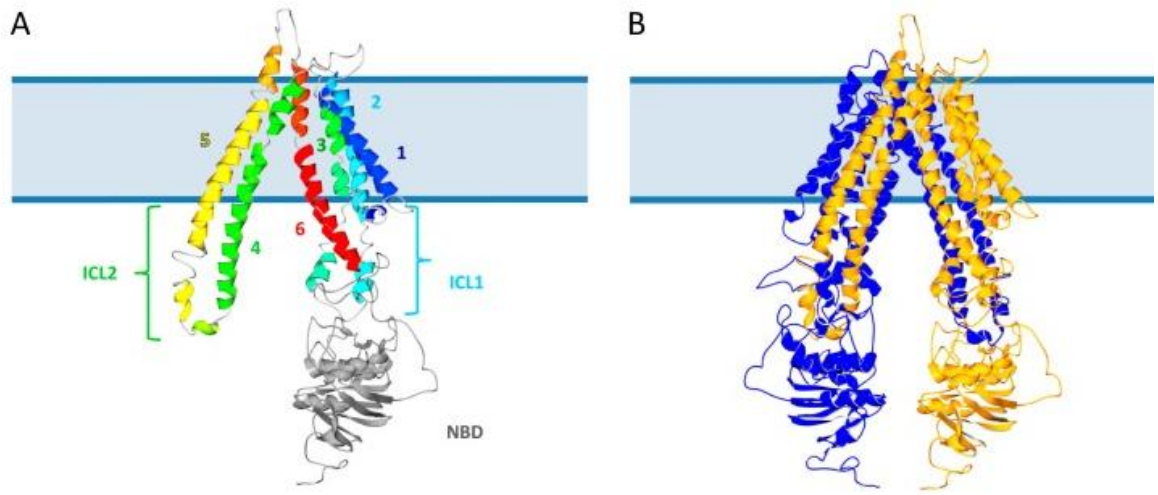


Figure 5 : Modèle structural du transporteur ABCD1 humain.
Représentation schématique tridimensionnelle (« Ribbon ») prédite pour l'hémi-transporteur ABCD1. A : Les hélices transmembranaires au sein de l'homodimère sont numérotées de 1 à 6 et colorées du bleu foncé au rouge. Le domaine de fixation aux nucléotidex (NBD) apparait en grisé. B : Représentation tridimensionnelle du transporteur ABCD1 à l'état d'homodimère, un hémi-transporteur étant représenté en bleu, l'autre en jaune.

Les transporteurs ABC peroxysomaux présentent des spécificités de substrats distinctes mais partiellement chevauchantes. Ainsi, l'activité compensatrice du transporteur ABCD2 (et ABCD3 dans une moindre mesure) a pu être mis en évidence dans des fibroblastes de patients X-ALD (Kemp, Wei et al. 1998).

Les AGTLC les plus hydrophobes, les acides lignocériques (C24:0) et cérotiques (C26:0), ainsi que les AGTLC monoinsaturés (C24:1 et C26:1) semblent être préférentiellement transportés par ABCD1 alors que les AG à chaîne longue saturés comme

l'acide docosanoïque (C22:0) ou monoinsaturés (C22:1) semblent être les substrats privilégiés d'ABCD2. Ce dernier, et contrairement à ABCD1, serait également impliqué dans le transport des AG polyinsaturés, notamment du DHA (C22:6 n-3) et de son précurseur (C24:6 n-3) (van Roermund, Visser *et al.* 2010, Genin, Geillon *et al.* 2011). Le transporteur ABCD3 serait quant à lui essentiellement impliqué dans l'import de substrats incluant les AG à chaîne branchée, les précurseurs d'acides biliaires et les acides dicarboxyliques (van Roermund, Ijlst *et al.* 2013, Ferdinandusse, Jimenez-Sanchez *et al.* 2015).

Les transporteurs ABC peroxysomaux présentent des profils d'expression spécifiques qui sont relativement comparables entre l'Homme et la souris (Tableau 3) (Berger, Albet *et al.* 1999, Langmann, Mauerer *et al.* 2003)

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

Tableau 3 : Comparaison des profils d'expression en ARNm, des gènes codant les trois transporteurs ABCD peroxysomaux, chez la souris et l'Homme.
Les niveaux d'expression relatifs des gènes murins (Berger et al. 1999) ne peuvent être comparés que verticalement (entre tissus) : +/- (détectable uniquement par RT-PCR) ; + (expression faible) ; ++ (bonne expression) ; +++ (expression élevée) ; Ø (pas de donnée). Une comparaison des niveaux d'expression relatifs des gènes humains (Langmann et al. 2003) peut être faite verticalement (entre tissus) (•<••<•••<••••<•••••) ou horizontalement (entre gènes) à l'aide du code couleur : niveau d'expression élevé (rouge), moyen (vert), faible (bleu) et très faible (gris) ; (adapté de Flore Geillon d'après les données de Berger et al. 1999 et Langmann et al. 2003).

De façon remarquable, *ABCD1* et *ABCD2* présentent une expression en miroir dans plusieurs tissus chez l'Homme (Troffer-Charlier, Doerflinger et al. 1998, Weber, Wiesinger et al. 2014). Selon les conditions environnementales, certains tissus présentent à l'inverse une forte expression des transporteurs ABCD1 et ABCD2. Au sein du SNC, *ABCD1* se trouve être exprimé uniquement par les oligodendrocytes, les astrocytes et la microglie alors qu'*ABCD2* serait davantage exprimé au sein des oligodendrocytes et neurones (Troffer-Charlier, Doerflinger et al. 1998).

En parallèle, il a pu être montré que plusieurs ligands de PPARα étaient responsables d'une augmentation d'expression *d'ABCD2* et *d'ABCD3*. A l'inverse, aucune expression induite *d'ABCD1* n'a pu être mise en évidence (Albet, Causeret et al. 1997). Du fait de la redondance fonctionnelle partielle entre les transporteurs ABC peroxysomaux, ces mécanismes de régulation transcriptionnelle ouvrent de nombreuses pistes thérapeutiques pour l'X-ALD qui sont discutés, avec la physiopathologie de l'X-ALD, dans le chapitre suivant.

CHAPITRE 3 : L'ADRENOLEUCODYSTROPHIE LIEE A L'X (X-ALD)

I. Introduction

L'adrénoleucodystrophie liée à l'X (X-ALD) (OMIM #300100) est la maladie peroxysomale et la leucodystrophie la plus fréquente. Il s'agit d'une maladie métabolique monogénique résultant de l'inactivation du gène *ABCD1* positionné en Xq28 (Mosser, Douar et al. 1993). Son incidence combinée chez les hémizygotes (hommes) et hétérozygotes (femmes) est estimée à 1/16 800 (Bezman and Moser 1998). Sa pénétrance est complète chez les hommes et estimée à 65% chez les femmes vers l'âge de 60 ans (Engelen, Kemp et al. 2012). Les mutations à l'origine d'une protéine ABCD1 absente ou non-fonctionnelle entraînent un défaut de transport peroxysomal des AGTLC et une activité de β-oxydation peroxysomale diminuée d'environ 60 à 80% (Singh, Moser et al. 1984). Une accumulation d'AGTLC est alors mesurable dans le plasma et les tissus des patients, de manière notable dans la substance blanche cérébrale, la moelle épinière et le cortex surrénalien.

La variabilité phénotypique particulière de la maladie est essentiellement caractérisée par 2 phénotypes, une axonopathie appelée adrénomyéloneuropathie (AMN) survenant chez l'adulte et une forme cérébrale démyélinisante et inflammatoire survenant principalement chez l'enfant (CALD). Une atteinte corticosurrénalienne, traduite par une maladie d'Addison, est fréquente et a conduit à donner le terme d'adrénoleukodystrophie.

Initialement décrite au début du 20ème siècle par Shilder puis Siemerling et Creutzfeldt, il faut attendre les années 80 pour qu'apparaissent les premiers essais thérapeutiques par greffe de cellules souches hématopoïétiques et l'identification de son origine peroxysomale (Moser, Tutschka et al. 1984, Singh, Moser et al. 1984). L'identification du gène *ABCD1* en 1993 aboutira au succès retentissant d'une stratégie de thérapie génique en 2009 puis d'un second essai clinique en 2017 (Cartier, Hacein-Bey-Abina et al. 2009, Eichler, Duncan et al. 2017). Néanmoins, la difficulté de compréhension des mécanismes mis en jeu dans cette stratégie thérapeutique de même que l'absence de corrélation entre génotype et phénotype contribuent à faire de cette maladie un véritable challenge tant dans la compréhension de sa physiopathogenèse que dans le développement thérapeutique (Berger, Forss-Petter et al. 2014).

II. Phénotypes

L'importante variabilité phénotypique de la maladie et l'absence d'un réel continuum ont amené à distinguer au moins trois phénotypes. La répartition des différentes formes cliniques de l'X-ALD est indiquée dans le Tableau 4. Aucune étude rétrospective ne permet de dire si un porteur hémizygote peut rester asymptomatique mais il semble probable que la pénétrance de l'AMN soit quasi complète. Il n'existe aucun marqueur pronostic permettant de prédire si un patient va être affecté, et si oui, à quel âge et avec quel degré de sévérité (Engelen, Kemp et al. 2012).

Phénotype	CALD infantile	CALD adolescente	CALD adulte	AMN		Maladie d'Addison uniquement	Hétérozygotie
				Forme non cérébrale	Forme cérébrale		
Fréquence (%)	31 - 35	4 - 7	2 - 5	40 - 46	20% des patients AMN après 10 ans	Diminue avec l'âge	Nombre de cas symptomatique inconnu
Age à l'apparition de la maladie	2,5 - 10	10 - 21	> 21	> 18	> 18	> 2	Forte variation, majoritairement > 40
Myélopathie	Absente	Possible à un stade préclinique	Présente ou absente	Présente	Présente	Absente	Présente
Lésions de la substance blanche par IRM cérébrale	Importantes	Importantes	Importantes	Dégénérescence wallérienne des tractus corticospinaux au niveau du tronc cérébral, du pons et des capsules internes	Pariéto-occipitales, frontales, ou impliquant le centrum semiovale	Absentes	Très rares Mêmes atteintes que dans l'AMN non cérébrale mais moins fréquentes
Troubles cognitifs et comportementaux	Présents	Présents	Présents	Absents	Présents	Absents	Très rares
Neuropathie périphérique	Absente	Rare	Possible	Sensorimotrice, principalement axonale, rarement démyélinisante	Sensorimotrice, principalement axonale	Absente	Présente ou absente
Troubles endocriniens	Maladie d'Addison fréquente	Maladie d'Addison fréquente	Maladie d'Addison fréquente	Maladie d'Addison fréquente et insuffisance testiculaire	Maladie d'Addison fréquente et insuffisance testiculaire	Maladie d'Addison	Maladie d'Addison rare
Progression	Rapide	Rapide	Rapide	Lente	Rapide	Absent	Lente

Tableau 4 : Phénotypes de l'X-ALD *(adapté d'après Engelen, Kemp et al. 2012)*

II.1 L'adrénoleucodystrophie cérébrale (CALD)

La CALD est la forme la plus rapidement progressive et dévastatrice de l'X-ALD. Elle apparaît dans près de 35% des cas d'X-ALD, durant l'enfance (CALD infantile), avant 10 ans mais jamais avant 2 ans et demi. La CALD concerne au total près de 60% des hommes

atteints d'X-ALD (Berger, Forss-Petter et al. 2014). Sa survenue est insidieuse et elle est souvent marquée par un déficit cognitif. Le déclin neurologique progressif et rapide est souvent associé à une hémiplégie ou une tétraplégie, une ataxie cérébelleuse, des déficits auditifs et visuels ou une épilepsie. Ce déclin mène alors à un état végétatif ou à la mort dans les 2 à 4 ans après les premiers signes cliniques. Dans certains cas, la phase progressive neuro-inflammatoire est arrêtée et stabilisée pendant plusieurs années. La progression et la sévérité de la pathologie sont généralement corrélées à l'âge de survenue : plus la maladie apparaît tôt, plus elle progresse rapidement.

L'imagerie par résonnance magnétique (IRM) caractéristique de la CALD met en évidence un hypersignal en séquence T2 ou FLAIR au niveau de la substance blanche parieto-occipitale ou frontale, du corps calleux ou des faisceaux pyramidaux du tronc cérébral, du pons ou des capsules internes (Figure 6).

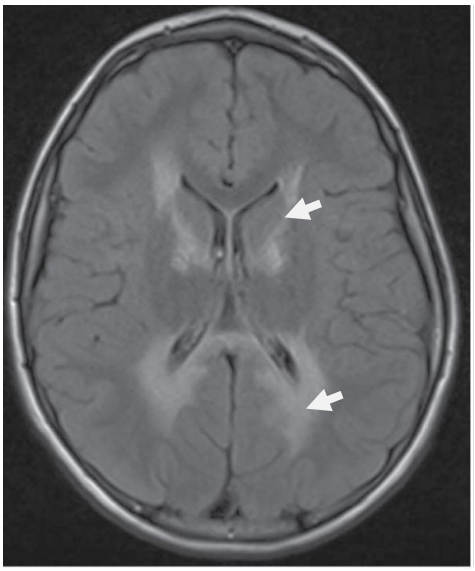


Figure 6 : Anomalies de la substance blanche des régions pariéto-occipitales et des capsules internes par IRM en plan axial en séquence FLAIR *(d'après Engelen, Kemp et al. 2012).*

II.2 L'adrénomyeloneuropathie (AMN)

L'AMN concerne quasiment tous les patients X-ALD à l'âge adulte et se manifeste souvent entre 30 et 50 ans. Elle est caractérisée par une paraparésie spastique progressive et les symptômes initiaux comprennent souvent des pertes de sensibilité et des douleurs dans les membres inférieurs, des troubles sphinctériens ou une impuissance. L'évolution est généralement progressive, parfois plus marquée au cours des 3 premières années. Une dizaine d'années après les premiers symptômes, les troubles neurologiques deviennent souvent plus sévères et le recours à un fauteuil roulant peut s'avérer nécessaire.

Elle correspond sur le plan pathologique à une axonopathie distale non-inflammatoire impliquant les faisceaux de la moelle épinière et dans une moindre mesure les nerfs périphériques. L'IRM cérébrale de patients AMN est généralement normal ou met en évidence des anomalies légères à hauteur des faisceaux pyramidaux du tronc cérébral, du pons ou des capsules internes (augmentation modérée du signal en séquence FLAIR ou T2), qui correspondent probablement à des dégénérescences axonales appelées dégénérescences Wallériennes. En présence d'un produit de contraste (gadolinium), la BHE apparaît intacte et aucune réaction inflammatoire n'est mesurable. Une atteinte de la moelle épinière est parfois détectable par IRM mais les atteintes observables ne sont pas celles d'une maladie démyélinisante (Engelen, Kemp et al. 2012).

Les troubles neurologiques sont fréquemment accompagnés de troubles endocriniens ; 66% des hommes atteints d'AMN sont atteints d'insuffisance surrénale (maladie d'Addison) (Powers, DeCiero et al. 2000).

Les phénotypes de l'X-ALD ne sont pas statiques et tous les porteurs hémizygotes de la mutation d'*ABCD1* sont à risques de présenter des symptômes neurologiques ou des troubles endocriniens. Sur une période de 10 ans, environ 20% des patients atteints d'AMN vont également développer la forme cérébrale de la maladie (van Geel, Bezman et al. 2001).

II.3 La maladie d'Addison et les troubles endocriniens

L'X-ALD est une des causes principales d'insuffisance surrénale également connue sous le nom de maladie d'Addison. L'insuffisance surrénale primaire dans l'X-ALD est caractérisée par un faible taux de cortisol et un taux élevé de l'hormone adrénocorticotrope (ACTH). L'accumulation d'ACTH est fréquemment à l'origine d'une hyperpigmentation chez ces patients. L'hypocortisolisme et l'hypoaldosteronisme se manifestent par plusieurs signes cliniques dont une fatigue ou une hypotension artérielle, et nécessitent une prise en charge thérapeutique. La maladie d'Addison permet parfois le diagnostic de l'X-ALD, en se manifestant souvent plusieurs années avant les premiers symptômes neurologiques. La pénétrance de la maladie d'Addison dans l'X-ALD est inconnue. Bien qu'elle se manifeste dans près de deux tiers des cas hémizygotes, elle serait en fait détectable biochimiquement dès l'âge de 5 mois et dans près de 80% des cas avant l'âge de 13 ans et serait donc le phénotype le plus commun de l'X-ALD (Dubey, Raymond et al. 2005).

L'accumulation d'AGTLC et de cholestérol estérifié est visible sous forme d'inclusions lipidiques dans les zones réticulées et fasciculées du cortex surrénal. Ces

accumulations sont suspectées d'entraîner une apoptose et l'atrophie de ce tissu (Kemp, Huffnagel et al. 2016). La stéroïdogenèse semble être impactée dans l'X-ALD et la fonction reproductrice est parfois également affectée. Un hypogonadisme peut être observé et impliquerait une toxicité des AGTLC dans les cellules de Sertoli et les cellules de Leydig, ainsi qu'un hypoandrogénisme ou une résistance des récepteurs aux androgènes (Brennemann, Kohler et al. 1997, Burtman and Regelmann 2016, Kemp, Huffnagel et al. 2016). Enfin, une alopécie est fréquemment présente chez les patients atteints d'AMN (Engelen, Kemp et al. 2012).

II.4 Hétérozygotie

Dans la plupart des cas d'X-ALD, les porteurs hétérozygotes ont longtemps été présumés comme asymptomatiques. Cependant de nombreux cas de femmes porteuses de mutations du gène *ABCD1* ont développé des symptômes ressemblant à ceux de l'AMN. Les symptômes de l'AMN se manifesteraient majoritairement après 40 ans et des troubles neurologiques seraient présents chez près de 65% des porteurs hétérozygotes après 60 ans (Engelen, Kemp et al. 2012). La pénétrance de l'X-ALD chez les femmes semble dépendre fortement de l'âge (Horn, Retterstol et al. 2015). Une implication cérébrale et l'insuffisance surrénale seraient beaucoup plus rares, dans 2% et 1% des cas respectivement. Une accumulation d'AGTLC ou un défaut de β-oxydation peroxysomale semble observable chez quasiment toutes les patientes (Engelen, Barbier et al. 2014).

L'inactivation de l'X inégale ou préférentielle serait potentiellement impliquée dans le développement de la pathologie chez les porteurs hétérozygotes. Les cellules exprimant préférentiellement un allèle mutant d'*ABCD1* sembleraient présenter des avantages de croissance mais aucune corrélation entre le développement des symptômes et le motif d'inactivation n'a pu être démontrée (Salsano, Tabano et al. 2012).

III. Génétique et diagnostic

Le diagnostic de l'X-ALD repose de façon essentielle sur le dosage des AGTLC plasmatiques via les mesures du taux de C26:0 et des ratio C24:0/C22:0 et C26:0/C22:0. Cette analyse permet généralement de détecter les cas d'X-ALD chez les patients présentant les signes d'une AMN ou d'une maladie d'Addison mais il existe une importante variabilité phénotypique. Par ailleurs, chez les porteurs hétérozygotes, un nombre significatif de faux-négatifs peut être observé.

Depuis l'identification du gène mis en cause, le diagnostic biochimique est accompagné par un diagnostic moléculaire permettant d'identifier la mutation dans le gène *ABCD1* localisé en Xq28. Le gène *ABCD1* s'étend sur environ 19,9 kb comporte 10 exons et code pour une protéine de 745 acide-aminés.

Plus de 1100 mutations différentes (mutants pathogéniques et variants génétiques) réparties sur les 10 exons du gène *ABCD1* sont répertoriées dans la base de données « ALD Mutation Database » (https://adrenoleukodystrophy.info/mutations-and-variants-in-abcd1, le 24/08/2018) (Kemp, Pujol et al. 2001). L'incidence de l'X-ALD ne semble pas dépendre du contexte géographique ou ethnique. La fréquence des mutations *de novo* chez les patients X-ALD serait d'environ 5% et un mosaïcisme gonadique serait associé dans moins de 1% des cas (Wang, Busin et al. 2011).

Depuis 2014, un dépistage néonatal a été mis en place dans l'état de New-York aux Etats-Unis et a permis l'identification de 45 nouveaux cas sur 700 000 nouveau-nés au cours des 3 premières années (prédisant une incidence proche de 1/15 000 naissances dans cet état). Ce dernier repose sur la détection d'un niveau élevé de C26-lysophosphatidylcholine (marqueur d'AGTLC), à partir de tache de sang séché sur papier buvard par spectrométrie de masse (MS) en tandem. Le diagnostic peut alors être confirmé par l'analyse génétique. Il permet alors de réaliser une surveillance en IRM cérébrale ainsi qu'une surveillance de la fonction surrénale des patients dépistés et permet une prise en charge thérapeutique précoce lorsqu'elle est possible. Un dépistage familial peut alors également être proposé (Kemper, Brosco et al. 2017). Ces procédures de dépistage néonatal ont depuis été étendues à une dizaine d'autres états américains et devraient également être mises en place prochainement dans tous les Etats-Unis ainsi qu'aux Pays-Bas.

IV. Les facteurs environnementaux et gènes modificateurs

Il n'existe aucun lien entre les mutations observées sur le gène *ABCD1* et le phénotype déclaré chez les patients. Des patients présentant la même mutation, à l'origine d'une protéine tronquée ou non-fonctionnelle, peuvent présenter des phénotypes différents (Berger, Molzer et al. 1994). Ces arguments sont donc largement en faveur du rôle majeur des facteurs environnementaux et/ou génétiques dans cette variabilité phénotypique.

Plusieurs gènes modificateurs potentiels ont pu être la cible d'analyse de ségrégation parmi lesquels les gènes *ABCD2*, *ABCD3*, *ABCD4, ACSBG1*, *SOD2*, *TNFα* ou *CD1* mais aucune corrélation n'a pu être établie entre un phénotype de l'X-ALD et l'un de ses variants (McGuinness, Griffin et al. 1995, Maier, Mayerhofer et al. 2008, Matsukawa, Asheuer et al. 2011, Brose, Avramopoulos et al. 2012). Seul le polymorphisme du gène *CYP4F2* est associé à un risque accru de développer la CALD. Ce polymorphisme, en diminuant le taux de la protéine CYP4F2, entraînerait une baisse de conversion des AGTLC en acides dicarboxyliques réduisant alors leur dégradation par ω-oxydation (van Engen, Ofman et al. 2016).

L'existence de plusieurs cas de jumeaux monozygotes présentant des phénotypes différents serait un argument important en faveur d'un facteur environnemental (Di Rocco, Doria-Lamba et al. 2001). Deux jumeaux monozygotes de 10 ans, l'un atteint par la forme cérébrale et l'autre asymptomatique, présentaient des génotypes identiques (Korenke, Fuchs et al. 1996). Des cas similaires chez l'adulte ont pu être décrits (Sobue, Ueno-Natsukari et al. 1994). Ces jumeaux présenteraient par ailleurs des ADN mitochondriaux identiques (Wilichowski, Ohlenbusch et al. 1998).

Plusieurs facteurs environnementaux semblent à même de déclencher le phénotype cérébral inflammatoire de la maladie. Certains cas cliniques ont pu se voir diagnostiquer une CALD après un traumatisme crânien (Raymond, Seidman et al. 2010, Bouquet, Dehais et al. 2015). Un accident vasculaire cérébral ou même une consommation de psychotropes, via un phénomène de décompensation métabolique, sont également susceptibles de déclencher une réponse inflammatoire à l'origine du phénotype cérébral (Fellner, Benninger et al. 2016).

V. La physiopathologie de l' X-ALD

V.1. L'accumulation d'AGTLC et les conséquences métaboliques de l'X-ALD

Au sein des lésions de la substance blanche et de la corticosurrénale, les premières analyses ultra-structurales par microscopie électronique ont pu mettre en évidence des inclusions cytoplasmiques de structure lamellaire et de nature lipidique. Ces résultats ainsi que la présence de macrophages chargés en lipides ont permis de conclure qu'un défaut métabolique était à l'origine de l'X-ALD (Powers and Schaumburg 1974, Schaumburg, Powers et al. 1974). L'accumulation d'AGTLC apparaît aujourd'hui comme la conséquence directe principale de l'absence de protéine ABCD1 fonctionnelle. Les AGTLC accumulés sont essentiellement retrouvés sous forme estérifiée et dans différents lipides complexes, principalement des gangliosides, phosphatidylcholines et esters de cholestérol, des composants essentiels des membranes biologiques (Igarashi, Schaumburg et al. 1976). Dans le cerveau des souris déficientes en ABCD1, les AGTLC saturés et monoinsaturés sont incorporés, essentiellement en position sn-1, dans de nombreuses classes de phospholipides (75 espèces de phosphatidylcholine, 15 de phosphatidyléthanolamine, 5 de sphingomyéline, 4 de lysophosphatidylcholine, et 1 de lysophosphatidyléthanolamine) (Hama, Fujiwara et al. 2018). L'accumulation d'AGTLC dans les fractions riches en phosphatidylcholine de la myéline est fortement susceptible de jouer un rôle dans l'initiation des processus de démyélinisation et la réponse neuro-inflammatoire de la CALD (Kemp and Wanders 2010). L'accumulation de cholestérol estérifié et d'AGTLC a pu être corrélée spatialement avec la présence d'un infiltrat inflammatoire, l'expression de cytokines pro-inflammatoires et la démyélinisation (Paintlia, Gilg et al. 2003).

Plusieurs expériences ont permis de mettre en évidence la toxicité des AGTLC *in vitro* (Hein, Schonfeld et al. 2008, Zarrouk, Vejux et al. 2012). Ces molécules particulièrement hydrophobes présentent une très forte affinité pour les membranes biologiques et un niveau de désorption de ces membranes 10 000 fois plus faible que celui des AG à chaîne longue (Ho, Moser et al. 1995). Ils affecteraient ainsi la structure, la stabilité et la fonction de ces membranes, avec des répercussions multiples dans différents compartiments cellulaires. L'accumulation d'AGTLC au sein de la membrane mitochondriale présuppose des conséquences sur sa fonction, sa respiration et sa biogenèse et donc des conséquences métaboliques importantes. L'atteinte mitochondriale dans l'X-ALD semble fortement reliée à des anomalies de stress oxydatif et est revue plus en détail ci-dessous. Par ailleurs, un stress

du RE a pu être mis en évidence dans des fibroblastes de patients exposés au C26:0 (van de Beek, Ofman et al. 2017).

Le défaut de β-oxydation peroxysomale ne serait pas la seule cause de cette accumulation. Les 7 élongases localisées au niveau du RE contribueraient ainsi largement à l'augmentation du taux d'AGTLC, jusqu'à 32 atomes de carbone, dans certains tissus (Kemp, Valianpour et al. 2005). ELOVL1 est la principale enzyme catalysant la synthèse d'AGTLC saturés et monoinsaturés à 26 atomes de carbone. Son activité est essentiellement augmentée du fait de la plus grande disponibilité de substrat et elle contribuerait ainsi à la physiopathologie de l'X-ALD en augmentant les niveaux intracellulaires de C26 (Ofman, Dijkstra et al. 2010). Une augmentation de l'activité des élongases microsomales a pu être observée dans le cerveau de souris déficiente en ABCD1 au cours du développement et de la phase de myélinisation. Ces activités sont fortement susceptibles de perturber la composition de la myéline et de jouer un rôle dans le déclenchement de la pathologie (Morita, Kawamichi et al. 2015).

L'accumulation d'AGTLC est également accompagnée d'une diminution du taux de plasmenyl-éthanolamine dans la substance blanche des patients atteints de CALD. Ces modifications semblent être observées principalement dans les zones de plaque inflammatoire et semblent corrélées à la production d'ERO et à la présence d'une oxydation protéique sous la forme de protéines carbonylées (Khan, Singh et al. 2008). De façon similaire, dans le tissu nerveux des souris déficientes en ABCD1, les plasmalogènes semblent protéger des effets néfastes des AGTLC (Brites, Mooyer et al. 2009).

Bien que les AGTLC accumulés dans certaines classes de lipides semblent jouer un rôle central dans la pathologie, aucune corrélation entre le taux plasmatique d'AGTLC et le phénotype ou la sévérité de la pathologie n'a pu être mise en évidence (Moser, Kreiter et al. 1999). Il est ainsi probable que le niveau d'AGTLC plasmatique ne reflète pas les niveaux tissulaires d'AGTLC libres ou estérifiés. Cependant, d'autres acteurs que les AGTLC sont aussi vraisemblablement impliqués dans la pathologie.

Un lien entre l'accumulation d'AGTLC et les anomalies du métabolisme du cholestérol a pu être observé chez des souris déficientes en ABCD1. Alors qu'un régime riche en cholestérol entraîne normalement une baisse du taux cérébral d'AGTLC chez la souris sauvage, ce même régime provoque une augmentation du taux cérébral d'AGTLC chez les souris déficientes, notamment via une baisse d'expression d'ABCD2. A l'inverse, une diminution de l'apport en cholestérol permet de réduire l'accumulation d'AGTLC dans les fibroblastes déficients, humains et murins (Weinhofer, Forss-Petter et al. 2005). La BHE est

grandement susceptible de contribuer aux spécificités métaboliques tissulaires mises en évidence dans cette étude. Il semblerait que la baisse du niveau de C26:0 observée dans les fibroblastes X-ALD appauvris en cholestérol soit en fait accompagnée d'une plus forte expression de la stéaroyl-CoA-désaturase et d'une élévation du niveau de C26:1 et d'autres AG monoinsaturés, sans que la β-oxydation soit affectée (Engelen, Ofman et al. 2008). Le métabolisme des phosphatidylcholines, altéré dans l'X-ALD, semble aussi fortement impacter l'homéostasie du cholestérol dans les macrophages (Lagace 2015). D'autre part, le trafic intracellulaire du cholestérol est susceptible de faire intervenir des interactions lysosomes-peroxysomes. Ce trafic serait perturbé dans les cellules déficientes en ABCD1 et aboutirait à une accumulation de cholestérol dans les lysosomes (Chu, Liao et al. 2015). Ces anomalies du métabolisme du cholestérol semblent également engendrer son accumulation sous forme estérifié et la formation d'inclusions lipidiques observables par microscopie (Tangirala, Jerome et al. 1994).

La déficience en ABCD1 induirait l'accumulation de ligands de plusieurs récepteurs nucléaires et serait donc également responsable de réponses transcriptionnelles spécifiques. Certaines de ces réponses transcriptionnelles sont susceptibles de contribuer à la pathologie et à la réponse neuro-inflammatoire, notamment en promouvant l'expression de la 25-hydroxylase et l'accumulation de 25-hydroxycholestérol (25HC), responsable alors d'une activation de l'inflammasome NLRP3 et de la sécrétion d'IL-1β par les cellules microgliales (Jang, Park et al. 2016).

V.2. Le stress oxydant dans l'X-ALD

La déficience en ABCD1 et l'excès d'AGTLC conduisent à une dérégulation de l'homéostasie redox. Le stress oxydant apparaît comme un événement précoce dans la physiopathologie et engendre des dommages protéiques mesurables par des marqueurs de lipoxydation et glycoxydation (Fourcade, Lopez-Erauskin et al. 2008). Dans le parenchyme cérébral humain affecté, ce stress oxydant est mis en évidence par une surexpression de SOD2 (MnSOD) et d'iNOS associée à la présence de peroxynitrite, de malondialdéhyde et de 4-hydroxynonenal (Powers, Pei et al. 2005). Une augmentation de la chimioluminescence plasmatique reflétant l'auto-oxydation et la peroxydation lipidique a également pu être observée ainsi qu'une augmentation des activités SOD et catalase dans les fibroblastes de patients X-ALD (Vargas, Wajner et al. 2004). En parallèle, une diminution du glutathion sous forme réduite et oxydée a été mesurée dans les lymphocytes, confirmant le déséquilibre redox

dans l'X-ALD (Petrillo, Piemonte et al. 2013). Enfin, l'activité SOD plasmatique chez les patients CALD se trouve diminuée par comparaison aux patients AMN. Cette activité SOD semble être inversement corrélée à la sévérité de la pathologie et présuppose donc un rôle important du stress oxydant dans l'initiation de la réponse neuro-inflammatoire (Turk, Theisen et al. 2017).

Le lien entre l'accumulation d'AGTLC, le stress oxydant et l'inflammation, les trois acteurs centraux présumés de l'X-ALD, n'est encore pas clair aujourd'hui. La fonction mitochondriale semble toutefois être l'une des principales victimes de l'accumulation d'AGTLC et son dysfonctionnement pourrait être à l'origine du déséquilibre redox et de la réponse inflammatoire. Le dysfonctionnement mitochondrial et des anomalies de phosphorylation oxydative semblent fortement susceptibles de contribuer à la dégénérescence axonale. Ces anomalies de phosphorylation oxydative semblent communes à l'AMN et à la CALD et seraient impliquées dans l'induction de la réponse transcriptionnelle pro-inflammatoire (Schluter, Espinosa et al. 2012, Fourcade, Lopez-Erauskin et al. 2014). *In vitro*, dans les cellules astrocytaires et oligodendrocytaires, les AGTLC affecteraient la membrane interne mitochondriale et ainsi la perméabilité membranaire de cet organite, induisant alors la mort cellulaire (Hein, Schonfeld et al. 2008). L'analyse de la structure et de la composition en AGTLC des mitochondries chez la souris déficiente en ABCD1 n'a cependant pas révélé d'anomalies, remettant en cause une implication directe des AGTLC (Oezen, Rossmanith et al. 2005).

Le stress oxydant et le dysfonctionnement mitochondrial dans l'X-ALD ont pu être associés à de nombreuses anomalies telles qu'une perturbation de l'autophagie et de son inhibiteur, cible de la rapamycine chez les mammifères (mTOR), ainsi qu'une perturbation des voies de signalisation dépendantes de PPARγ et « PPARγ coactivator 1-α » (PGC1α) (Launay, Ruiz et al. 2013, Fourcade, Ferrer et al. 2015, Launay, Aguado et al. 2015). L'altération du contexte métabolique cellulaire associée à l'atteinte mitochondriale est également susceptible de modifier la réponse inflammatoire. Une baisse de l'activation de la voie dépendante de l'« AMP-activated protein kinase » (AMPK) a pu être remarquée dans les fibroblastes et lymphocytes de patients CALD mais pas chez les patients AMN (Singh and Giri 2014). Même s'il est absent chez la souris déficiente en ABCD1, ce défaut d'AMPK serait alors en cause dans le dysfonctionnement mitochondrial et l'induction de la réponse pro-inflammatoire dans la CALD (Singh, Suhail et al. 2015).

V.3. La réponse inflammatoire dans l'X-ALD

La forte susceptibilité des oligodendrocytes aux AGTLC est une des hypothèses à même d'expliquer l'atteinte démyélinisante observée dans la CALD. Chez la souris, une fonction peroxysomale déficiente dans les oligodendrocytes est suffisante pour entraîner une lésion démyélinisante (Kassmann, Lappe-Siefke et al. 2007). L'apoptose des oligodendrocytes a pu être observée dans les lésions de la substance blanche de la CALD et semble bien être corrélée à la démyélinisation (Feigenbaum, Gelot et al. 2000). Bien qu'une accumulation d'AGTLC plus importante ait pu être observée au sein des zones démyélinisées, celle-ci est également accompagnée par une importante activation astrocytaire et microgliale (Paintlia, Gilg et al. 2003). La mort des oligodendrocytes pourrait apparaître comme une conséquence directe de l'accumulation d'AGTLC ou indirecte par l'intermédiaire de médiateurs de l'inflammation. L'astrocytose et la microgliose réactive dans la CALD semblent être associées à une sécrétion de TNFα, alors susceptible d'altérer la viabilité des oligodendrocytes (Powers, Liu et al. 1992). *In vitro*, une baisse d'expression d'*ABCD1* et *ABCD2* par interférence ARN dans les cellules astrocytaires entraîne une réponse inflammatoire par le biais du facteur nucléaire NF-KB (Singh, Khan et al. 2009). En association avec les anomalies observées par IRM, une sécrétion accrue de cytokines pro-inflammatoires incluant l'IL-1β, l'IL-2, l'IL-8 et le TNFα a pu être mesurée dans le plasma de patients atteints de CALD. Cette réponse inflammatoire semble précoce car elle est également observée chez les patients X-ALD encore asymptomatiques ou atteints d'AMN et semble corrélée à l'augmentation du taux plasmatique d'AGTLC (Marchetti, Donida et al. 2018). Bien que l'AMN soit considérée comme non-inflammatoire, une altération du métabolisme des glycolipides et des glycérophospholipides et un profil inflammatoire atypique ont pu être mis en évidence par une étude du métabolome de cellules sanguines mononuclées de patients AMN (Ruiz, Jove et al. 2015).

Plusieurs éléments suggèrent l'implication d'une réponse immunitaire cellulaire cytotoxique dans l'atteinte démyélinisante de la CALD. L'hypothèse d'une présentation antigénique anormale de phosphatidylcholines résultant de l'accumulation d'AGTLC a ainsi été proposée (Theda, Moser et al. 1992). La présence d'un infiltrat inflammatoire composé de lymphocytes T cytotoxiques (CD8 positifs) suggère l'implication d'une présentation d'antigène lipidique par l'intermédiaire de molécule comme le CD1d et potentiellement responsable d'une cytolyse des oligodendrocytes. Le CD1d est exprimé par les cellules microgliales dans la CALD et permet la présentation d'antigènes de nature lipidique aux

lymphocytes T « natural killer » (NKT) (Ito, Blumberg et al. 2001). Toutefois, une implication de tels acteurs dans la pathologie semble marginale au vu des très faibles différences d'expression de *CD1d* et du nombre de lymphocytes NKT mesurées chez les patients (Gautron, Giquel et al. 2010, Barbier, Sabbagh et al. 2012).

Musolino et ses collaborateurs ont mis en évidence en 2015 un effet majeur de la déficience en ABCD1 sur l'endothélium microvasculaire cérébral. Le défaut entraînant l'accumulation d'AGTLC, induirait une diminution d'expression des protéines de jonction serrée endothéliale, *in vitro*. La fragilisation de la BHE serait alors accompagnée d'un recrutement accru de cellules monocytaires en lien avec une baisse d'expression du facteur c-Myc. Ces effets sont fortement susceptibles d'initier et d'accroître la réaction neuro-inflammatoire chez les patients atteints d'X-ALD. De plus, l'absence d'expression d'*ABCD2* dans ces cellules empêcherait tout effet compensatoire (Musolino, Gong et al. 2015). Cette même équipe a pu mettre en évidence une augmentation du débit microvasculaire cérébral et une altération de l'intégrité de la BHE dans les zones péri-lésionnelles à des stades précoces chez les patients atteints de CALD (Lauer, Da et al. 2017).

V.4. L'altération des cellules myéloïdes dans l'X-ALD

La déficience en ABCD1 n'impacte pas tous les types cellulaires de façon similaire. Ainsi, parmi les cellules sanguines mononuclées, les cellules monocytaires (cellules CD14 positives), précurseurs de la plupart des macrophages, sont les cellules les plus impactées par le défaut métabolique. Comparativement aux lymphocytes, ces cellules présentent un niveau basal de β-oxydation mitochondriale et peroxysomale plus important, des niveaux d'expression d'*ABCD2* très faibles et elles accumulent davantage d'AGTLC chez les patients X-ALD (Weber, Wiesinger et al. 2014). La différence phénotypique notable entre les macrophages péritonéaux déficients en ABCD1 et les macrophages péritonéaux double déficients en ABCD1 et ABCD2 suggère un rôle non-négligeable de la fonction redondante d'ABCD2 dans ces cellules (Muneer, Wiesinger et al. 2014). L'absence d'expression d'*ABCD2* dans les monocytes humains expliquerait alors le phénotype sévère de ces cellules dans l'X-ALD.

Dans l'AMN, les monocytes présentent un profil transcriptomique associé à un état pré-activé et une réponse inflammatoire anormale. Après différenciation en macrophages et en présence de débris myéliniques *in vitro*, ces cellules perdent leur capacité à promouvoir une réponse anti-inflammatoire nécessaire à la réparation tissulaire. Les monocytes présentent

aussi une réponse chimioattractive altérée, fortement susceptible d'être en cause dans l'infiltration de ces cellules immunitaires au niveau des lésions de la CALD et en lien avec l'atteinte de la BHE (Weinhofer, Zierfuss et al. 2018).

Au sein du SNC, la présence de cellules microgliales chargées en lipides dans les lésions de la substance blanche de la CALD, suggère un impact important du défaut métabolique dans ces cellules. Les cellules microgliales semblent particulièrement sensibles aux fractions de lysophosphatidylcholine (LPC) riches en AGTLC. Chez la souris, une injection intracérébrale de LPC-C24:0), contrairement à une injection de LPC-C16:0, provoque une importante microgliose réactive ainsi qu'une réponse pro-apoptotique de ces cellules. Dans la CALD, une forte réponse apoptotique des cellules microgliales a pu être observée au sein de la substance blanche péri-lésionnelle provoquant une importante déplétion en cellules microgliales dans ces zones. Cette réponse représenterait un événement précoce de la pathologie, précédant l'évolution des lésions démyélinisantes (Eichler, Ren et al. 2008). Cette même équipe a pu mettre en évidence une dérégulation de la fonction de phagocytose des cellules microgliales associée à une augmentation d'expression de TREM2 et MFGE8 dans la moelle épinière de patients AMN, en l'absence de réponse inflammatoire. L'ajout de LPC-C26:0 sur des cellules microgliales déficientes en ABCD1 *in vitro* provoque cette même réponse, promouvant une activité de phagocytose délétère (Gong, Sasidharan et al. 2017).

VI. Thérapies et pistes thérapeutiques

VI.1. L'huile de Lorenzo et les thérapies nutritionnelles

Du fait du rôle présumé de l'accumulation d'AGTLC dans le développement de la pathologie, plusieurs tentatives de thérapie nutritionnelle ont vu le jour. Une partie des AGTLC présente une origine exogène, cependant, une restriction alimentaire en AGLTC ne semble pas suffisante pour affecter le taux plasmatique La synthèse endogène des AGTLC semble donc contribuer de façon majeure à la masse totale des AGTLC. En 1986, Augusto Odone, avec l'aide du laboratoire du professeur Moser, met au point une thérapie pour son fils Lorenzo atteint de CALD. L'huile de Lorenzo développée correspond à un mélange de triglycérides formé d'acide oléique (C18:1) et d'acide érucique (C22:1) avec une proportion de 4:1. Ce mélange contribue à normaliser les taux plasmatiques de C24:0 et C26:0 (Moser, Borel et al. 1987). Cet effet est au moins en partie attribuable à l'effet inhibiteur de l'acide oléique et érucique sur l'élongase ELOVL1 (Sassa, Wakashima et al. 2014). Cependant,

l'efficacité de ce traitement dans l'X-ALD est encore débattue et bien que le traitement semble réduire le risque d'apparition d'anomalies par IRM (Moser, Raymond et al. 2005), il ne semble pas affecter la progression des atteintes neurologiques (Aubourg, Adamsbaum et al. 1993).

VI.2. La greffe de cellules souches hématopoïétiques et la thérapie génique

En 1984, un premier essai de thérapie par greffe allogénique de cellules souches hématopoïétiques est entrepris sur un garçon de 13 ans atteint de CALD mais les bénéfices de cette thérapie sont contrebalancés par les risques associés à la greffe et l'essai s'avère infructueux (Moser, Tutschka et al. 1984). Six ans plus tard, la même intervention chez un patient à un stade précoce de la maladie montre des résultats bien plus encourageants puisque 18 mois après la greffe, les lésions de la substance blanche observées par IRM ont disparu (Aubourg, Blanche et al. 1990). Suite à l'action d'une chimiothérapie myéloablative suivie d'une greffe allogénique de cellules souches hématopoïétiques, les effets bénéfiques sont vraisemblablement attribuables à un remplacement partiel de la microglie et des macrophages péri-vasculaires : jusqu'à 25% des cellules dans ces populations proviendrait alors du donneur, rétablissant une fonction métabolique normale dans ces cellules (Priller, Flügel et al. 2001, Asheuer, Pflumio et al. 2004).

Afin de limiter les principales complications (compatibilité entre donneur et receveur et risques de maladie du greffon contre l'hôte) et l'importante mortalité (35%) associées aux greffes allogéniques, des essais de thérapie génique sur cellules souches autologues ont été réalisés. Cette thérapie implique un transfert de l'ADN codant pour ABCD1 dans les cellules souches autologues (CD34 positives) par vecteur lentiviral (HIV-1 modifié) *ex vivo* avant que les cellules soient transplantées. Deux ans après la greffe, 9 à 14% des leucocytes expriment le transporteur ABCD1. La thérapie génique présente des bénéfices neurologiques comparables à ceux de la greffe allogénique et apparaît alors comme une avancée majeure (Cartier, Hacein-Bey-Abina et al. 2009). Les greffes de cellules souches hématopoïétiques représentent aujourd'hui les seules thérapies efficaces dans la CALD. La récente étude clinique STARBEAM suggère que la thérapie génique serait l'option thérapeutique la plus sûre, les vecteurs lentiviraux présentant un risque réduit de mutagénèse (Eichler, Duncan et al. 2017). Toutefois, bien que prévenant l'atteinte neuro-inflammatoire associée à la CALD, ces thérapies ne semblent pas prévenir le développement de la myélopathie à l'âge adulte (van Geel, Poll-The et al. 2015).

VI.3. Thérapies pharmacologiques de l'X-ALD

L'existence d'une redondance fonctionnelle entre les transporteurs ABCD1 et ABCD2 génère des perspectives d'intervention pharmacologique intéressantes. Chez l'Homme, le faible niveau d'expression d'ABCD2 dans plusieurs types cellulaires comme les macrophages ou les cellules endothéliales supporte le fort potentiel de cette piste thérapeutique.

Le 4-phénylbutyrate est l'une des premières molécules pour laquelle il a pu être démontré une capacité à induire l'expression d'ABCD2 et ABCD3, à améliorer l'activité de β-oxydation peroxysomale et à diminuer les niveaux tissulaires d'AGTLC *in vivo* (Kemp, Wei et al. 1998). Son activité semble associée à une prolifération peroxysomale ; l'induction transcriptionnelle d'*ABCD2* serait indépendante de PPARα et en lien avec une inhibition d'activités histone désacétylase (Gondcaille, Depreter et al. 2005). La rapide dégradation de cette molécule *in vivo* rend son utilisation illusoire dans le contexte de l'X-ALD. L'acide valproïque, en plus de posséder des propriétés anti-oxydantes, présenterait un mécanisme d'action similaire (Fourcade, Ruiz et al. 2010). Toutefois, son utilisation chez l'Homme est à l'origine d'effets secondaires considérables, dont une importante toxicité hépatique, limitant les bénéfices thérapeutiques potentiels dans l'X-ALD (Chang and Abbott 2006).

D'autre part, le fénofibrate et les molécules assimilées présentant une activité proliféatrice de peroxysome dépendante de PPARα montrent également une capacité à induire l'expression d'ABCD2, hélas seulement au niveau hépatique (Fourcade, Savary et al. 2001). Aucun élément de réponse fonctionnel (appelé PPRE) n'a pu être mis en évidence au sein de la séquence promotrice d'*ABCD2* suggérant un effet indirect de PPARα, potentiellement via le « sterol regulatory element binding protein 2 » (SREBP2) (Fourcade, Savary et al. 2001, Rampler, Weinhofer et al. 2003). Etonnamment, le bézafibrate présenterait également la capacité de limiter l'accumulation d'AGTLC *in vitro* mais indépendamment d'une activation de PPAR, via une inhibition de l'activité des élongases (Engelen, Schackmann et al. 2012). Son potentiel thérapeutique *in vivo* semble cependant limité (Engelen, Tran et al. 2012).

Un élément de réponse conservé capable de fixer le récepteur à la triiodothyronine en association avec le récepteur X des rétinoïdes (RXR) (TRE, « thyroid hormone response element ») a pu être identifié au niveau de ce promoteur (Fourcade, Savary et al. 2003). Si un traitement avec des hormones thyroïdiennes est inenvisageable pour les patients, il a été démontré que des agents thyromimétiques, a priori dénués d'effets secondaires de type cardiovasculaire, ont la capacité de traverser la BHE, d'induire l'expression d'*ABCD2* au

niveau cérébral et de diminuer les taux plasmatique et tissulaire d'AGTLC ce qui pourrait laisser envisager des essais cliniques (Genin, Gondcaille et al. 2009, Hartley, Kirkemo et al. 2017). En parallèle, l'acide rétinoïque agit comme agoniste du RXR, induisant l'expression d'*ABCD2* par le biais de SREBP, alors que les agonistes du récepteur nucléaire aux oxystérols (« liver X receptor » - LXR) produisent l'effet inverse (Weinhofer, Kunze et al. 2005). Le motif TRE est également un site de fixation pour LXR. Si l'activation de LXR réprime l'expression d'*Abcd2*, des antagonistes de LXR pourraient présenter un intérêt thérapeutique puisqu'ils permettent d'induire l'expression d'*ABCD2 in vitro* (Gondcaille, Genin et al. 2014).

Par ailleurs, *in vivo*, l'injection de déhydroépiandrostérone, dont les taux sont très faibles dans la maladie d'Addison, induit une expression hépatique d'*Abcd2* et *Abcd3* (Gueugnon, Lambert et al. 2003, Gueugnon, Gondcaille et al. 2007). L'absence d'un effet bénéfique au niveau cérébral n'a cependant pas permis à cette molécule d'être évaluée lors d'essai clinique.

Du fait des dérégulations du métabolisme du cholestérol observées chez la souris déficiente en ABCD1, des molécules hypolipémiantes, bloquant la voie de synthèse du cholestérol, ont été testées *in vitro* et *in vivo*, parmi lesquelles la lovastatine (Singh, Khan et al. 1998, Yamada, Shinnoh et al. 2000, Khan, Singh et al. 2008). Cependant, un essai clinique réalisé chez 14 patients a conclu à un effet non spécifique de la lovastatine sur les AGTLC et à l'absence d'intérêt thérapeutique (Engelen, Ofman et al. 2010). En outre, la déplétion en cholestérol doit permettre de moduler favorablement l'expression d'ABCD2 via SREBP (Weinhofer, Forss-Petter et al. 2002). Etonnamment, un traitement hypolipémiant par la simvastatine exacerbe davantage l'accumulation d'AGTLC au sein du SNC des souris déficientes en ABCD1 (Cartier, Guidoux et al. 2000).

Outre la piste d'induction de l'expression d'*ABCD2*, plusieurs molécules ont été testées *in vitro* ou *in vivo* dans une stratégie d'amélioration de la fonction mitochondriale et dans le but de limiter la réponse inflammatoire dans l'X-ALD. Elles incluent des activateurs d'AMPK comme la metformine (Singh, Olle et al. 2016), des activateurs de PPARγ comme la pioglitazone (Morato, Galino et al. 2013), les activateurs du « nuclear factor erythroid 2-like 2 » (NRF2) comme le diméthylfumarate (Ranea-Robles, Launay et al. 2018) ou encore des molécules anti-oxydantes, comme la cyclophiline D (Lopez-Erauskin, Fourcade et al. 2011), qui présentent des propriétés cytoprotectrices *in vitro* et *in vivo*. Peu de ces molécules ont toutefois pu démontrer leur efficacité au cours d'essais cliniques.

Des thérapies immuno-modulatrices ou immuno-suppressives, dont l'injection intraveineuse d'immunoglobulines ou d'interféron-β, ont également été testées sans démontrer d'effets concluants (Cappa, Bertini et al. 1994, Korenke, Christen et al. 1997). L'échec de ces thérapies, malgré la nature inflammatoire des lésions démyélinisantes dans la CALD, met en évidence des différences physiopathologiques importantes entre l'X-ALD et d'autres maladies démyélinisantes comme la sclérose en plaque.

VII. Modèles expérimentaux de l'X-ALD

VII.1. Modèles animaux de l'X-ALD

Des modèles de souris déficientes en ABCD1 ont été développés par 3 équipes en parallèle (Forss-Petter, Werner et al. 1997, Kobayashi, Shinnoh et al. 1997, Lu, Lawler et al. 1997). Ces souris présentent une β-oxydation peroxysomale diminuée et des accumulations d'AGTLC dans plusieurs tissus dont le cortex surrénal et le SNC. Bien que des anomalies lipidiques semblables à celles mesurées chez l'Homme aient pu être observées, la souris déficiente en ABCD1 ne présente aucun symptôme neurologique avant un âge avancé d'environ 15 mois. Le phénotype à cet âge comprend alors une axonopathie et des caractéristiques assimilables à celles de l'AMN (Pujol, Hindelang et al. 2002). Bien que ce modèle permette d'explorer les hypothèses physiopathologiques de l'AMN, aucune lésion cérébrale ou atteinte démyélinisante inflammatoire n'est observable dans ce modèle.

La surexpression du gène *Abcd2* dans ce modèle permet de corriger partiellement l'accumulation d'AGTLC, validant le concept de redondance fonctionnelle *in vivo*. En revanche, l'inactivation combinée d'*Abcd1* et *Abcd2* chez la souris, même si elle est responsable d'une plus forte accumulation d'AGTLC, ne permet pas d'imiter un phénotype significativement plus sévère ou une atteinte cérébrale démyélinisante (Pujol, Ferrer et al. 2004). L'impact de l'accumulation d'AGTLC sur la formation et la maintenance de la myéline n'est ainsi pas mesurable chez la souris. L'expression transduite d'ELOVL1 chez la souris déficiente en ABCD1 entraîne une accumulation considérable d'AGTLC mais ne semble pas altérer la manifestation du phénotype au niveau du SNC (van de Beek, Dijkstra et al. 2016).

Outre les modèles murins, d'autres modèles animaux ont pu être générés plus récemment. Plusieurs modèles de maladies peroxysomales ont pu être générés chez la mouche *Drosophila melanogaster*. La déficience en activateurs d'AGTLC, *bubblegum* et *double*

bubble, dans ce modèle est responsable d'une accumulation d'AGTLC mais il semble qu'un défaut de métabolisme peroxysomal, davantage que l'accumulation d'AGTLC, soit responsable du phénotype neurodégénératif observé (Gordon, Valdez et al. 2018). Chez le poisson zèbre (*Danio rerio*), le transporteur ABCD1 présente 70% d'identité de séquence avec le transporteur humain et l'inactivation génique est responsable d'anomalies hypomyélinisantes et d'une mortalité précoce (Strachan, Stevenson et al. 2017). De manière anecdotique, une mutation du gène *ABCD1* a pu être décrite chez un chimpanzé âgé de 11 ans présentant à l'IRM des lésions de la substance blanche et une atteinte ressemblant à celle de la CALD ainsi qu'une accumulation plasmatique d'AGTLC (Curiel, Steinberg et al. 2017).

VII.2. Modèles cellulaires de l'X-ALD

Les cellules sanguines mononuclées de patients X-ALD ont fait l'objet de plusieurs études concernant leur atteinte métabolique dans l'X-ALD (Weber, Wiesinger et al. 2014). Cependant, la faible disponibilité de ces échantillons et une plus faible reproductibilité limite ce type d'études. Les fibroblastes issus de biopsies cutanées de patient X-ALD représentent le modèle principal ayant permis l'étude de l'implication d'ABCD1 dans le transport d'AGTLC. Les génotypes de ces cellules et leur association aux différents phénotypes de l'X-ALD sont d'un grand intérêt pour l'exploration de potentiels gènes modificateurs de la pathologie. Toutefois, d'importantes limitations existent du fait des différences métaboliques et des spécificités tissulaires liées à ces cellules fibroblastiques. En effet, leur métabolisme peroxysomal est grandement limité et leur phénotype est assez peu pertinent dans le contexte des lésions cérébrales de l'X-ALD. Le développement de cellules souches pluripotentes induites (iPSC) permet aujourd'hui de nouvelles opportunités. Ainsi, des cellules astrocytaires et oligodendrocytaires ont pu être générées à partir de fibroblastes de patients CALD et AMN et présentent des accumulations d'AGTLC corrélées avec l'expression d'*ELOVL1* ainsi qu'une prédisposition à l'expression d'une réponse pro-inflammatoire (Jang, Kang et al. 2011, Baarine, Khan et al. 2015). Curieusement, les iPSC dérivées à partir de fibroblastes de patients X-ALD présentent des différences d'expression génique relatives à des anomalies de prolifération peroxysomale ou de réponse neuro-inflammatoire mais ne présentent pas d'accumulation d'AGTLC saturés (Wang, Yik et al. 2012). En 2016, Muffat et ses collaborateurs décrivent un protocole permettant la dérivation d'iPSC de patient X-ALD en cellules microgliales, modèle qui devrait alors apporter des informations pertinentes sur la physiopathogenèse de l'X-ALD (Muffat, Li et al. 2016).

En parallèle des travaux menés sur des cellules humaines ou murines, de nombreux travaux réalisés chez la levure *Saccharomyces cerevisiae* ont largement contribué à la compréhension des mécanismes de transport peroxysomaux. Ces modèles, s'ils restent peu pertinents vis-à-vis de la physiopathologie, sont d'un grand intérêt pour l'étude des substrats des transporteurs peroxysomaux (van Roermund, Ijlst et al. 2012).

OBJECTIFS ET STRATEGIE

De nombreuses zones d'ombre subsistent concernant la pathogénèse de L'X-ALD, leucodystrophie et maladie peroxysomale la plus fréquente. Malgré des progrès remarquables tels que le dépistage néonatal récemment mis en place dans plusieurs pays, les options thérapeutiques disponibles restent encore très limitées. L'essor de la thérapie génique soulève un espoir considérable pour les patients CALD mais implique également d'importantes contraintes scientifiques, réglementaires et financières. L'absence de modèles expérimentaux pertinents est l'un des principaux freins à la compréhension des mécanismes pathologiques et au développement de thérapies. Loin d'imiter les atteintes démyélinisantes neuro-inflammatoires de la CALD, le phénotype modéré observé dans les modèles de souris déficientes en ABCD1 et/ou ABCD2 s'est révélé relativement décevant et justifie la nécessité de développer des alternatives. Sans se substituer aux modèles animaux, les modèles *in vitro* représentent des outils essentiels au cours des études précliniques, en plus de présenter des avantages considérables sur le plan économique ou pratique.

- Le premier objectif de ma thèse a donc été de générer des modèles de cellules microgliales BV-2 déficientes en ABCD1, ABCD2, ABCD1 et ABCD2 ou déficientes en ACOX1. Le choix de la lignée cellulaire, des gènes à muter et de la stratégie utilisée (édition génique à l'aide du système CRISPR/Cas9) sont discutés ci-dessous.
- Le second objectif a visé à valider ces modèles au niveau génomique (caractérisation des mutations introduites par PCR et séquençage), protéique (validation de la perte d'expression par western blotting) et biochimique (démonstration de l'accumulation d'AGTLC).
- Le troisième objectif s'est concentré sur la caractérisation des conséquences de l'inactivation de ces gènes et de l'accumulation d'AGTLC dans ces cellules microgliales en lien avec divers aspects métaboliques, cellulaires et fonctionnels et ceci dans différentes situations d'activation.

L'importante plasticité des macrophages et des cellules microgliales, qui peut facilement être mise en évidence lors d'une stimulation par LPS, est fortement dépendante de leur métabolisme. Cette étude vise donc à évaluer les effets d'un défaut du métabolisme peroxysomal sur cette plasticité. En parallèle de cette réponse au LPS, il parait pertinent de tester les effets sur ces cellules de lipides dont l'accumulation a pu être mise en évidence dans

l'X-ALD. La culture en présence de C26:0 doit permettre d'amplifier l'accumulation des AGTLC dans les cellules et faciliter l'observation de sa toxicité présumée. Plus récemment, l'accumulation de 25HC dans la microglie a été identifié comme un acteur majeur de la réponse inflammatoire dans l'X-ALD (Jang, Park et al. 2016). Une analyse des profils d'expression par séquençage du transcriptome entier de ces modèles cellulaires doit permettre de répondre en grande partie à cette question. En lien avec ces changements de plasticité, les cellules microgliales de patient X-ALD semblent présenter des fonctions de phagocytose et de présentation antigénique altérées. Conséquence d'un défaut de métabolisme peroxysomal, plusieurs classes de lipides cytotoxiques sont susceptibles de s'accumuler dans les membranes cellulaires modifiant leur organisation et leur fluidité. Dans cette hypothèse, de telles modifications pourraient engendrer d'important changement en terme de transduction du signal ou même des mécanismes d'endocytose. Pour répondre à ces questions, cette étude a bénéficié de l'expertise du Centre d'Immunologie de Marseille-Luminy (CIML), par le biais d'une collaboration avec le Dr Yannick Hamon, à laquelle j'ai pu activement prendre part au cours du dernier trimestre 2017. Ces travaux ont pu être réalisés dans le cadre d'un projet intitulé « Organisation membranaire et signalisation cellulaire dans des modèles cellulaires microgliaux de maladies démyelinisantes », et grâce au financement de la Fondation pour l'aide à la recherche sur la sclérose en plaque (ARSEP).

- De façon plus générale, ces travaux s'attacheront à décrire dans quelle mesure les fonctions métaboliques assurées par le peroxysome sont essentielles aux fonctions d'un phagocyte spécialisé et au maintien d'une réponse immunitaire adaptée au sein du SNC. En perspective, les différents marqueurs de la pathologie observés dans ces cellules pourront servir en vue de l'identification de molécules correctrices.

Pourquoi un modèle de cellules microgliales ?

La capacité des greffes de cellules souches hématopoïétiques à enrayer la réponse neuro-inflammatoire chez les patients CALD suggère que l'atteinte des cellules myéloïdes (seules cellules immunitaires résidentes du SNC) dans l'X-ALD joue un rôle central dans l'initiation de cette réponse. Des études complémentaires chez la souris ont permis de confirmer que la greffe permettait l'expression d'une protéine ABCD1 fonctionnelle au sein d'une fraction de la population microgliale (Cartier, Hacein-Bey-Abina et al. 2009).

En 2008, les travaux du laboratoire de Florian Eichler soutiennent que le défaut métabolique dans les cellules microgliales comme point central dans le développement de la pathologie, en posant alors la question suivante : L'apoptose des cellules microgliales est-elle un événement pathologique précoce dans la CALD ? (Eichler, Ren et al. 2008). Plusieurs éléments viennent aujourd'hui conforter l'idée que l'altération de certaines fonctions de ces cellules, comme leur capacité de phagocytose, est un événement majeur dans le développement de la CALD mais aussi de l'AMN (Gong, Sasidharan et al. 2017). En parallèle, les travaux réalisés au sein du laboratoire de Johannes Berger ont fortement permis d'identifier des perturbations importantes sur le métabolisme et la plasticité phénotypique des cellules myéloïdes en conséquences de l'absence du transporteur ABCD1 (Weber, Wiesinger et al. 2014, Weinhofer, Zierfuss et al. 2018).

Pourquoi une lignée cellulaire murine immortalisée?

Différentes approches existent pour permettre de générer des modèles cellulaires expérimentaux. Les iPSC représentent ainsi une option pertinente dans ce but mais qui connaît encore certaines limites de par les techniques de reprogrammation et de différenciation de ces cellules. L'émergence récente d'un outil de génie génétique, associé à des séquences du nom de Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats (CRISPR) et à l'action de la nucléase CRISPR-associated 9 (Cas9), a ouvert de nouvelles possibilités. Les inactivations géniques, jusqu'à alors possibles uniquement au sein de cellules souches, sont devenues théoriquement possibles dans tout type cellulaire. Les mutations du gène *ABCD1* à l'origine de l'X-ALD peuvent ainsi être reproduites dans des lignées cellulaires. En comparaison avec les cultures primaires, les lignées cellulaires présentent des avantages considérables, notamment en termes de reproductibilité des résultats et de facilité d'obtention du matériel biologique. Au démarrage de l'étude en 2014, et encore à ce jour à ma connaissance, de très rares lignées de cellules microgliales humaines immortalisées (dont la lignée HMO6, sous licence) avaient pu faire l'objet d'une caractérisation. La plupart des lignées humaines disponibles dérivées par Sv40 (HMC3, CHME5) n'ont d'ailleurs été commercialisées que très récemment. Les caractéristiques primaires et les capacités de phagocytose et de sécrétion de cytokines des cellules microgliales BV-2 ont en effet fait l'objet de nombreux travaux. De plus, le choix de se tourner vers une lignée murine se justifiait par le fait que plusieurs expériences de co-culture étant envisagées dans les perspectives de ce projet et seraient possibles et facilitées par l'accessibilité à plusieurs lignées ou cultures primaires d'oligodendrocytes ou de lymphocytes T murins. Il était en effet

envisagé des expériences de présentation antigénique avec des lymphocytes T murins issus de souris transgéniques permettant la reconnaissance d'un peptide ovalbumine ainsi que des expériences de co-culture avec la lignée oligodendrocytaire murine 158N sur laquelle se sont portés de nombreuses études au sein du laboratoire.

Pourquoi une inactivation en parallèle du transporteur ABCD2 ou de l'enzyme ACOX1 ?

En plus d'un modèle de cellules microgliales BV-2 déficient en ABCD1, il a été choisi de réaliser en parallèle un modèle cellulaire déficient en ABCD2 ainsi qu'un modèle cellulaire doublement déficient en ABCD1 et ABCD2. Par immunohistochimie, la présence de la protéine ABCD2 a pu être confirmée au sein des peroxysomes des cellules microgliales BV-2 (Debbabi, Nury et al. 2017). Du fait de la redondance fonctionnelle, l'activité de ce transporteur est fortement suspectée de compenser au moins en partie un défaut en transporteur ABCD1. Dans l'X-ALD comme chez la souris déficiente en ABCD1, la sévérité du phénotype dans plusieurs tissus semble inversement corrélée au niveau d'expression d'ABCD2 (Weber, Wiesinger et al. 2014). Ainsi, le modèle doublement déficient pour ces protéines devrait permettre de reproduire un phénotype plus sévère, imitant celui de tissus de patients X-ALD présentant un niveau d'expression d'ABCD2 nul ou quasi-nul, comme cela semble être le cas dans les cellules myéloïdes. Par ailleurs, bien que ces deux transporteurs présentent une similarité de séquence importante, la génération de ces différents modèles a pour double intérêt de faciliter l'étude des spécificités de substrat de chacun de ces transporteurs.

En parallèle de l'inactivation des transporteurs ABCD1 et ABCD2, il nous a semblé pertinent de générer un modèle cellulaire déficient en ACOX1, l'enzyme limitante de la β-oxydation peroxysomale, de façon à pouvoir le comparer aux cellules présentant une simple déficience en transport peroxysomal. L'inactivation d'*Acox1* dans les cellules BV-2 doit permettre d'évaluer l'effet d'un défaut complet de β-oxydation des AGTLC sur la plasticité phénotypique de la microglie. Le phénotype de ces cellules devrait vraisemblablement être plus sévère que celui de cellules présentant un défaut en transporteur ABCD1 et ABCD2.

RESULTATS

I. Génération et caractérisation des modèles cellulaires déficients en ABCD1, ABCD2 ou ACOX1

I.1. La technique d'édition génique CRISPR-Cas9 et les stratégies d'obtention des clones déficients

Identifiées chez les bactéries, il y a près de 30 ans, les séquences CRISPR correspondent à des séquences palindromiques répétées et entrecoupées de séquences étrangères d'origine virale appelées « protospacer ». Ces séquences présentent à leurs extrémités un « protospacer adjacent motif » (PAM), permettant leur reconnaissance par une protéine Cas. Plusieurs systèmes CRISPR-Cas ont pu être décrits chez la bactérie et ils s'apparentent en fait à des systèmes d'immunité adaptative anti-virale. Le locus CRISPR, une fois transcrit, permet la production d'ARN CRISPR (« crRNA ») complexés aux « trans-activating crRNA » (« tracrRNA ») et à la nucléase Cas9, reconnaissant et clivant l'ADN de bactériophage. Le système CRISPR-Cas9 ouvre aujourd'hui le champ à de nombreuses applications de biotechnologie et apparaît aujourd'hui comme un outil d'édition du génome à très grand potentiel.

Expérimentalement, dans les cellules eucaryotes, les « crRNA » et « tracrRNA » sont remplacés par un ARN guide. Reconnu par l'endonucléase Cas9, il permet une hybridation spécifique au locus ciblé et un clivage de l'ADN double-brin. Ce clivage va permettre, en présence d'une séquence homologue d'ADN, une réparation par recombinaison homologue (RH). La réparation par RH a pour intérêt de permettre l'insertion spécifique d'un gène de résistance aux antibiotiques ou d'un gène codant des marqueurs de sélection, facilitant la sélection de ces événements. En l'absence de séquence homologue, ce clivage peut entraîner une réparation qui consiste en une jonction d'extrémités non homologues (JENH ou NHEJ) le plus souvent imparfaite et qui est fréquemment à l'origine d'insertion ou de délétion de quelques paires de bases (Indel), entraînant ainsi l'inactivation génique (Figure 7). La fréquence d'apparition des événements de JENH ou de RH dépend du cycle cellulaire mais les événements de JENH sont généralement plus fréquents dans la plupart des types cellulaires (Maruyama, Dougan et al. 2015).

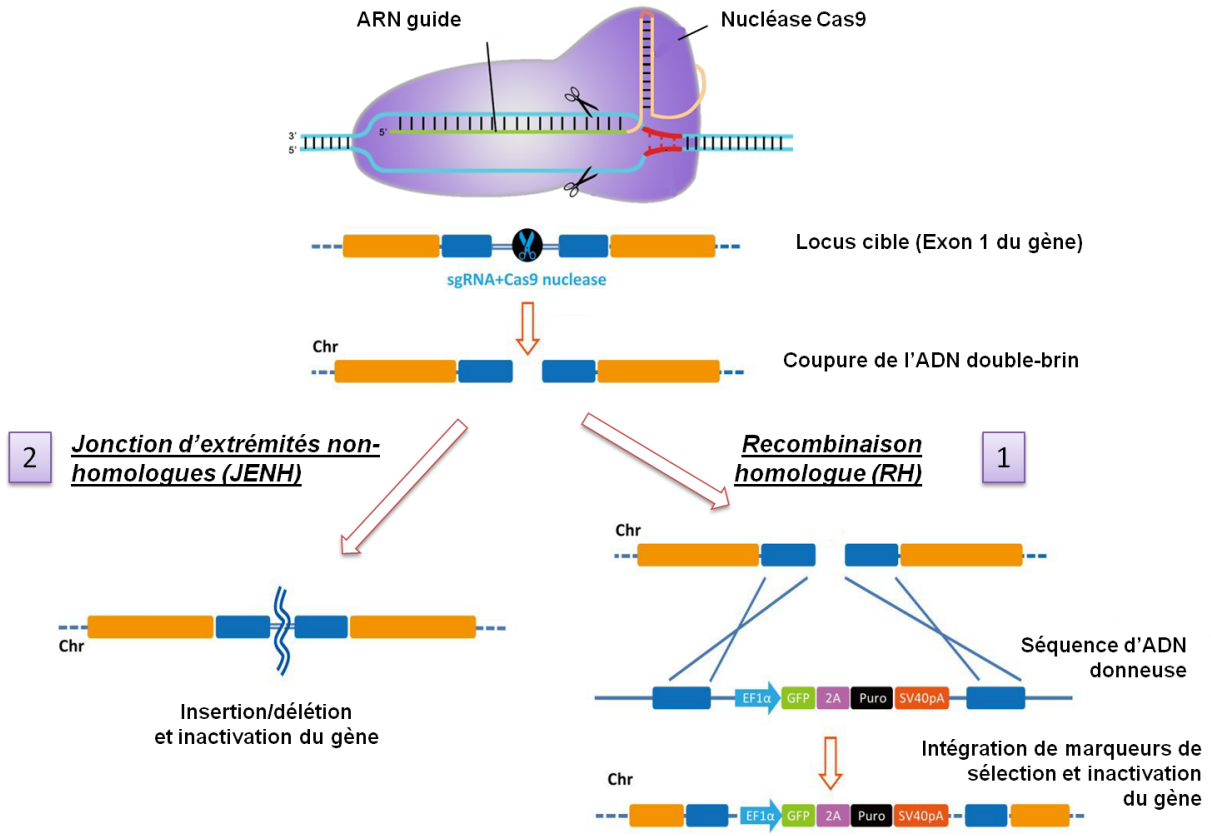


Figure 7 : Inactivation génique par CRISPR-Cas9.
L'ARN guide reconnu grâce à la séquence PAM (en rouge) par l'endonucléase Cas9 permet une reconnaissance spécifique de la séquence génomique ciblée (exon 1 de nos gènes d'intérêt). La coupure de l'ADN double brin résultante peut alors être réparée par la cellule par RH (1) ou par JENH (2).

Pour inactiver nos gènes d'intérêt, les cellules sont transfectées avec un plasmide permettant l'expression d'un ARN guide et de l'endonucléase Cas9 (plasmide CRISPR). Pour chacun des gènes *Abcd1*, *Abcd2* et *Acox1*, l'efficacité de coupure de 2 ARN guide différents, ciblant l'exon 1 de chaque gène, a pu être testée. Pour nous assurer une efficacité et une spécificité optimales, les designs des ARN guide et des plasmides ont été effectués par GeneCopoeia, Inc/tebu-bio, France. En parallèle, nous avons pu obtenir auprès du même fournisseur un plasmide donneur présentant des séquences homologues flanquant le site de coupure et facilitant la recombinaison homologue pour chacun des gènes *Abcd1*, *Abcd2* et *Acox1*. Ces plasmides agissent comme matrice donneuse et permettent l'insertion d'un gène de résistance antibiotique (résistance à la puromycine ou à la néomycine) et d'une séquence codant pour une protéine fluorescente (copGFP) aux sites de coupure afin de faciliter la sélection des événements de RH. Ces plasmides comportent également des séquences thymidine kinase à l'extérieur de la séquence insérée, empêchant toute intégration aléatoire du plasmide après une sélection par ganciclovir. Enfin, pour limiter l'impact des recombinaisons

sur les clones, les cassettes de sélection présentent l'avantage d'être « floxées » (flanquées de site LoxP) et une recombinaison Cre permet alors d'éliminer ces cassettes.

Deux stratégies reposant sur les mécanismes de réparation par RH (*Acox1*) ou par JEHM (*Abcd1* et *Abcd2*) ont été utilisées afin d'obtenir des clones déficients. Après électroporation (Amaxa Nucleofector, Lonza) des cellules BV-2 en présence d'un plasmide CRISPR ciblant l'exon 1 du gène *Acox1* et d'un plasmide donneur pour permettre une recombinaison homologue au site de coupure, une double sélection antibiotique et un tri des cellules fluorescentes par cytométrie en flux sont réalisés (Figure 8). L'obtention de clones cellulaires déficients en ACOX1 est confirmé après criblage PCR, séquençage Sanger et Western Blot. Ce protocole est détaillé dans l'article « A microglial cell model for acyl-CoA oxidase 1 deficiency » (page 2-3) (Raas, Saih et al. 2018). Toutefois cette méthodologie reposant sur la sélection antibiotique présente l'inconvénient de limiter fortement l'hétérogénéité entre les clones sélectionnés, le tri cellulaire et le clonage ayant lieu après 14 jours de sélection aux antibiotiques, les cellules ont pu se multiplier dans cet intervalle de temps. Une seconde stratégie simplifiée et basée sur une sélection précoce des clones en l'absence de recombinaison homologue a ainsi été développée. En effet, même en l'absence de plasmide donneur, les événements de JEHM sont suffisants pour induire une inactivation génique sans nécessiter d'intégration. Le plasmide CRISPR présente l'avantage de permettre l'expression de la protéine fluorescente mCherry et facilite la sélection fluorescente par cytométrie en flux des cellules transfectées (Figure 8). Cette méthodologie a été employée afin d'obtenir les clones déficients en ABCD1 et ABCD2 présentés dans l'article « ABCD1 and ABCD2 deficient microglial cell model ».

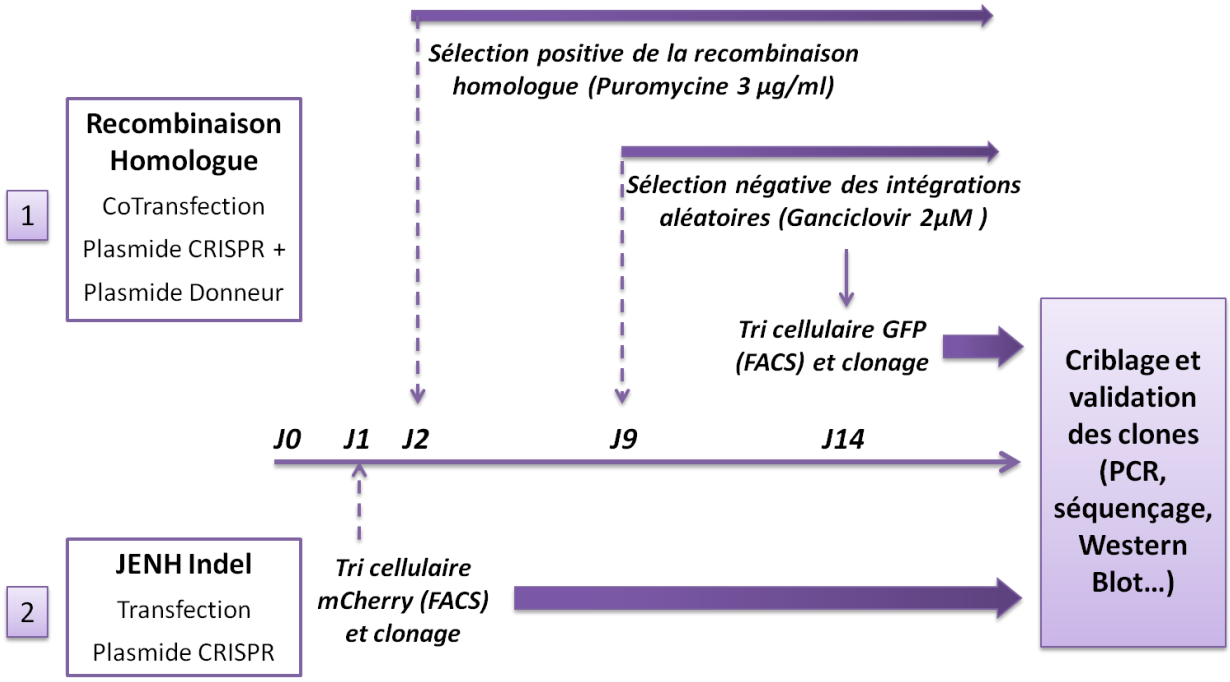


Figure 8 : Protocoles de sélection des clones inactivés.
La première stratégie reposant sur la recombinaison homologue en présence d'un plasmide donneur permet de sélectionner des clones inactivés après sélection antibiotique et tri cellulaire par cytométrie en flux (FACS) (1). La seconde stratégie ne dépend que d'une sélection fluorescente par FACS (2). Après plusieurs jours de culture et amplification, les clones sélectionnés quel que soit la stratégie sont criblés par PCR, séquençage et Western Blot.

Les deux articles qui suivent présentent la méthodologie employée pour générer ces modèles ainsi que les premières étapes de leurs caractérisations. Le choix a été fait de présenter séparément les résultats concernant le modèles cellulaires déficients en ACOX1 et les modèles déficients en transporteurs ABC peroxysomaux au sein de deux articles. Le premier article a pu être publié dans le journal *BBA « Molecular and Cell Biology of Lipids »* (DOI :10.1016/j.bbalip.2018.10.005) et le second vient d'être soumis au même journal (Manuscript Number : BBALIP-18-280). En effet, en plus des différences de méthodologie d'obtention, les modèles cellulaires déficients en ACOX1 et les modèles déficients en ABCD1 et ABCD2 sont fortement susceptibles d'avoir des applications distinctes.

I.2. A microglial cell model for acyl-CoA oxidase 1 deficiency

Cet article présente la méthodologie d'obtention d'un modèle cellulaire de la déficience en ACOX1, la validation de la mutation bi-allèlique conduisant à l'absence de la protéine et de son activité enzymatique. Ces cellules présentent également une activité catalase accrue signalant une perte de l'homéostasie redox. Les analyses ultra-structurales de ce modèle mettent en évidence une augmentation du nombre de mitochondries et de peroxysomes. Des changements des contenus en lipides neutres ont pu être observés et sont probablement associés à l'accumulation d'AGTLC saturés et mono-insaturés dans ces cellules. Enfin, les mesures d'expression des gènes *Il1β, Il6* et *Trem2* réalisées indiquent une modification de la plasticité microgliale résultant de la déficience en ACOX1.

BBA - Molecular and Cell Biology of Lipids 1863 (2018) xxx–xxx

Contents lists available at ScienceDirect

BBA - Molecular and Cell Biology of Lipids

journal homepage: www.elsevier.com/locate/bbalip

A microglial cell model for acyl-CoA oxidase 1 deficiency

Q. Raas[a], F.-E. Saih[a,b], C. Gondcaille[a], D. Trompier[a], Y. Hamon[c], V. Leoni[d], C. Caccia[e], B. Nasser[b], M. Jadot[f], F. Ménétrier[g], G. Lizard[a,h], M. Cherkaoui-Malki[a], P. Andreoletti[a], S. Savary[a,*]

[a] Laboratoire Bio-PeroxIL EA7270, University of Bourgogne Franche-Comté, Dijon, France
[b] Laboratoire de Biochimie et Neurosciences, Faculté des Sciences et Techniques, University Hassan I, Settat, Morocco
[c] Aix Marseille Univ, CNRS, INSERM, CIML, Centre d'Immunologie de Marseille-Luminy, Marseille, France
[d] Laboratory of Clinical Chemistry, Hospital of Varese, ASST-Settelaghi, Milan, Italy
[e] Laboratory of Medical Genetics and Neurogenetics, Foundation IRCCS Istituto Neurologico Carlo Besta, Milan, Italy
[f] Unité de Recherche en Physiologie Moléculaire (URPhyM), laboratoire de Chimie Physiologique, NARILIS (Namur Research Institute for Life Sciences), University of Namur (UNamur), Namur, Belgium
[g] Centre des Sciences du Goût et de l'Alimentation, AgroSup Dijon, UMR6265/UMRA1324, CNRS, INRA, University of Bourgogne Franche-Comté, Dijon, France
[h] INSERM, Dijon, France

ARTICLE INFO

Keywords:
Peroxisome
Microglia
Acyl-CoA oxidase
VLCFA

ABSTRACT

Acyl-CoA oxidase 1 (ACOX1) deficiency is a rare and severe peroxisomal leukodystrophy associated with a very long-chain fatty acid (VLCFA) β–oxidation defect. This neurodegenerative disease lacks relevant cell models to further decipher the pathomechanisms in order to identify novel therapeutic targets. Since peroxisomal defects in microglia appear to be a key component of peroxisomal leukodystrophies, we targeted the *Acox1* gene in the murine microglial BV-2 cell line. Using CRISPR/Cas9 gene editing, we generated an *Acox1*-deficient cell line and validated the allelic mutations, which lead to the absence of ACOX1 protein and enzymatic activity. The activity of catalase, the enzyme degrading H_2O_2, was increased, likely in response to the alteration of redox homeostasis. The mutant cell line grew more slowly than control cells without obvious morphological changes. However, ultrastructural analysis revealed an increased number of peroxisomes and mitochondria associated with size reduction of mitochondria. Changes in the distribution of lipid droplets containing neutral lipids have been observed in mutant cells; lipid analysis revealed the accumulation of saturated and monounsaturated VLCFA. Besides, expression levels of genes encoding interleukin-1 beta and 6 (*IL-1β* and *IL-6*), as well as triggering receptor expressed on myeloid cells 2 (*Trem2*) were found modified in the mutant cells suggesting modification of microglial polarization and phagocytosis ability. In summary, this *Acox1*-deficient cell line presents the main biochemical characteristics of the human disease and will serve as a promising model to further investigate the consequences of a specific microglial peroxisomal β–oxidation defect on oxidative stress, inflammation and cellular functions.

1. Introduction

Peroxisomes are small organelles (0.1–1 μm), found in almost all cell types, that take their name from their capacity to produce and convert hydrogen peroxide into water. Many severe genetic disorders have been associated to a peroxisomal biogenesis defect or a single peroxisomal deficiency illustrating their vital function in cells and tissues [1]. One of their main roles concerns lipid metabolism, especially oxidation of fatty acids. Peroxisomal β–oxidation, which consists of a 4-step enzymatic loop, permit to shorten fatty acids by 2 carbon atoms at each cycle along with the release of one acetyl-CoA molecule [2]. Peroxisomal acyl-coenzyme A oxidase 1 (ACOX1, E.C. 1.3.3.6) catalyzes the first and rate-limiting step of this β–oxidation pathway dedicated to straight-chain fatty acids, which includes long- and very long-chain fatty acids (LCFA, VLCFA), polyunsaturated fatty acids, and di-carboxylic acids. Peroxisomal oxidation of bile acid intermediates

Abbreviations: ACOX1, acyl-CoA oxidase 1; copGFP, copepod green fluorescent protein; CRISPR, clustered regularly interspaced short palindromic repeat; DAB, diaminobenzidine; FBS, fetal bovine serum; GC–MS, gas chromatography mass spectrometry; GFP, green fluorescent protein; HDR, homologous directed repair; NAD, nicotinamide adenine dinucleotide; L/VLCFA, long/very long-chain fatty acids; MUFA, monounsaturated fatty acids; NHEJ, non-homologous end-joining; PUFA, polyunsaturated fatty acids; SFA, saturated fatty acids; TEM, transmission electron microscopy; TK, thymidine kinase

* Corresponding author.
E-mail address: stsavary@u-bourgogne.fr (S. Savary).

https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2018.10.005
Received 21 June 2018; Received in revised form 1 October 2018; Accepted 5 October 2018
Available online 10 October 2018
1388-1981/ © 2018 Elsevier B.V. All rights reserved.

depends on ACOX2 [3] while oxidation of branched-chain fatty acids depends on both ACOX2 and ACOX3 enzymes [4,5]. The reaction catalyzed by ACOX1 consists of dehydrogenation of acyl-CoA to 2-trans-enoyl-CoA and produces hydrogen peroxide which is subsequently transformed into water and oxygen by catalase. In human and mice, the ACOX1 enzyme is encoded by a single gene localized on chromosome 17 and 11 respectively [6–9]. Alternative splicing leads to the synthesis of two protein isoforms ACOX1a or ACOX1b with different substrate specificity [10].

Growth retardation, sterility, and hepatomegaly with steatosis, were described in *Acox1*-deficient mice [11]. Although ACOX1 is widely expressed in the brain [12,13], its absence in null mice did not lead to apparent neurological manifestations. In human, however, ACOX1 deficiency (OMIM #264470) is associated with very severe and generalized neurological alterations (average age of death: 5 years). This rare autosomal disorder (about 30 patients have been reported worldwide) also known as pseudo-neonatal adrenoleukodystrophy, is characterized by infantile-onset hypotonia, seizures, visual impairment, loss of motor achievements and progressive white and grey matter degeneration resembling neonatal adrenoleukodystrophy [7,14–17]. Similar demyelination observations were obtained after experimental inhibition of peroxisomal β–oxidation in rat brain [18]. Hepatomegaly, adrenal insufficiency and craniofacial dysmorphia are less frequently reported. Biochemically, the disease is characterized by the accumulation of both saturated and monounsaturated VLCFA while plasma levels of branched-chain fatty acids and bile acid intermediates as well as erythrocytes plasmalogens remain unchanged. The monitoring of VLCFA levels and their ratios (C26:0/C22:0 or C24:0/C22:0) is indeed used for diagnosis in complement of magnetic resonance imaging and genetic analysis [16,19,20].

The in-depth characterization of fibroblasts of patients with ACOX1 deficiency has established a link between peroxisomal defect and inflammation [21]. Although the inflammatory component represents a major feature of the disease, increased oxidative stress, endoplasmic reticulum stress as well as altered brain cellular crosstalk are strongly suspected to contribute to the development of neuroinflammation and neurodegenerative processes. Selective ablation of functional peroxisomes in brain cell lineages using specific *Pex5* knockout mice has underlined the importance of the cellular context [22,23]. This is especially true in oligodendrocytes, the myelin producing cells [24]. In other peroxisomal leukodystrophies such as X-linked adrenoleukodystrophy, peroxisomal alterations and VLCFA accumulation in microglial cells have been proposed to trigger inflammatory processes and increased oxidative stress that contribute to amplifying the primary peroxisomal defect [25,26]. Microglia was indeed identified as a main actor in the phagocytosis of myelin debris along with secretion of neuroprotective molecules [27]. It can therefore be assumed that a peroxisomal defect in the microglia would trigger a gradual loss of its ability to eliminate damaged myelin and, consequently, to scavenge the lipotoxic effects of VLCFA in other brain cell types.

The study of the physiopathogenesis of ACOX1 deficiency and the identification of underlying neurodegenerative and inflammatory processes require the development of relevant study models. Skin fibroblasts are usually the only in vitro model for peroxisomal diseases. The recent emergence of clustered regularly interspaced short palindromic repeat (CRISPR)/CRISPR-associated protein 9 (Cas9) gene editing methodologies now offers the opportunity to target any gene in almost any cell types [28]. Specific CRISPR/Cas9-mediated double strand DNA break can be obtained in a specific gene using a single guide RNA (sgRNA). The selection of homologous directed repair (HDR), if a donor sequence is present in the cells, or non-homologous end-joining (NHEJ) repair events allows targeted mutations to be obtained. Microglia being considered as a key cell type in brain pathology, we decided to generate a murine microglial cell line bearing *Acox1* mutation using CRISPR/Cas9 gene editing strategy. The BV-2 immortalized cell line, established in 1990 [29], benefits from a huge scientific background and is extensively used as a good alternative to primary microglial cells in the context of neurodegenerative researches. Indeed, this cell line retains most of the morphological, phenotypical and functional properties described for freshly isolated microglial cells [30]. Moreover, BV-2 cells share properties with macrophages with respect to the antigen profile, phagocytic capacity and antimicrobial activity and retain the potential for inflammatory cytokine secretion [31]. Here, we describe the establishment of an *Acox1*-deficient BV-2 cell clone, its validation and its characterization focusing on cell growth, cell morphology and ultrastructure, and fatty acid content.

2. Materials and methods

2.1. Plasmids

Custom synthesized plasmids used for genome editing were obtained from GeneCopoeia, Inc./tebu-bio (France). The all-in-one plasmid (Catalog No: MCP231241-CG01-2-B-b) enables the co-expression of a sgRNA targeting the first exon of the *Acox1* gene (target sequence: 5′-GGCCCGCTCCTTGCGCAGAT-3′) under the regulation of a U6 promoter and a Cas9 nuclease driven by a CMV promoter. The specificity of CRISPR/Cas9 editing mainly depends on the sgRNA sequence and on the presence of protospacer adjacent motif located next to the target sequence. Potential off-target cleavage activity has already been described in sequences presenting three to five mismatches with the sequence of the sgRNA [32]. To avoid non-specific mutations, we paid attention to the design of the all-in-one CRISPR plasmid and relied on the expertise of our plasmid supplier (GeneCopoeia, Inc.). The sgRNA sequence targeting the first exon of *Acox1* was chosen to exhibit the highest quality score by inverse likelihood of off-target binding based on the CRISPR design tool developed by Zhang Lab, MIT 2017 (http://crispr.mit.edu/). To test for potential off-target mutations on the selected knockout cell clone, we looked for NHEJ-mediated mutations on the two genomic sites of the 56 potential sites displaying the highest predicted likelihood of off-target binding (Table 1). Sanger sequencing confirmed the absence of CRISPR/Cas9-induced mutations in these putative targets located on chromosomes X and 12 respectively (data not shown), strongly suggesting the absence of off-target events.

The donor plasmid (DC-MTN231241-D07), contains two recombination arms flanking the genomic cutting site and selection cassettes (copGFP and puromycin resistance) flanked by two LoxP sites. The donor plasmid also contains a thymidine kinase (TK) cassette outside of the recombination arms conferring ganciclovir sensitivity in case of random integration.

The plasmid pOG231 (Addgene), a Cre-expressing plasmid for removal of floxed sequences, was kindly provided by M. Baes (Leuven, Belgium).

2.2. Cell culture, transfection, clonal selection, and proliferation assay

Murine microglial cells (BV-2) from Banca-Biologica e Cell Factory (catalog no. ATL03001) were cultured in DMEM supplemented with

Table 1
Screening of off-target events in BV-2 *Acox1* mutant cells.

	Sequence	Mismatches (# and position)	Locus
Target sequence	GGCCCGCTCCTTGCGCAGAT**CGG**	4:[1-2-3-6]	chrX: −7,341,383
Predicted off-target 1	CTTCCTCTCCTTGCGCAGAT**GGG**		
Target sequence	GGCCCGCTCCTTGCGCAGAT**CGG**	4:[2-5-7-9]	chr12: −56,701,554
predicted off-target 2	GCCAGGT-GCTTGCGCAGAT**AGG**		

Mismatches are underlined and the protospacer adjacent motif (NGG) is in bold.

10% heat-inactivated FBS and 1% penicillin/streptomycin (Dutscher). Cultures were maintained at 37 °C in a humidified atmosphere containing 5% CO_2.

BV-2 cells (2×10^6, ~70% confluence) were transfected with 2 μg all-in-one plasmid and 2 μg donor plasmid using Amaxa Cell Line Nucleofector Kit T (Lonza) and program A-023, to allow CRISPR/Cas9-primed homologous directed repair (HDR). Recombinant cells were treated 48 h after transfection with puromycin 3 μg/ml for 19 days (positive selection). Negative selection of potential non-targeted integration started 11 days after transfection. Ganciclovir (2 μM) was added to the culture for 12 days. After antibiotic selection, cells were sorted by flow cytometry based on high expression of copGFP and then seeded as single cells in a 96-well plate. Cells were allowed to grow for 10–14 days before genotyping. In order to remove the selection cassettes, the validated clones were transfected with 2 μg Cre-expressing plasmid using Amaxa Cell Line Nucleofector Kit T (Lonza) and program A-023. 48 h after transfection, cells with no expression of copGFP were sorted by flow cytometry and then seeded as single cells in a 96-well plate.

For growth comparison, WT and mutant BV-2 cells were seeded in 24-well plates (2×10^4 cells/well) and cultivated for 24, 48, 72 or 96 h. The cells being semi-adherent, the medium was not replaced during growth to avoid cell loss. Viability was evaluated with trypan blue (0.025% final concentration). Living cells were counted using a hemocytometer. The average number of cells was obtained from 3 independent wells.

2.3. Molecular analysis (genomic DNA purification, PCR)

Genomic DNA was extracted from selected clones with the Wizard Genomic DNA Purification Kit (Promega) and PCR amplified with the GoTaq Long PCR master mix (Promega) using the following primers *Acox1*F: 5′-CTCAAGGCCCTGGCCAATCG-3′, *Acox1*R: 5′-ACGCCCATCG AAGTAGGGGT-3′. To control targeted recombination, PCR products were visualized on a 1% agarose electrophoresis gel using a Bio-Rad Gel Doc XR + Imager System. NHEJ mediated mutations were confirmed after PCR amplification with the same primers and a GoTaq Flexi DNA polymerase (Promega) (unable to amplify fragments longer than 2 kb), and Sanger sequencing (Eurofins Genomics sanger sequencing platform, Germany).

2.4. Western blotting

Cell lysates were prepared in solubilization buffer containing 100 mM Tris-HCl, pH 8, 100 mM NaCl, 1% Triton X-100, 1% PMSF, and cOmplete protease inhibitor mixtures (Roche Applied Science). Proteins from total cell lysate (50 μg) were separated on 7.5% SDS-PAGE and transferred onto a PVDF membrane. First incubated in 5% skimmed milk in PBS, 0.1% Tween 20 (PBS/T) for 1 h at room temperature, the membrane was then probed with mouse anti-actin antibody (dilution 1:10,000; Sigma-Aldrich) or a home-made rabbit polyclonal antibody raised against the purified 72 kDa polypeptide of rat ACOX1 [33]. Following the incubation with the appropriate horseradish peroxidase (HRP)-conjugated secondary antibody (1:5000; Santa Cruz Biotechnology, Inc.), immunoreactivity was revealed by ECL (Santa Cruz Biotechnology). The membrane was first probed with the anti-ACOX1 antibody and then stripped by incubation for 30 min in stripping buffer (62.5 mM Tris-HCl, 2% SDS, 100 mM β-mercaptoethanol) before being probed with the anti-actin antibody. Image processing and analysis were obtained using a Bio-Rad-Chemidoc XRS system and the Image Lab version 4.0 software for quantitative analysis.

2.5. Enzymatic activities

To monitor peroxisomal β-oxidation, cyanide-insensitive palmitoyl-CoA oxidation enzyme activity was measured through its ability to elicit the reduction of NAD as previously described [34]. Briefly, 25 μl of BV-2 cell lysate was preincubated at 37 °C with a 450 μl mixture containing 50 mM phosphate buffer (pH 7.4), 12 mM DL-dithiothreitol (DTT), 200 μg/ml bovine serum albumin (fatty acid free), 0.2 mM β-nicotinamide adenine dinucleotide hydrate (NAD), and 1 mM potassium cyanide freshly prepared. The reaction was initiated with the addition of 50 mM palmitoyl coenzyme A lithium salt (all reagents were from Sigma-Aldrich). The reduction of NAD^+ was monitored at 37 °C by spectrophotometry at 340 nm during 20 min. The initial reaction rate was expressed in μmol/min of reduced NAD^+ and was reported to the mass of protein in mg.

Catalase enzyme assay was adapted from the method described by Ni et al. (2001) to be performed in 96-well plate [35]. Briefly, 10 μl of BV-2 cell lysate was added to 190 μl of 50 mM Tris HCl buffer (pH 7.4) containing 20 mM H_2O_2 (Sigma-Aldrich). The decrease of the absorbance was monitored at 240 nm for 2 min using Infinite M200 Pro spectrophotometer (TECAN Lyon, France). The linearity of absorbance as function of time was proportional to the breakdown of H_2O_2. The catalase activity was expressed as μmol/min/mg of protein.

2.6. Optic and electron microscopy

The content of cellular neutral lipids was evaluated by staining cells with Oil Red O (Sigma-Aldrich). A 0.5% Oil Red O solution was prepared in 100% propylene glycol by heating to 95 °C, then filtered (Whatman filter paper), left over night at room temperature and filtered again (Whatman filter paper) just before use. BV-2 cells were seeded onto cover-slips in 24-well plate (10^5 cells/well) and grown for 24 h. After 3 PBS rinses, cells were fixed in 4% paraformaldehyde for 10 min, washed with deionized water 3 times for 1 min per rinse, and stained with Oil Red O for 15 min. To remove Oil Red O excess, cells were washed with 60% propylene glycol 1 time for 1 min then with deionized water 4 times for 30 s per rinse. The cover-slips were air dried and mounted in water-based preservative medium (Dako). Cells were observed using an Axioscope A1 light microscope (Zeiss).

Transmission electron microscopy was used to visualize WT and *Acox1*-deficient BV-2 cells cultured for 24 h. For the peroxisomal localization, cells were fixed for 1 h at 4 °C in 2.5% (w/v) glutaraldehyde diluted in 0.1 M cacodylate buffer (pH 7.4), washed in 0.1 M cacodylate buffer (pH 7.4), incubated in the dark for 1 h at 21 °C in 0.05 M Tris–HCl (pH 9.0) containing diaminobenzidine (2.5 mg/ml) and H_2O_2 (10 μl/ml of a 3% solution), washed in 0.1 M cacodylate buffer (pH 7.4) for 5 min at 21 °C, post-fixed in 1% (w/v) osmium tetroxide diluted in 0.1 M cacodylate sodium buffer (pH 7.4) for 1 h at 21 °C in the dark, and rinsed in 0.1 M cacodylate buffer (pH 7.4). The preparations were then dehydrated in graded ethanol solutions and embedded in Epon resin. Ultra-thin sections were cut with an ultramicrotome, contrasted with uranyl acetate and lead citrate, and examined under an H7500 electron microscope (Hitachi, Tokyo, Japan).

Micrographs corresponding to 12 cells for each genotype, randomly taken from the grid, were analyzed by 6 different investigators in blind with a particular focus on the number of peroxisomes, mitochondria, and lipid vesicles to give a score for each feature. Statistical analysis was performed from the analytical scores. Morphometry was performed from micrographs form 12 cells using ImageJ calculation of areas after manual delineation of organelles. The mean area (± SD) was expressed in μm^2 and the maximum and minimum sizes were noted.

2.7. Fatty acid analysis

Cellular homogenates, prepared from pellets of 10^7 cells suspended in water (100 μl) and sonicated for 10 min, were added to a screw-capped vial sealed with a Teflon septum together with structural homologous internal standards (pentadecanoic and heptadecanoic acid), butylated hydroxytoluene and EDTA and flushed with argon for 10 min to remove air. Alkaline hydrolysis was allowed to proceed at

room temperature (22 °C) with magnetic stirring for 60 min in the presence of ethanolic 0.5 M potassium hydroxide solution. Fatty acids were collected by liquid to liquid extraction after correction of pH (< 3) with HCl. All metabolites were extracted in sequential liquid to liquid extraction with hexane and ethylacetate. The organic solvents were evaporated under a gentle stream of argon and converted into trimethylsilyl ethers with bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamide with 1% trimethylchlorosilane (Pierce).

Gas chromatography mass spectrometry (GC–MS) analysis was performed on a Clarus 600D (Perkin Elmer, USA). The GC was equipped with an Elite column (30 m × 0.32 mm id × 0.25 mm film; Perkin Elmer, USA) and injection was performed in splitless mode using helium (1 ml/min) as carrier gas. The temperature program was as follows: initial temperature of 80 °C was held for 1 min, followed by a linear ramp of 10 °C/min to 240 °C, 20 °C/min to 280 °C and 5 °C/min up to 290 °C, which was held for 8 min.

The mass spectrometer operates in full mass scan mode. Peak integration was performed manually, and metabolites were recognized by retention time and fragmentation patterns and quantified from total-ion count against internal standards using standard curves for the measured fatty acids.

2.8. RTqPCR analysis

Total RNA were isolated from cells and treated with DNase using the "RNeasy Mini kit" (Qiagen). After quality and quantity control by spectrophotometry, RNA (1 μg) were reverse transcribed using the "iScript cDNA synthesis kit" (Bio-Rad). The synthesized cDNA were used as a template for Real-time PCR analysis using the SYBR Green real-time PCR technology and a StepOne Plus system (Applied Biosystems) as previously described [36]. *IL-1β*, *IL-6* and *Trem2* expression was quantified relatively to the expression of the housekeeping gene *36B4* using the following primers: *IL-1β*: F, 5′-AAGGAG AACCAAGCAACGAC-3′, R, 5′-GAGATTGAGCTGTCTGCTCA-3′, *IL-6*: F, 5′-GTTCTCTGGGAAATCGTGGA-3′, R, 5′-TGTACTCCAGGTAGCTA TGG-3′, *Trem2*: F, 5′-GACCTCTCCACCAGTTTCTCC-3′, R, 5′-TACATGA CACCCTCAAGGACTG-3′, *36B4*: F, 5′-ATGGGTACAAGCGCGTCCTG-3′, R, 5′-GCCTTGACCTTTTCAGTAAG-3′.

2.9. Statistical analysis

Statistical analysis was performed using GraphPad Prism 5 software. Two-way repeated measure ANOVA followed by a Bonferronni post hoc test was used for growth curve comparison while *t*-tests were used when comparing only two groups. In all statistical tests, values of $P < 0.05$ were considered significant.

3. Results

3.1. Isolation and validation of a novel Acox1-deficient BV-2 cell line

BV-2 cells were co-transfected with 2 plasmids designed to target the first exon of the *Acox1* gene. The first plasmid was designed to produce an *Acox1*-specific sgRNA and to express the nuclease Cas9. The second plasmid was a donor plasmid containing *Acox1* homologous arms for homologous directed recombination repair (HDR) after double-strand break (Fig. 1A). The plasmid also contains floxed selection cassettes for puromycin resistance and copGFP expression as well as an external TK cassette for negative selection. Transfected cells were first submitted to puromycin selection for 19 days. At day 11, negative selection with gancyclovir was started to remove random integration events. At the end of selection, cells were clonally sorted by flow cytometry.

The genotype of the 52 obtained cell clones was first checked by PCR and revealed a successful HDR for a dozen clones (Fig. 1B). The recombination event introduces a substantial mutation in the first exon of the *Acox1* gene, sufficient to inactivate the gene. However, the presence of a second shorter band on the gel corresponding to a non-recombinant locus indicated that the HDR was only monoallelic. Sanger sequencing of the second allele in the 12 cell clones demonstrated the presence of the same single insertion at the targeted site (T insertion into the fifth codon of the coding sequence) resulting in a frame shift a few nucleotides after the initiation codon (Fig. 1C). One of the cell clones containing these two mutations, respectively due to HDR and NHEJ, was transfected with a Cre recombinase expression vector to remove the selection cassettes. The further clonal selection of the transfected cells led to isolate an *Acox1* knock out subclone whose removal of selection cassettes was confirmed by PCR (Fig. 1B, lane 4) and sequencing (Fig. 1C). At the end of each step, mutant cell clones were amplified to generate a stock of cryogenic vials at the lowest passage.

Two mutated alleles resulting from HDR and Cre recombination and from the single insertion in the beginning of the coding sequence being present, a full inactivation of the *Acox1* gene without interference with transcription was expected. RT-qPCR analysis confirmed that *Acox1* mRNA level was not modified (data not shown). The disruption of the *Acox1* gene in the mutant cell clone was confirmed by western blot analysis demonstrating the absence of ACOX1 protein (Fig. 2). The typical pattern of ACOX1 expression was observed in WT BV-2 cell lysate (one band at 72 kDa corresponding to the full-length protein (661 aa) and one shorter band at 50 kDa corresponding to a post-translationally cleaved subunit). Despite the presence of several weakly cross-reacting proteins observed both in WT and mutant cell lysate, the specific bands were clearly absent in the BV-2 mutant cell clone confirming the knockout.

To functionally validate the *Acox1*-deficient BV-2 cell clone, we monitored peroxisomal β-oxidation by measuring cyanide-insensitive palmitoyl-CoA oxidation in total cell extracts (Fig. 3A). As expected, the absence of ACOX1 protein resulted in a virtually null enzymatic activity. Since catalase, a H_2O_2-degrading enzyme, is known as the most abundant protein in peroxisomes, we measured its activity in the same extracts. *Acox1*-deficient cells displayed a 2.5-fold higher activity than control cells (Fig. 3B).

3.2. Cell morphology and growth curve of the Acox1-deficient BV-2 cell line

One of the features observed in skin fibroblasts derived from patients with a mutation in the *ACOX1* gene was striking slow-growth compared to control skin fibroblasts [21]. We thus explored whether *Acox1* knockout could trigger cellular modifications both in term of morphology and cell proliferation. Growth of *Acox1*-deficient BV-2 cells was analyzed over a period of 4 days and compared to WT BV-2 cells (Fig. 4). The number of cells was quite similar at 24 h. At 72 h, the number of WT cells was almost double of mutant cells suggesting a slower division time in mutant cells. Cells reached a plateau phase at 96 h in both cases. The mortality was almost identical between BV-2 WT cells and *Acox1*-deficient cells (data not shown).

Regarding the cell morphology, we did not observe obvious differences between WT and mutant BV-2 cells [37]. The majority of mutant cells exhibited a round shape typical of a microglial activated status (Fig. 5A–B). Less than 5% of cells showed an elongated shape with ramifications. To extend our observations, we further analyzed the *Acox1*-deficient BV-2 cells by electron microscopy using diaminobenzidine (DAB) staining, which allows cytochemical detection of peroxisomes (Fig. 5C–H). In comparison with the WT cells, we observed a statistically significant increased number of peroxisomes (1.89-fold) suggesting peroxisome proliferation and/or alteration of pexophagy mechanisms. Peroxisomal staining in mutant cells was more pronounced, which could be linked to the increased catalase activity as shown in Fig. 3B. The peroxisomal average areas were not significantly different ($0.0382\ \mu m^2 \pm 0.0030$ in WT cells ($n = 50$) vs $0.0368\ \mu m^2 \pm 0.0026$ in *Acox1*-deficient cells ($n = 68$)). No obvious change in mitochondrial shape was observed, except for the presence of

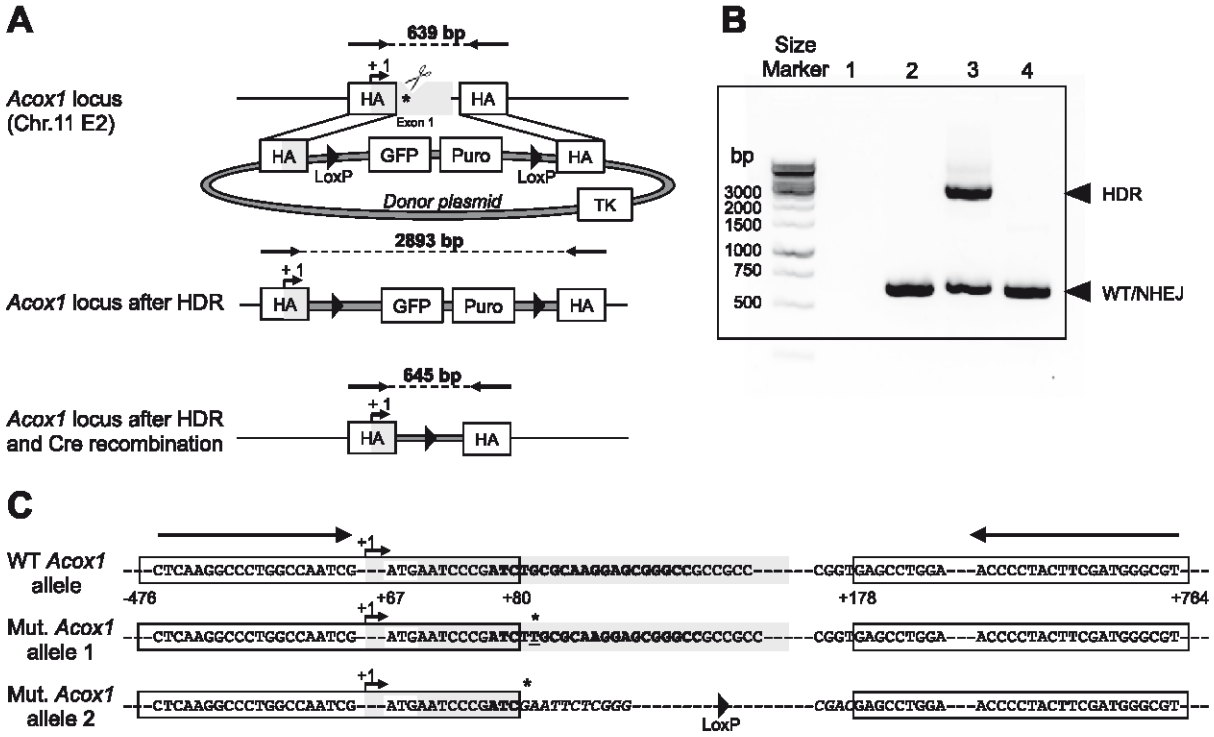


Fig. 1. CRISPR/Cas9-mediated gene knockout strategy and molecular screening in BV-2 cells. (A) Schematic representation of the *Acox1* target locus and donor plasmid allowing homology-directed repair (HDR) and representation of the locus after Cre recombination. The size of amplicons for each case is indicated. The position of primers used for PCR screening are shown by two opposite arrows (HA: homology arm; light grey box: exon 1; dark grey box: plasmid sequence; white boxes: selection cassettes (GFP: green fluorescent protein, Puro: puromycin resistance and TK: thymidine kinase expression); scissors: position of the double strand DNA break). (B) Agarose gel electrophoresis of PCR products (1: negative control; 2: WT; 3: *Acox1* mutant with monoallelic HDR-based mutation; 4: *Acox1* mutant after Cre recombination). Bands corresponding to HDR and either wild type (WT) or non-homologous end joining (NHEJ) repair are indicated. (C) Sanger sequencing results of WT and mutated *Acox1* locus (allele 1 corresponds to NHEJ and allele 2 corresponds to HDR followed by Cre recombination) and gene knockout (boxes: homology arms with annotated positions from the transcription initiation start (+1); grey highlighted sequence: *Acox1* exon 1; bold sequence: sgRNA targeted sequence; underlined sequence: inserted nucleotide; italic: plasmid sequence; *: frameshift mutation; arrows: sequencing primers).

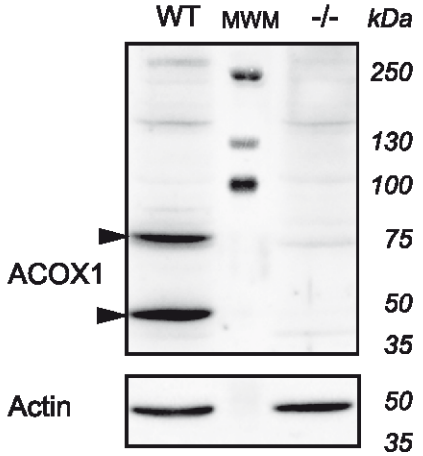


Fig. 2. Western blot analysis of ACOX1 expression in WT and *Acox1*-deficient (−/−) BV-2 cells. Proteins of whole cell lysates were separated on 7.5% SDS-PAGE, blotted on PVDF membrane and analyzed by immunoblotting with anti-ACOX1 and anti-Actin antibodies. The central lane corresponds to molecular weight markers (MWM).

elongated organelles, suggesting fission. Mitochondria areas were found significantly reduced (0.603 μm^2 ± 0.034 in WT cells (n = 133) vs 0.502 μm^2 ± 0.020 *Acox1*-deficient cells (n = 240)) and their number was significantly increased in mutant cells (1.66-fold). Control and mutant cells showed the presence of lipid droplets. Interestingly, some mutant cells seemed to present an overload of neutral lipids as suggested by the more intense Oil red O staining (Fig. 5I–J).

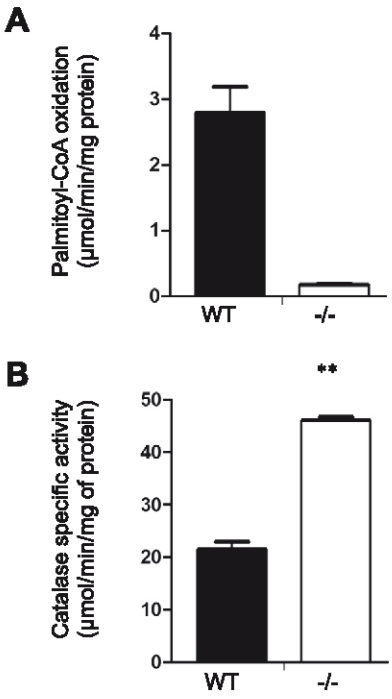


Fig. 3. Cyanide-insensitive palmitoyl-CoA oxidation (A) and catalase activity (B) in WT and *Acox1*-deficient (−/−) BV-2 cells. Data represent the mean ± SD of 4 independent experiments. Statistically significant differences determined by unpaired *t*-test analysis are indicated: ** P value ≤ 0.01.

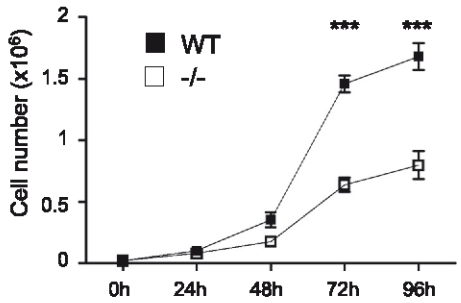


Fig. 4. Proliferation curve of WT and *Acox1*-deficient (−/−) BV-2 cells. At t0, 2×10^4 cells were seeded. Data represents mean values of 2 independent experiments (cells, from the same passage number, thawed at different dates and cultivated during 48 h) with 3 technical replicates ± SD. Statistically significant differences determined by ANOVA are indicated: *** P value ≤ 0.001.

3.3. Consequences of the absence of ACOX1 activity on fatty acid levels in the Acox1-deficient BV-2 cell line

Actually, accumulation of lipids was expected in *Acox1*-deficient cells since the absence of ACOX1 activity is supposed to yield accumulation of VLCFA. We thus conducted a lipid analysis to compare the levels of fatty acids in WT and *Acox1*-deficient BV-2 cells. As shown in Table 2, the total fatty acid levels as well as the global quantity of the main species of fatty acids analyzed (saturated, mono-unsaturated and poly-unsaturated fatty acids) did not present significant differences between mutant and control cells. However, C26:0 and C24:0 levels, which represent a very low percentage of total saturated fatty acids, were found significantly increased in the *Acox1*-deficient cells (×3.5 for C26:0 and ×1.6 for C24:0). The C26:0/C22:0 and C24:0/C22:0 ratio, which are used as diagnosis biochemical markers for peroxisomal disorders were respectively 3- and 1.4-fold higher than the control ones (Fig. 6). Monounsaturated fatty acid levels were also significantly modified. A significant increase was observed for C16:1 n-7, C20:1 n-9, C22:1 n-9, C24:1 n-9 and C26:1 n-9 levels while C18:1 n-9 levels were found decreased. Concerning polyunsaturated fatty acids, we noticed a decreased level of C20:5 n-3 and an increased level of C18:2 n-6. Docosahexaenoic acid (DHA, C22:6 n-3) and arachidonic acid (AA, C20:4 n-6) levels remained almost unchanged.

3.4. Expression of key microglial genes in the Acox1-deficient BV-2 cell line

As stated in the Introduction, microglial cells ensure an important role in brain homeostasis by controlling inflammation and participating to phagocytosis of apoptotic cells and myelin debris. As a preliminary study of the functional consequences of ACOX1 deficiency in the BV-2 cells, we investigated the mRNA levels of genes encoding interleukin-1β and 6 (IL-1β and IL-6), two major inflammatory cytokines in the brain recognized as polarization markers of microglia [38,39], and the membrane receptor called triggering receptor expressed by myeloid cells-2 (Trem2), which controls the phenotypic conversion of microglia and promotes phagocytosis [40]. Interestingly, *IL-1β* and *Trem2* expression levels were significantly increased while *IL-6* expression level was significantly decreased (Fig. 7).

4. Discussion

In this study, we used CRISPR/Cas9 technology to knock out the *Acox1* gene in BV-2 cells, a cell line commonly used as a substitute for primary microglia. Among the 52 cell clones isolated, we failed in obtaining biallelic HDR. The targeted integration into a single allele must be related to the fact that mammalian cells have a higher frequency of NHEJ events than HDR events and that we target the transcriptionally active strand. Recent studies suggest that the targeting of transcriptionally inactive strand would improve the frequency of homologous recombination [41]. Altogether, we isolated a dozen clones with monoallelic recombination and found the same single mutation in all the clones analyzed, a T nucleotide insertion resulting in a sequence frameshift. It is possible that the 12 clones derived from a single parental cell by mitotic cell division. We selected one clone for further Cre transfection to remove the selection cassette. Sorted cell clones after Cre transfection were screened by PCR and sequencing to confirm efficient Cre recombination. The *Acox1* knockout was confirmed by western blotting in one selected cell clone that was further amplified to obtain a large stock of cryogenic vials at the lowest passage. The chosen strategy facilitated the selection of knockout cells with a fluorescent reporter and antibiotics. In addition, the strategy offered the advantage of expressing Cas9 nuclease for a short duration, thus reducing the risk of off-target events, while remaining effective.

We first confirmed mutations by DNA sequencing as well as the absence of ACOX1 protein by western blotting, but it remained to validate the loss of enzymatic activity and the main biochemical characteristic of ACOX1 deficiency, i.e. VLCFA accumulation. There are indeed numerous examples of knockouts, which present no or subtle phenotype due to compensatory effects and redundant genes. In this case, possible compensation for the absence of ACOX1 by ACOX2 or ACOX3 was unlikely due to non-overlapping substrate specificities [42]. Measurement of palmitoyl-CoA oxidation demonstrated the virtual absence of enzymatic activity in *Acox1*-deficients cell extracts while catalase activity was found increased. This apparent paradox was previously reported in the liver of *Acox1*$^{-/-}$ mice [43] or after specific inhibition of ACOX1 activity in rats [44]. Actually, such an increase could be caused by a change in RedOx status as previously reported in *Acox1*$^{-/-}$ mice by the increase of hepatic H_2O_2 level [45] and since catalase expression and activity are indeed very sensitive to oxidative stress [46]. *Acox1* deficiency in mice or *Acox1* silencing in 158 N oligodendrocytes have indeed been proven to generate oxidative stress [47,48]. Epigenetic or post-transcriptional regulations may be considered as possible explanations of the increased catalase activity [46]. Given the increased number of peroxisomes and mitochondria and the decreased size of mitochondria observed in *Acox1*-defcient cells, a possible activation of PPARα would also make sense. Peroxisomes and mitochondria share very similar division and proliferation mechanisms that depend in part on PPARα activation [49]. In the *Acox1*$^{-/-}$ mice liver, a sustained activation of PPARα pathways has been observed [11,45]. The most admitted hypothesis is that one or several substrates of ACOX1 accumulate and serve as PPARα activators [50]. Among these substrates, VLCFA have been described as PPARα ligands [51,52]. The lipid analysis of *Acox1*-deficient cells confirmed the accumulation of VLCFA (C26:0, C24:0, C26:1, C24:1). Other ligands and putative activators such as PUFA and MUFA or phospholipids containing MUFA have been described [53–55]. While we noticed some modifications of the MUFA levels in *Acox1*-deficient cells, no obvious modifications of PUFA were observed in contrast to patient fibroblasts or *Acox1*$^{-/-}$ mice in which plasma levels of DHA and AA were decreased [56,57]. In our cell model, a preliminary analysis of PPARα responsive genes such as *Acox1* or *Pex11b* showed a weak induction that does not support clearly the involvement of PPARα (data not shown). Of note, PPARα–independent mechanisms of peroxisomal proliferation have previously been described [49,58,59]. The transcriptomic analysis, which is in progress, will help to confirm this hypothesis and delineate the causative pathway.

When developing a rodent cell model with the objective to study human diseases, it is always important to ensure that the main markers of the disease are found. Here, we can argue that the variations in saturated and monounsaturated VLCFA levels observed in BV-2 mutant cells are in the low range but of the same order as those observed in skin fibroblasts and plasma of patients with ACOX1 deficiency [16,60,61]. Moreover, the observed modifications of lipid droplet distribution in the mutant cells is consistent with what was observed in the liver of

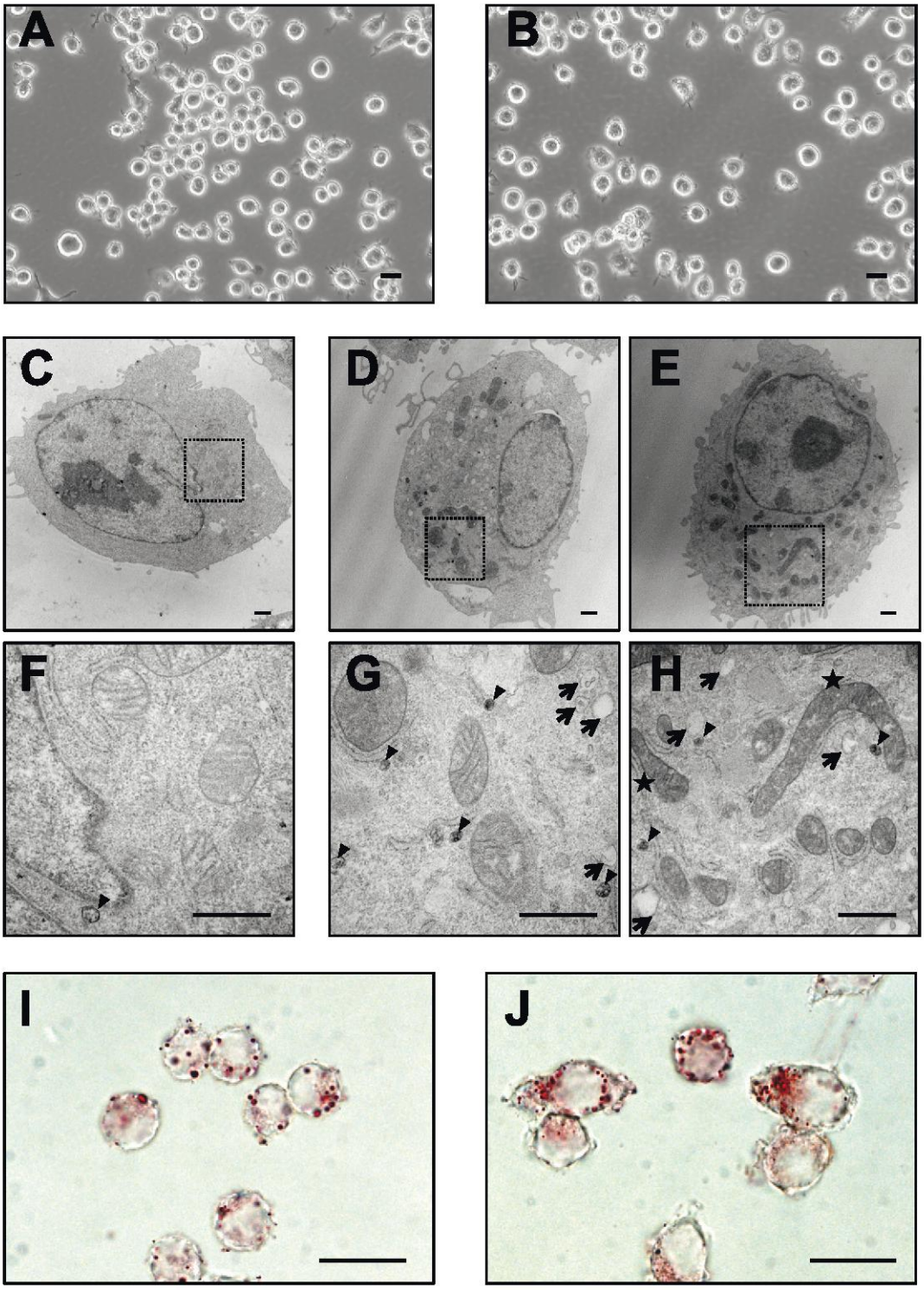


Fig. 5. Cell morphology analysis. Phase contrast micrographs of WT (A) and *Acox1*-deficient (B) BV-2 cells showing a majority of round shaped cells and a minority of elongated ramified cells without obvious differences between both genotypes (bar = 20 μm). Transmission electron micrographs (whole cell and respective higher magnification) of WT (C, F) and *Acox1*-deficient (D, G and E, H) BV-2 cells (bar = 2 μm). Peroxisomes and lipid droplets are indicated (arrowheads and short arrows respectively). Mitochondria with elongated shape evoking fission process are indicated by stars. Light microscopic images of Oil Red O staining in WT (I) and *Acox1*-deficient (J) BV-2 cells (bar = 20 μm).

patients with ACOX1 defect and *Acox1*$^{-/-}$ mice [56]. Accumulation of neutral lipids, mainly cholesteryl-esters, seems to represent a hallmark of peroxisomal biogenesis disorders or single peroxisomal gene defects such as ACOX1 deficiency or X-linked adrenoleukodystrophy. Oil red O staining in *Acox1*-deficient BV-2 cells suggests such accumulation. Of note, similar results had been obtained in 158 N oligodendrocytes upon *Acox1* silencing [48]. Further in-depth analysis of lipid content in the *Acox1*-deficient cells will permit to precise the nature of the accumulated lipids and establish whether the peroxisomal defect has also consequences on membrane lipids. It is tempting to speculate that membrane modifications of these microglial cells may disrupt their phagocytosis capacity and antigenic presentation function. Moreover,

Table 2
Fatty acid levels in WT and *Acox1*-deficient BV-2 cells cultivated during 48 h.

	WT		ACOX1 −/−		P value	*t*-test
	Mean	SD	Mean	SD		
C16:0	17,716	2,255	19,242	1,087	0.350	NS
C18:0	9,925	1,426	9,166	797	0.466	NS
C20:0	91.1	17.6	104	14.5	0.399	NS
C22:0	28.9	5.68	32.7	5.61	0.455	NS
C24:0	62.0	6.26	98.4	14.7	0.017	*
C26:0	11.6	3.68	40.6	3.44	0.001	***
SFA	27,834	36,834	28,684	1,598	0.733	NS
C16:1 n-7 trans	1,637	412	400	80.3	0.007	**
C16:1 n-7 cis	5,468	549	8,627	698	0.004	**
C18:1 n-9	24,135	2,902	17,776	1,677	0.03	*
C18:1 n-7	11,012	860	12,449	1,233	0.173	NS
C20:1 n-9	330	22.4	874	41.5	0	***
C22:1 n-9	41.5	4.97	60.7	5.89	0.013	*
C24:1 n-9	58.0	7.50	91.2	14.9	0.026	*
C26:1 n-9	15.4	2.40	30.7	4.25	0.006	**
MUFA	42,695	4,162	40,308	3,622	0.495	NS
C18:2 n-6	778	147	1,255	251	0.047	*
C20:3 n-6	742	92.8	704	27.8	0.529	NS
C20:4 n-6	2,258	275	2,586	199	0.169	NS
C20:5 n-3	1,478	160	465	61.2	0.001	***
C22:6 n-3	1,579	129	1,295	150	0.068	NS
PUFA	6,836	778	6,304	630	0.41	NS
Total FA	77,365	8,552	75,296	5,753	0.75	NS

Data represent mean levels of fatty acids (saturated (SFA), monounsaturated (MUFA), and polyunsaturated (PUFA)) measured by GC/MS and expressed in ng/mg of protein of 3 independent experiments with their respective standard deviation (SD).
Significant differences at P ≤ 0.001***, P ≤ 0.01**, P ≤ 0.05* determined by unpaired *t*-test analysis are indicated. NS, not significant.

because of the role of microglia in brain homeostasis and inflammation control, further lipid analysis should also focus on signaling molecules of lipid origin secreted by microglial cells, i.e. docosanoid and eicosanoids fatty acid derivatives, which are tightly connected to peroxisomal metabolism [62].

The absence of peroxisome proliferation in human fibroblasts [21] represents a discrepancy with our results but the absence of PPARα response to peroxisome proliferators in human skin fibroblasts may explain this observation [58]. Moreover, enlarged peroxisomes were observed in human liver [63] while we found almost no change in size in the present study. Further analysis is needed to clarify this point which is probably associated with tissue or species differences. Noteworthy, even in a same tissue, i.e. the liver, peroxisomal proliferation as well as the peroxisomal size was found to vary with the age of *Acox1*$^{-/-}$ mice [45].

Very interestingly, in the absence of any stimuli, we found that the expression levels of genes expressing the proinflammatory cytokines (IL-1β and IL-6) and the cell surface protein Trem2 which controls microglial polarization and inflammatory response, are modified in *Acox1*-deficient cells. Induction of *IL-1β* and *IL-6* was described in BV-2 cells upon LPS stimulation [64]. The observed induction of *IL-1β* and the repression of *IL-6* is unusual and suggests that the peroxisomal defect triggered a singular activated state. Further experiments will be needed to extend these observations and confirm this particular activated state as well as a possible modification of the phagocytic ability of these cells. The induction of *Trem2*, whose positive role in phagocytosis is well established [40], indeed suggests that *Acox1*-deficiency may modify the phagocytosis ability.

5. Conclusion

In summary, by using CRISPR/Cas9 editing, we have generated an *Acox1*-deficient microglial cell line whose preliminary characterization confirms the main biochemical observations made in *Acox1*$^{-/-}$ mice

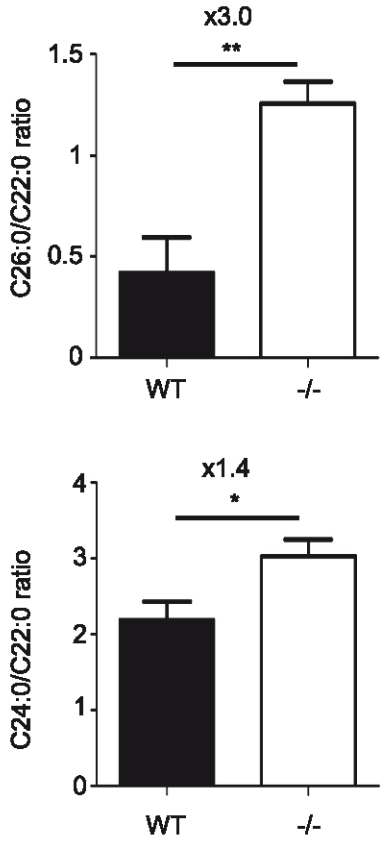


Fig. 6. Relative VLCFA levels in WT and *Acox1*-deficient (−/−) BV-2 cells. The concentrations of the VLCFA species C26:0, C24:0 and C22:0 were determined by GC/MS from WT and mutant BV-2 cells cultivated during 48 h. Data represent the mean ratios (C26:0/C22:0 and C24:0/C22:0) of 3 independent experiments with their respective standard deviation. Fold increase in *Acox1*-deficient BV-2 cells compared to WT is indicated. Statistically significant differences determined by unpaired *t*-test analysis are indicated: ** P value ≤ 0.01, * P value ≤ 0.05.

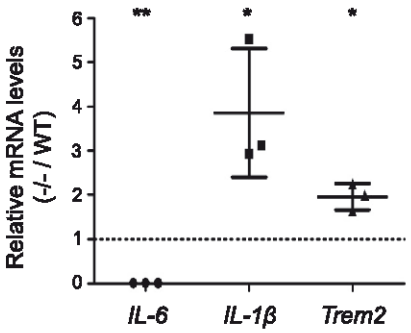


Fig. 7. Relative mRNA levels of key microglial genes in *Acox1*-deficient (−/−) BV-2 cells. Expression levels of genes encoding the inflammatory cytokines (IL-6 and IL-1β) and the phagocytic and immune receptor Trem2 were measured using real time RT-qPCR and normalized to *36B4*. Data represent the mean values ± SD of 3 experiments and are expressed as relative expression levels in comparison with the corresponding expression level in WT cells taken arbitrary equal to 1. Statistically significant differences determined by unpaired *t*-test analysis are indicated: ** P value ≤ 0.01, * P value ≤ 0.05.

models and skin fibroblasts of patients, i.e. the accumulation of VLCFA. The preliminary study of the mutant cells revealed subcellular modifications in peroxisomes and mitochondria and modifications of the expression of key microglial genes, which let suppose that peroxisomal defect triggers profound changes in microglial functions.

Transcriptomic RNAseq analysis is in progress to confirm these observations and reveal putative other dysregulated genes involved in RedOx homeostasis and inflammatory responses. This novel cell model will offer the advantage to test the impact of ACOX1 deficiency in a key cell type for neurodegenerative process and to test original hypotheses on the involvement of peroxisome in phagocytosis, inflammatory and immune response. Microglial mutant cells will offer opportunities to further progress in the understanding of the physiopathogenesis of peroxisomal leukodystrophies.

Transparency document

The Transparency document associated with this article can be found, in online version.

Acknowledgments

This work was supported by the Ministère de l'Education Nationale, de l'Enseignement Superieur et de la Recherche (France) and by institutional grants from Inserm, CNRS and Aix-Marseille University to the CIML. Quentin Raas received a fellowship from ARSEP (Association for Research on Multiple Sclerosis). Fatima Saih received a fellowship "Action Intégrée of the Comité Mixte Inter-universitaire Franco-Marocain" (CMIFM, AIMA/14/310, Campus France N° 30293PA) from the PHC Toubkal program, Ministère des Affaires Etrangères. We thank the DImaCell platform for technical assistance in TEM (Microscopy Centre INRA/UB) and the cytometry platform of Dijon for cell sorting (INSERM/UB). We acknowledge the PICSL imaging facility of the CIML (ImagImm), member of the national infrastructure France-BioImaging supported by the French National Research Agency (ANR-10-INBS-04). We thank Myriam Baes for providing us the Cre expression vector as well as Hai Tao He and Didier Marguet for hosting Quentin Raas for a few months at CIML.

References

[1] J. Vamecq, M. Cherkaoui-Malki, P. Andreoletti, N. Latruffe, The human peroxisome in health and disease: the story of an oddity becoming a vital organelle, Biochimie 98 (2014) 4–15.
[2] R.J. Wanders, H.R. Waterham, Biochemistry of mammalian peroxisomes revisited, Annu. Rev. Biochem. 75 (2006) 295–332.
[3] E. Baumgart, J.C. Vanhooren, M. Fransen, P. Marynen, M. Puype, J. Vandekerckhove, J.A. Leunissen, H.D. Fahimi, G.P. Mannaerts, P.P. van Veldhoven, Molecular characterization of the human peroxisomal branched-chain acyl-CoA oxidase: cDNA cloning, chromosomal assignment, tissue distribution, and evidence for the absence of the protein in Zellweger syndrome, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 93 (1996) 13748–13753.
[4] S. Ferdinandusse, S. Denis, C.W.T. van Roermund, M.A. Preece, J. Koster, M.S. Ebberink, H.R. Waterham, R.J.A. Wanders, A novel case of ACOX2 deficiency leads to recognition of a third human peroxisomal acyl-CoA oxidase, Biochim. Biophys. Acta 1864 (2018) 952–958.
[5] L. Schepers, P.P. Van Veldhoven, M. Casteels, H.J. Eyssen, G.P. Mannaerts, Presence of three acyl-CoA oxidases in rat liver peroxisomes. An inducible fatty acyl-CoA oxidase, a noninducible fatty acyl-CoA oxidase, and a noninducible trihydroxycoprostanoyl-CoA oxidase, J. Biol. Chem. 265 (1990) 5242–5246.
[6] T. Aoyama, I. Ueno, T. Kamijo, T. Hashimoto, Rat very-long-chain acyl-CoA dehydrogenase, a novel mitochondrial acyl-CoA dehydrogenase gene product, is a rate-limiting enzyme in long-chain fatty acid beta-oxidation system. cDNA and deduced amino acid sequence and distinct specificities of the cDNA-expressed protein, J. Biol. Chem. 269 (1994) 19088–19094.
[7] B. Fournier, J.M. Saudubray, B. Benichou, S. Lyonnet, A. Munnich, H. Clevers, B.T. Poll-The, Large deletion of the peroxisomal acyl-CoA oxidase gene in pseudoneonatal adrenoleukodystrophy, J. Clin. Invest. 94 (1994) 526–531.
[8] C. Nohammer, Y. El-Shabrawi, S. Schauer, M. Hiden, J. Berger, S. Forss-Petter, E. Winter, R. Eferl, R. Zechner, G. Hoefler, cDNA cloning and analysis of tissue-specific expression of mouse peroxisomal straight-chain acyl-CoA oxidase, Eur. J. Biochem. 267 (2000) 1254–1260.
[9] U. Varanasi, R. Chu, S. Chu, R. Espinosa, M.M. LeBeau, J.K. Reddy, Isolation of the human peroxisomal acyl-CoA oxidase gene: organization, promoter analysis, and chromosomal localization, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 91 (1994) 3107–3111.
[10] D. Oaxaca-Castillo, P. Andreoletti, A. Vluggens, S. Yu, P.P. van Veldhoven, J.K. Reddy, M. Cherkaoui-Malki, Biochemical characterization of two functional human liver acyl-CoA oxidase isoforms 1a and 1b encoded by a single gene, Biochem. Biophys. Res. Commun. 360 (2007) 314–319.
[11] C.Y. Fan, J. Pan, R. Chu, D. Lee, K.D. Kluckman, N. Usuda, I. Singh, A.V. Yeldandi, M.S. Rao, N. Maeda, J.K. Reddy, Hepatocellular and hepatic peroxisomal alterations in mice with a disrupted peroxisomal fatty acyl-coenzyme A oxidase gene, J. Biol. Chem. 271 (1996) 24698–24710.
[12] S. Farioli-Vecchioli, S. Moreno, M.P. Ceru, Immunocytochemical localization of acyl-CoA oxidase in the rat central nervous system, J. Neurocytol. 30 (2001) 21–33.
[13] F. Fouquet, J.M. Zhou, E. Ralston, K. Murray, F. Troalen, E. Magal, O. Robain, M. Dubois-Dalcq, P. Aubourg, Expression of the adrenoleukodystrophy protein in the human and mouse central nervous system, Neurobiol. Dis. 3 (1997) 271–285.
[14] B.T. Poll-The, F. Roels, H. Ogier, J. Scotto, J. Vamecq, R.B. Schutgens, R.J. Wanders, C.W. van Roermund, M.J. van Wijland, A.W. Schram, et al., A new peroxisomal disorder with enlarged peroxisomes and a specific deficiency of acyl-CoA oxidase (pseudo-neonatal adrenoleukodystrophy), Am. J. Hum. Genet. 42 (1988) 422–434.
[15] Y. Suzuki, N. Shimozawa, S. Yajima, S. Tomatsu, N. Kondo, Y. Nakada, S. Akaboshi, M. Lai, Y. Tanabe, T. Hashimoto, et al., Novel subtype of peroxisomal acyl-CoA oxidase deficiency and bifunctional enzyme deficiency with detectable enzyme protein: identification by means of complementation analysis, Am. J. Hum. Genet. 54 (1994) 36–43.
[16] S. Ferdinandusse, S. Denis, E.M. Hogenhout, J. Koster, C.W. van Roermund, I.J. L, A.B. Moser, R.J. Wanders, H.R. Waterham, Clinical, biochemical, and mutational spectrum of peroxisomal acyl-coenzyme A oxidase deficiency, Hum. Mutat. 28 (2007) 904–912.
[17] R.Y. Wang, E.S. Monuki, J. Powers, P.H. Schwartz, P.A. Watkins, Y. Shi, A. Moser, D.A. Shrier, H.R. Waterham, D.J. Nugent, J.E. Abdenur, Effects of hematopoietic stem cell transplantation on acyl-CoA oxidase deficiency: a sibling comparison study, J. Inherit. Metab. Dis. 37 (2014) 791–799.
[18] C. Van den Branden, J. Leeman, G. Dacremont, R. Collumbien, F. Roels, Experimental inhibition of peroxisomal beta-oxidation in rats: influence on brain myelination, Glia 3 (1990) 458–463.
[19] P.A. Watkins, M.C. McGuinness, G.V. Raymond, B.A. Hicks, J.M. Sisk, A.B. Moser, H.W. Moser, Distinction between peroxisomal bifunctional enzyme and acyl-CoA oxidase deficiencies, Ann. Neurol. 38 (1995) 472–477.
[20] R.J. Wanders, A. Schelen, N. Feller, R.B. Schutgens, F. Stellaard, C. Jakobs, B. Mitulla, G. Seidlitz, First prenatal diagnosis of acyl-CoA oxidase deficiency, J. Inherit. Metab. Dis. 13 (1990) 371–374.
[21] H.I. El Hajj, A. Vluggens, P. Andreoletti, K. Ragot, S. Mandard, S. Kersten, H.R. Waterham, G. Lizard, R.J. Wanders, J.K. Reddy, M. Cherkaoui-Malki, The inflammatory response in acyl-CoA oxidase 1 deficiency (pseudoneonatal adrenoleukodystrophy), Endocrinology 153 (2012) 2568–2575.
[22] A. Bottelbergs, S. Verheijden, L. Hulshagen, D.H. Gutmann, S. Goebbels, K.A. Nave, C. Kassmann, M. Baes, Axonal integrity in the absence of functional peroxisomes from projection neurons and astrocytes, Glia 58 (2010) 1532–1543.
[23] L. Hulshagen, O. Krysko, A. Bottelbergs, S. Huyghe, R. Klein, P.P. Van Veldhoven, P.P. De Deyn, R. D'Hooge, D. Hartmann, M. Baes, Absence of functional peroxisomes from mouse CNS causes dysmyelination and axon degeneration, J. Neurosci. 28 (2008) 4015–4027.
[24] C.M. Kassmann, C. Lappe-Siefke, M. Baes, B. Brugger, A. Mildner, H.B. Werner, O. Natt, T. Michaelis, M. Prinz, J. Frahm, K.A. Nave, Axonal loss and neuroinflammation caused by peroxisome-deficient oligodendrocytes, Nat. Genet. 39 (2007) 969–976.
[25] Y. Gong, N. Sasidharan, F. Laheji, M. Frosch, P. Musolino, R. Tanzi, D.Y. Kim, A. Biffi, J. El Khoury, F. Eichler, Microglial dysfunction as a key pathological change in adrenomyeloneuropathy, Ann. Neurol. 82 (2017) 813–827.
[26] F.S. Eichler, J.Q. Ren, M. Cossoy, A.M. Rietsch, S. Nagpal, A.B. Moser, M.P. Frosch, R.M. Ransohoff, Is microglial apoptosis an early pathogenic change in cerebral X-linked adrenoleukodystrophy? Ann. Neurol. 63 (2008) 729–742.
[27] M. Kocur, R. Schneider, A.K. Pulm, J. Bauer, S. Kropp, M. Gliem, J. Ingwersen, N. Goebels, J. Alferink, T. Prozorovski, O. Aktas, S. Scheu, IFNbeta secreted by microglia mediates clearance of myelin debris in CNS autoimmunity, Acta Neuropathol. Commun. 3 (2015) 20.
[28] M. Jinek, K. Chylinski, I. Fonfara, M. Hauer, J.A. Doudna, E. Charpentier, A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity, Science 337 (2012) 816–821.
[29] E. Blasi, R. Barluzzi, V. Bocchini, R. Mazzolla, F. Bistoni, Immortalization of murine microglial cells by a v-raf/v-myc carrying retrovirus, J. Neuroimmunol. 27 (1990) 229–237.
[30] A. Henn, S. Lund, M. Hedtjarn, A. Schrattenholz, P. Porzgen, M. Leist, The suitability of BV2 cells as alternative model system for primary microglia cultures or for animal experiments examining brain inflammation, ALTEX 26 (2009) 83–94.
[31] V. Bocchini, R. Mazzolla, R. Barluzzi, E. Blasi, P. Sick, H. Kettenmann, An immortalized cell line expresses properties of activated microglial cells, J. Neurosci. Res. 31 (1992) 616–621.
[32] V. Pattanayak, S. Lin, J.P. Guilinger, E. Ma, J.A. Doudna, D.R. Liu, High-throughput profiling of off-target DNA cleavage reveals RNA-programmed Cas9 nuclease specificity, Nat. Biotechnol. 31 (2013) 839–843.
[33] Z. El Kebbaj, P. Andreoletti, D. Mountassif, M. Kabine, H. Schohn, M. Dauca, N. Latruffe, M.S. El Kebbaj, M. Cherkaoui-Malki, Differential regulation of peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)-alpha1 and truncated PPARalpha2 as an adaptive response to fasting in the control of hepatic peroxisomal fatty acid beta-oxidation in the hibernating mammal, Endocrinology 150 (2009) 1192–1201.
[34] P.B. Lazarow, C. De Duve, A fatty acyl-CoA oxidizing system in rat liver peroxisomes; enhancement by clofibrate, a hypolipidemic drug, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 73 (1976) 2043–2046.
[35] J. Ni, S. Tokuyama, A. Sogabe, Y. Kawamura, Y. Tahara, Cloning and high expression of catalase gene from bacillus sp. TE124, J. Biosci. Bioeng. 91 (2001) 422–424.
[36] C. Gondcaille, E.C. Genin, T.E. Lopez, A.M. Dias, F. Geillon, P. Andreoletti,

M. Cherkaoui-Malki, T. Nury, G. Lizard, I. Weinhofer, J. Berger, E.T. Kase, D. Trompier, S. Savary, LXR antagonists induce ABCD2 expression, Biochim. Biophys. Acta 1841 (2014) 259–266.
[37] M.A. Laurenzi, C. Arcuri, R. Rossi, P. Marconi, V. Bocchini, Effects of microenvironment on morphology and function of the microglial cell line BV-2, Neurochem. Res. 26 (2001) 1209–1216.
[38] X. Liu, N. Quan, Microglia and CNS Interleukin-1: beyond immunological concepts, Front. Neurol. 9 (2018) 8.
[39] M. Erta, A. Quintana, J. Hidalgo, Interleukin-6, a major cytokine in the central nervous system, Int. J. Biol. Sci. 8 (2012) 1254–1266.
[40] T.R. Jay, V.E. von Saucken, G.E. Landreth, TREM2 in neurodegenerative diseases, Mol. Neurodegener. 12 (2017) 56.
[41] F. Song, K. Stieger, Optimizing the DNA donor template for homology-directed repair of double-strand breaks, Mol. Ther.–Nucleic Acids 7 (2017) 53–60.
[42] P.P. Van Veldhoven, Biochemistry and genetics of inherited disorders of peroxisomal fatty acid metabolism, J. Lipid Res. 51 (2010) 2863–2895.
[43] R. Chu, H. Lim, L. Brumfield, H. Liu, C. Herring, P. Ulintz, J.K. Reddy, M. Davison, Protein profiling of mouse livers with peroxisome proliferator-activated receptor alpha activation, Mol. Cell. Biol. 24 (2004) 6288–6297.
[44] J. Zeng, S. Deng, Y. Wang, P. Li, L. Tang, Y. Pang, Specific inhibition of acyl-CoA oxidase-1 by an acetylenic acid improves hepatic lipid and reactive oxygen species (ROS) metabolism in rats fed a high fat diet, J. Biol. Chem. 292 (2017) 3800–3809.
[45] C.Y. Fan, J. Pan, N. Usuda, A.V. Yeldandi, M.S. Rao, J.K. Reddy, Steatohepatitis, spontaneous peroxisome proliferation and liver tumors in mice lacking peroxisomal fatty acyl-CoA oxidase. Implications for peroxisome proliferator-activated receptor alpha natural ligand metabolism, J. Biol. Chem. 273 (1998) 15639–15645.
[46] C. Glorieux, M. Zamocky, J.M. Sandoval, J. Verrax, P.B. Calderon, Regulation of catalase expression in healthy and cancerous cells, Free Radic. Biol. Med. 87 (2015) 84–97.
[47] J. Huang, N. Viswakarma, S. Yu, Y. Jia, L. Bai, A. Vluggens, M. Cherkaoui-Malki, M. Khan, I. Singh, G. Yang, M.S. Rao, J. Borensztajn, J.K. Reddy, Progressive endoplasmic reticulum stress contributes to hepatocarcinogenesis in fatty acyl-CoA oxidase 1-deficient mice, Am. J. Pathol. 179 (2011) 703–713.
[48] M. Baarine, P. Andreoletti, A. Athias, T. Nury, A. Zarrouk, K. Ragot, A. Vejux, J.M. Riedinger, Z. Kattan, G. Bessede, D. Trompier, S. Savary, M. Cherkaoui-Malki, G. Lizard, 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 (2012) 1–18.
[49] M. Schrader, J.L. Costello, L.F. Godinho, A.S. Azadi, M. Islinger, Proliferation and fission of peroxisomes - an update, Biochim. Biophys. Acta 1863 (2016) 971–983.
[50] J. Huang, Y. Jia, T. Fu, N. Viswakarma, L. Bai, M.S. Rao, Y. Zhu, J. Borensztajn, J.K. Reddy, Sustained activation of PPARalpha by endogenous ligands increases hepatic fatty acid oxidation and prevents obesity in ob/ob mice, FASEB J. 26 (2012) 628–638.
[51] H.A. Hostetler, A.B. Kier, F. Schroeder, Very-long-chain and branched-chain fatty acyl-CoAs are high affinity ligands for the peroxisome proliferator-activated receptor alpha, PPARalpha, Biochemistry 45 (2006) 7669–7681.
[52] H.A. Hostetler, A.D. Petrescu, A.B. Kier, F. Schroeder, Peroxisome proliferator-activated receptor alpha interacts with high affinity and is conformationally responsive to endogenous ligands, J. Biol. Chem. 280 (2005) 18667–18682.
[53] B. Grygiel-Gorniak, Peroxisome proliferator-activated receptors and their ligands: nutritional and clinical implications - a review, Nutr. J. 13 (2014) 17.
[54] H. Yokoi, H. Mizukami, A. Nagatsu, H. Tanabe, M. Inoue, Hydroxy monounsaturated fatty acids as agonists for peroxisome proliferator-activated receptors, Biol. Pharm. Bull. 33 (2010) 854–861.
[55] M.V. Chakravarthy, I.J. Lodhi, L. Yin, R.R. Malapaka, H.E. Xu, J. Turk, C.F. Semenkovich, Identification of a physiologically relevant endogenous ligand for PPARalpha in liver, Cell 138 (2009) 476–488.
[56] A. Vluggens, P. Andreoletti, N. Viswakarma, Y. Jia, K. Matsumoto, W. Kulik, M. Khan, J. Huang, D. Guo, S. Yu, J. Sarkar, I. Singh, M.S. Rao, R.J. Wanders, J.K. Reddy, M. Cherkaoui-Malki, Reversal of mouse Acyl-CoA oxidase 1 (ACOX1) null phenotype by human ACOX1b isoform, Lab. Investig. 90 (2010) 696–708.
[57] Y. Abe, M. Honsho, H. Nakanishi, R. Taguchi, Y. Fujiki, Very-long-chain polyunsaturated fatty acids accumulate in phosphatidylcholine of fibroblasts from patients with Zellweger syndrome and acyl-CoA oxidase1 deficiency, Biochim. Biophys. Acta 1841 (2014) 610–619.
[58] C. Gondcaille, M. Depreter, S. Fourcade, M. Lecca, S. Leclercq, P. Martin, T. Pineau, F. Cadepond, M. El-etr, N. Bertrand, A. Beley, S. Duclos, D. De Craemer, F. Roels, S. Savary, M. Bugaut, Phenylbutyrate up-regulates the adrenoleukodystrophy-related gene as a nonclassical peroxisome proliferator, J. Cell Biol. 169 (2005) 93–104.
[59] A. Bagattin, L. Hugendubler, E. Mueller, Transcriptional coactivator PGC-1alpha promotes peroxisomal remodeling and biogenesis, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 107 (2010) 20376–20381.
[60] R. Carrozzo, C. Bellini, S. Lucioli, F. Deodato, D. Cassandrini, M. Cassanello, U. Caruso, C. Rizzo, T. Rizza, M.L. Napolitano, R.J. Wanders, C. Jakobs, C. Bruno, F.M. Santorelli, C. Dionisi-Vici, E. Bonioli, Peroxisomal acyl-CoA-oxidase deficiency: two new cases, Am. J. Med. Genet. A 146A (2008) 1676–1681.
[61] S. Ferdinandusse, S. Barker, K. Lachlan, M. Duran, H.R. Waterham, R.J. Wanders, S. Hammans, Adult peroxisomal acyl-coenzyme A oxidase deficiency with cerebellar and brainstem atrophy, J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry 81 (2010) 310–312.
[62] M. Matsuo, Y. Hamasaki, F. Fujiyama, S. Miyazaki, Eicosanoids are produced by microglia, not by astrocytes, in rat glial cell cultures, Brain Res. 685 (1995) 201–204.
[63] I. Kerckaert, D. De Craemer, G. Van Limbergen, Practical guide for morphometry of human peroxisomes on electron micrographs, J. Inherit. Metab. Dis. 18 (Suppl. 1) (1995) 172–180.
[64] Y. Qin, X. Sun, X. Shao, M.X. Hu, J. Feng, Z. Chen, J. Sun, Z. Zhou, Y. Duan, C. Cheng, Lipopolysaccharide preconditioning induces an anti-inflammatory phenotype in BV2 microglia, Cell. Mol. Neurobiol. 36 (2016) 1269–1277.

I.3. CRISPR/Cas9-mediated knockout of *Abcd1* and *Abcd2* genes in BV-2 cells: novel microglial models for X-linked Adrenoleukodystrophy

Cet article présente la seconde stratégie d'édition génique par CRISPR-Cas9 et l'obtention de 3 clones simple ou double déficient pour ABCD1 et ABCD2. Comme suspecté, seule l'absence combinée des 2 transporteurs se traduit par une accumulation d'AGTLC. Les analyses ultra-structurales mettent en évidence des inclusions lipidiques ressemblant à celles observées dans les macrophages des lésions cérébrales de patients X-ALD. Ces observations sont certainement imputables aux accumulations de lipides neutres et de cholestérol mesurées dans ces cellules. La surexpression des gènes *Trem2* et *Mrc1* dans ces cellules suggère une altération de la réponse immunitaire. Les niveaux d'expression de plusieurs gènes suspectés d'être modificateurs (*Acsbg1*, *Elovl7*, *Cd1d1*) sont également modifiés dans ces cellules mettant en évidence l'intérêt d'étudier ces gènes dans l'X-ALD et le potentiel des modèles cellulaires pour la découverte de nouvelles cibles thérapeutiques.

Article soumis et mis en forme de façon provisoire

Soumis à BBA Molecular and Cell Biology of Lipids

CRISPR/Cas9-mediated knockout of Abcd1 and Abcd2 genes in BV-2 cells: novel microglial models for X-linked Adrenoleukodystrophy

Q. Raas[a], C. Gondcaille[a], Y. Hamon[b], V. Leoni[c], C. Caccia[d], F. Ménétrier[e], G. Lizard[a,f], D. Trompier[a], S. Savary[a,*]

[a] *Laboratoire Bio-PeroxIL EA7270, University of Bourgogne Franche-Comté, Dijon, France*
[b] *Aix Marseille Univ, CNRS, INSERM, CIML, Centre d'Immunologie de Marseille-Luminy, Marseille, Franc,*
[c] *Laboratory of Clinical Chemistry, Hospital of Varese, ASST-Settelaghi, Milan, Italy*
[d] *Laboratory of Medical Genetics and Neurogenetics, Foundation IRCCS Istituto Neurologico Carlo Besta, Milan, Italy*
[e] *Centre des Sciences du Goût et de l'Alimentation, AgroSup Dijon, UMR6265/UMRA1324, CNRS, INRA, University of Bourgogne Franche-Comté, Dijon, France*
[f] *INSERM, Dijon, France*

ARTICLE INFO

Keywords:
Adrenoleukodystrophy
Peroxisome
Microglia
ABC transporters
VLCFA

ABSTRACT

X-linked adrenoleukodystrophy (X-ALD), the most frequent peroxisomal disorder, is associated with mutation in the *ABCD1* gene which encodes a peroxisomal ATP-binding cassette transporter for very long-chain fatty acids (VLCFA). The biochemical hallmark of the disease is the accumulation of VLCFA. Peroxisomal defect in microglia being now considered a priming event in the pathology, we have therefore generated murine microglial cells mutated in the *Abcd1* gene and its closest homolog, the *Abcd2* gene. Using CRISPR/Cas9 gene editing strategy, we obtained 3 cell clones with a single or double deficiency. As expected, only the combined absence of ABCD1 and ABCD2 proteins resulted in the accumulation of VLCFA. Ultrastructural analysis by electron microscopy revealed in the double mutant cells the presence of lipid inclusions similar to those observed in brain macrophages of patients. These observations are likely related to the increased level of cholesterol and the accumulation of neutral lipids that we noticed in mutant cells. A preliminary characterization of the impact of peroxisomal defects on the expression of key microglial genes such as *Trem2* suggests profound changes in microglial functions related to inflammation and phagocytosis. The expression levels of presumed modifier genes have also been found modified in mutant cells, making these novel cell lines relevant for use as in vitro models to better understand the physiopathogenesis of X-ALD and to discover new therapeutic targets.

1. Introduction

X-linked adrenoleukodystrophy (X-ALD) is a neurodegenerative disorder caused by mutations in the *ABCD1* gene which encodes a peroxisomal ATP binding cassette (ABC) transporter [1] X-ALD is biochemically characterized by increased levels of saturated and monounsaturated straight chain very long-chain fatty acids (VLCFA) in brain, adrenal glands, and plasma. The disease presents two main clinical forms: the severe cerebral inflammatory form (cALD) mainly associated with childhood, and a less severe and slowly progressive adult form called adrenomyeloneuropathy (AMN). No correlation was found between mutations in the *ABCD1* gene and clinical forms of X-ALD suggesting the existence of modifier genes and/or environmental priming events related to inflammation. Thus, there is growing interest on the role of microglia, the resident immune cells of the central nervous system (CNS), in the pathogenesis of X-ALD. Constantly surveying their environment, these self-renewing and highly dynamic cells play a crucial role in the maintenance of the brain homeostasis [3]. Microglia responds to a broad range of environmental signals and this activation is often accompanied by morphologic and metabolic changes. Histological studies of X-ALD inflammatory lesions have highlighted reactive microgliosis with little involvement of lymphocyte infiltrates. Aberrant activation of microglia was suggested to be a consequence of the VLCFA accumulation with microglial cells undergoing apoptosis in the perilesional white matter [4]. Hematopoietic stem-cell transplantation (with or without gene correction) is currently the only effective therapy for cALD [5]. By replacing defective microglial cells and restoring their metabolic function in the CNS, non-mutant myeloid cells are thought to alleviate the neuroinflammatory response. More recently, microglia has been shown to contribute to the non-inflammatory lesion in the spinal cord of X-ALD patient, in link with a dysregulation of their phagocytosis function [6]. Microglia is therefore

Abbreviations: ABC, ATP-binding cassette; ACOX1, acyl-CoA oxidase 1; AMN, adrenomyeloneuropathy; cALD, cerebral adrenoleukodystrophy; CNS, central nervous system; CRISPR, clustered regularly interspaced short palindromic repeat; DAB, diaminobenzidine; FBS, fetal bovine serum; GC-MS, gas chromatography mass spectrometry; HDR, homologous directed repair; L/VLCFA, long/very long-chain fatty acids; MUFA, monounsaturated fatty acids; NHEJ, non-homologous end-joining; PUFA, polyunsaturated fatty acids; SFA, saturated fatty acids; TEM, transmission electron microscopy; X-ALD, X-linked adrenoleukodystrophy.

* Corresponding author.
E-mail address: stsavary@u-bourgogne.fr; Tel.: +33 (0)380396273. Fax: +33 (0)380396250.

considered today as a central actor in both cALD and AMN.

Although evidence of the VLCFA accumulation acting as the inflammatory trigger is lacking, a higher VLCFA level has been measured in reactive cells in the lesion areas of cALD brain [7]. The exact link between VLCFA accumulation, demyelination, oxidative stress and inflammation as well as the sequence of events leading to the disease are still unclear. The ABCD1 protein is involved in the import of CoA-esters of VLCFA into the peroxisome, the unique site of their β-oxidation. The *ABCD2* gene encodes a peroxisomal half-ABC transporter which is the closest homologue of ABCD1 in mammals [8]. ABCD1 and ABCD2 proteins displaying overlapping substrate specificity and partial functional redundancy, overexpression of ABCD2 has therefore been proposed as a therapeutic strategy for the treatment of X-ALD [9, 10]. Mice models with *Abcd1* or *Abcd2* mutations have been developed to further study these ABC transporters and provide a disease model [11-15]. The *Abcd1*-deficient mice appear clinically normal up to 6 months and start manifesting abnormal neurological symptoms after 15 months but do not display demyelinating features of cALD [11]. The *Abcd2*-deficient mice develop a late-onset cerebellar and sensory ataxia, with loss of cerebellar Purkinje cells and dorsal root ganglia cell degeneration [12]. As expected, the *Abcd1/Abcd2* double knockout mice demonstrated an accelerated and more severe neurological phenotype [9]. This increased severity in the double mutant was also confirmed from a metabolic point of view in mouse macrophages [16].

In addition to these animal models, the development of novel cell models of brain origin is definitely needed to better understand the link between metabolic defects and neurodegenerative processes in X-ALD. From the BV-2 immortalized cell line, which was established in 1990 [17] and which is recognized as a good alternative to primary microglial cells [18], we recently generated a microglial cell line with *Acox1* deficiency (*Acox1* encodes the first and rate-limiting enzyme of peroxisomal β-oxidation) using CRISPR/Cas9 gene editing strategy [19]. The preliminary characterization of this mutant cell line has demonstrated its potential to facilitate the study of peroxisomal dysfunctions. BV-2 cells expressing both ABCD1 and ABCD2 proteins [20], the objective of the present study was to generate new BV-2-derived cell lines with single or double mutation in the *Abcd1* and *Abcd2* genes. Our strategy was based on the selection of non-homologous end-joining (NHEJ) repair events resulting in frameshift mutations following CRISPR/Cas9-mediated double strand DNA break [21]. Here, we present the establishment and the validation of 3 mutant cell clones (i.e. *Abcd1*- *Abcd2*- and *Abcd1/Abcd2*-deficient BV-2 cell clones) and their initial characterization focusing on cell growth, cell morphology and ultrastructure, and lipid content. Expression levels of key microglial genes and of genes suspected to be modifier genes in X-ALD were also analyzed.

2. Materials and methods

2.1. Plasmids

Custom synthesized plasmids used for genome editing were obtained from GeneCopoeia, Inc/tebu-bio (France). The all-in-one plasmids allow the co-expression of Cas9 nuclease, a mCherry fluorescent reporter, and one sgRNA targeting either the first exon of *Abcd1* (Catalog No: MCP226534-CG01-2-B-b; target sequence: 5'-GTCAGACACTGCCGTACTAG-3') or *Abcd2* (MCP230736-CG01-2-B-b; target sequence: 5'-GCTGCATTTAGTCCCGGCGC-3'). The specificity of CRISPR/Cas9 editing mainly depends on the sgRNA sequence and on the presence of protospacer adjacent motif located next to the target sequence. To avoid non-specific mutations, we paid attention to the design of the all-in-one CRISPR plasmid and relied on the expertise of our plasmid supplier. The sgRNA sequences were chosen to exhibit the highest quality score by inverse likelihood of off-target binding based on the CRISPR design tool developed by Zhang Lab, MIT 2017 (http://crispr.mit.edu/).

2.2. Cell culture, transfection, clonal selection, and proliferation assay

Murine microglial cells (BV-2) from female C57BL/6J mice purchased from Banca-Biologica e Cell Factory (catalog no. ATL03001) were cultured in DMEM supplemented with 10% heat-inactivated FBS and 1% penicillin/streptomycin (Dutscher). Cultures were maintained at 37°C in a humidified atmosphere containing 5% CO_2.

BV-2 cells (2×10^6, ~70% confluence) were transfected with 2 µg all-in-one plasmid using Amaxa Cell Line Nucleofector Kit T (Lonza) and program A-023. Twenty-four hours after transfection, adherent cells were gently detached using trypsin/EDTA, sorted by flow cytometry based on high expression of mCherry, and then seeded as single cells in a 96-well plate. Cells were allowed to grow for 10-14 days before genomic DNA extraction and genotyping. Between 5 and 20% of cells demonstrated survival and clonal amplification. Double-knockout cells were obtained after transfection of the selected *Abcd1*-deficient cell clone with the *Abcd2* all-in-one plasmid and selection with the same strategy.

For growth comparison, WT and mutant BV-2 cells were seeded in 24-well plates (2×10^4 cells/well) and cultivated for 24, 48, 72 or 96 h. The cells being semi-adherent, the medium was not replaced during growth to avoid cell loss. Viability was evaluated with trypan blue (0.025% final concentration). Living cells were counted using a hemocytometer. The average number of cells was obtained from triplicate of 3 independent experiments.

2.3. Molecular analysis (Genomic DNA purification, Indel detection, PCR)

Genomic DNA was extracted from selected clones or cellular pools with the NucleoSpin Tissue Kit (Macherey-Nagel). In order to assess CRISPR/Cas9 efficiency, detection of indels was first performed on a pool of transfected cells with T7 endonuclease assay (GeneCopoeia) from PCR products obtained with the following primers for *Abcd1* locus (F: 5'-GGGCACCCCTAACTCGGACTC-3', R: 5'-GAAAGTGGCAGGAAGGGCGAT-3'), and *Abcd2* locus (F: 5'-TTCAAAGGGAAGAGGCCAGGAGT-3', R: 5'-TCCGAGGCTTCTTTTCCACGATG-3'). After cell sorting, individual screening using PCR with GoTaq Flexi DNA polymerase (Promega) was performed with the following primer pairs: *Abcd1* (F: 5'-GGGCACCCCTAACTCGGACTC-3', R: 5'-GGAGTCAGACACTGCCGTACT-3'), *Abcd2* (F: 5'-TTCAAAGGGAAGAGGCCAGGAGT-3', R: 5'-AGCTGCATTTAGTCCCGGCG-3'). The 3' end of each reverse primer was localized at the CRISPR/Cas9 targeted-mutation site. PCR products were visualized with ethidium bromide after electrophoresis on a gel containing 1.5% agarose and using a Bio-Rad Gel Doc XR+ Imager System. NHEJ mediated mutations were confirmed by Sanger sequencing (Eurofins Genomics Sanger sequencing platform, Germany) of PCR products amplified using GoTaq Flexi DNA polymerase (Promega) with the primers used for T7 endonuclease assay.

2.4. Western blotting

Cell lysate preparation and western blotting were performed as previously described [19]. Briefly, detection of ABCD1 and ABCD2 was done using a rabbit polyclonal anti-ABCD1 antibody (1:5000; homemade serum 029 raised against the EQQLAGIPKMQGRLQELRQILGEAAAPVQPLVPG VPT, corresponding to amino acids 700-736 of mouse ABCD1 [22]), and a rabbit polyclonal anti-ABCD2 antibody (1:250; Abcam, ab102948), respectively. Actin was revealed using anti-actin antibody (dilution 1:10,000; Sigma-Aldrich). Following the incubation with the appropriate horseradish peroxidase (HRP)-conjugated secondary antibody (1:5000; Santa Cruz Biotechnology, Inc.), immunoreactivity was revealed by ECL (Santa Cruz Biotechnology). The membrane was first probed with the anti-ABCD1 or anti-ABCD2 antibody and then stripped by incubation for 30 min in stripping buffer (62.5 mM Tris-HCl pH 6.8, 2% SDS, 100 mM β-mercaptoethanol) at 50°C before being probed with the anti-actin antibody. Image processing and analysis were obtained using a Bio-Rad-Chemidoc XRS system.

2.5. Optic and electron microscopy

The content of cellular neutral lipids was evaluated by staining cells with Oil Red O (Sigma-Aldrich) as previously described [19]. Transmission electron microscopy was used to visualize WT and mutant BV-2 cells cultured for 24 h. Cell sample preparation and diaminobenzidine-staining to visualize peroxisomes were performed as previously described [19]. Micrographs corresponding to 7-12 cells for each genotype, randomly taken from the grid, were analyzed by 6 different investigators in blind with a particular focus on the number of peroxisomes, mitochondria, and lipid vesicles and/or inclusions to give a score for each feature. Statistical analysis was performed from the analytical scores. Morphometry was performed from micrographs using ImageJ calculation of areas after manual delineation of organelles. The mean area (+/- SD) was expressed in μm^2 and the maximum and minimum sizes were noted.

2.6. Lipid analysis

The cholesterol level and the fatty acid composition were obtained by gas chromatography mass spectrometry (GC-MS) from cellular homogenates, prepared from pellets of 10^7 cells suspended in water (100 µl) and mixed with structural homologous internal standards (pentadecanoic and heptadecanoic acid), as previously described [19, 23]. Peak integration was performed manually. Metabolites were recognized by retention time and fragmentation patterns, and quantified from total-ion count against internal standards using standard curves for the measured fatty acids and sterols.

2.7. RTqPCR analysis

Total RNA was isolated from the BV-2 cells using the Qiagen RNeasy Mini kit and treated with DNase I. After quality and quantity control by spectrophotometry, RNA (1 µg) was reverse transcribed using the iScript cDNA Synthesis Kit (Bio-Rad). The synthesized cDNA was used as a template for Real-time PCR analysis using the SYBR Green real-time PCR technology and a StepOne Plus system (Applied Biosystems) as previously described [24].

Trem2, *Acsbg1*, *Mrc1*, *Cd1d1*, and *Elovl7* expression was quantified relatively to the expression of the house-keeping gene *36B4* using the following primers:
Trem2 (F: 5'-GACCTCTCCACCAGTTTCTCC-3', R: 5'-TACATGACACCCTCAAGGACTG-3'), *Acsbg1* (F: 5'-GGTGAATGCACACAGCAGATG-3', R: 5'-AATTAAGGAGCTGGTTTGCGAGT-3'), *Mrc1* (F: 5'-GGAGGCTGATTACGAGCAGT-3', R: 5'-TGGTTCACCGTAAGCCCAATT-3'), *Cd1d1* (F: 5'-CCTTTGTGTACCAGTCCGGG-3', R: 5'-TTTTGCTGGGCTTCAGATTGTC-3'), *Elovl7* (F: 5'-CAAGAGCAATGAGGATGGTGC-3', R: 5'-GGTCCACGGCATGATCGTA-3'), *36B4* (F: 5'-ATGGGTACAAGCGCGTCCTG-3', R: 5'-GCCTTGACCTTTTCAGTAAG-3').

2.8. Statistical analysis

Statistical analysis was performed using GraphPad Prism 5 software. One-way ANOVA followed by a Bonferroni post hoc test was used for every comparison between knockout genotypes versus WT. Two-way repeated measure ANOVA followed by a Bonferroni post hoc test was used for growth curves comparison. In

all statistical tests, values of $p<0.05$ were considered significant.

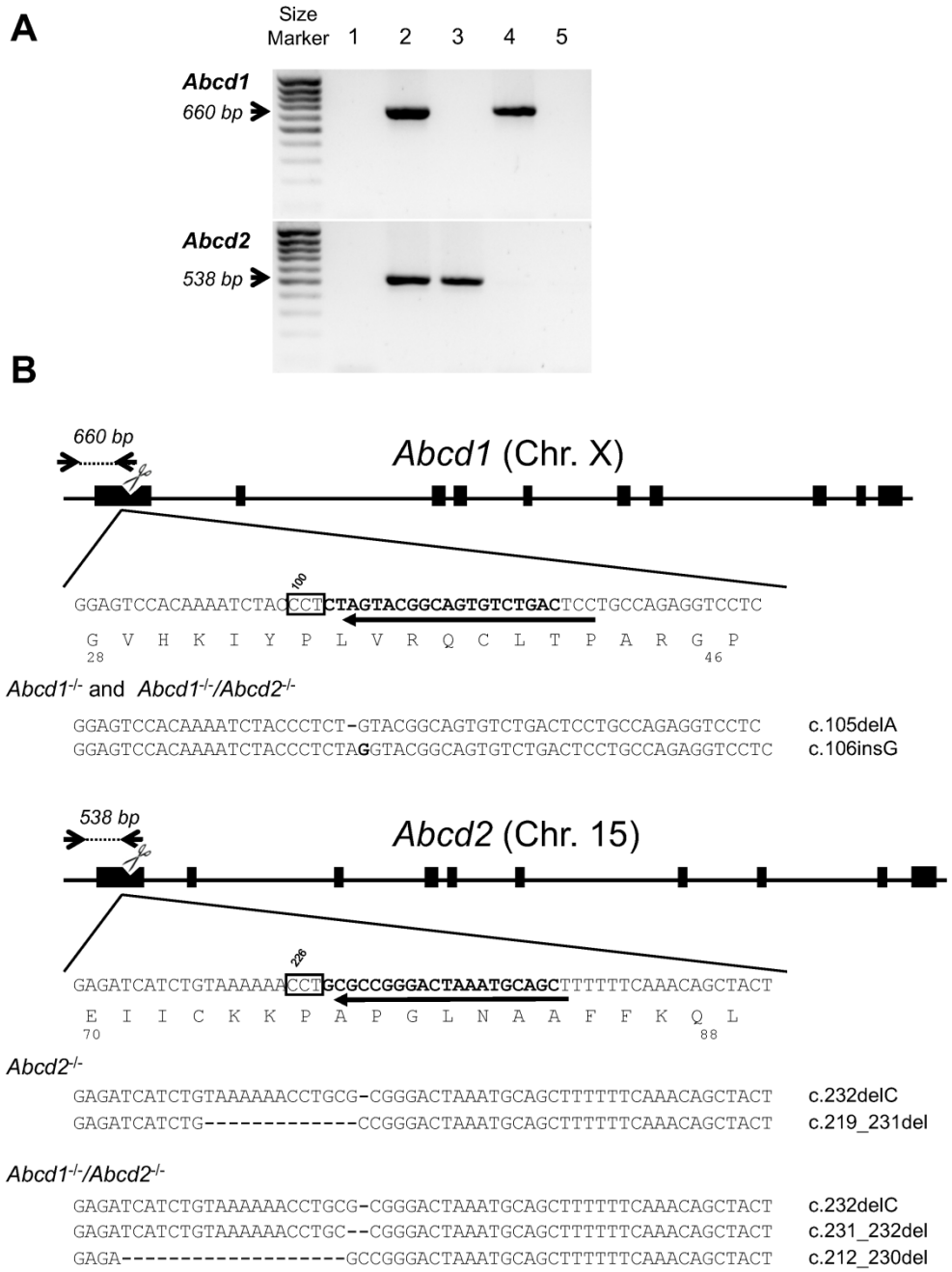


Fig. 1. CRISPR/Cas9-mediated knockout of *Abcd1* and *Abcd2* genes in BV-2 cells. (A) Agarose gel electrophoresis of PCR products illustrating indel screening of individual BV-2 cell clones. The 3' end of the reverse primer corresponding to the CRISPR targeted site, absence of PCR amplification indicates a disrupted site (1: negative control; 2: wild type BV-2 cells; 3: *Abcd1*$^{-/-}$ cell clone; 4: *Abcd2*$^{-/-}$ cell clone; 5: *Abcd1*$^{-/-}$*/Abcd2*$^{-/-}$ cell clone). (B) Schematic representation of the *Abcd1* and *Abcd2* locus showing exon organization and sgRNA target sites (in exon 1) with their respective sequences in bold. The protospacer adjacent motif (NGG on the complementary strand) which allows specific binding and cleavage by the Cas9 nuclease is boxed. Nucleotide sequences are numbered from the translation start codon and translated sequences are indicated. The position of the reverse primer used for indel screening is indicated by the arrow. Below are presented the sequences of the *Abcd1* and *Abcd2* exon 1 in mutant cell clones demonstrating frame shift insertions or deletions (in bold). The *Abcd1*$^{-/-}$*/Abcd2*$^{-/-}$ cell clone and the *Abcd1*$^{-/-}$ clone from which it was obtained, exhibit the same mutations in the *Abcd1* locus.

3. Results

3.1. CRISPR-Cas9 knockout of Abcd1 and Abcd2 in BV-2 cells

Contrary to the HDR-based strategy previously used to generate *Acox1*-deficient BV-2 cells, which resulted in cell clones with the same mutation [19], BV-2 cells were only transfected with the all-in-one plasmids. Cells showing the higher expression level of mCherry 24 h after transfection were sorted by FACS and clonally cultivated before genomic analysis to check for mutations after non-homologous end-joining (NHEJ) repair events. Genotyping of individual cell clones was then carried out using specific primer pairs and demonstrated the loss of the WT allele (Fig. 1A). Sequencing of PCR products covering the respective *Abcd1* or *Abcd2* target locus confirmed mutations a few nucleotides after the start codon (Fig. 1B). In the *Abcd1*-deficient cell clone, two distinct frameshift mutations were identified (c.105delA and c.106insG). In the *Abcd2*-deficient cell clone, two distinct frameshift mutations were also identified (c.232delC and c.219_231del). From the few cell clones demonstrating sufficient growth (approximately 10 per genotype), ~70% of cell clones containing no mutation, monoallelic, or biallelic mutations but without frameshift (deletion of 3 nucleotides), were not retained for further analysis.

At the end of each step, the selected mutant cell clones were expanded to generate a stock of cryogenic vials at the lowest passage. The selected *Abcd1*-deficient BV-2 cell clone was transfected with the *Abcd2* all-in-one plasmid to obtain the double knock-out cell clone and the same screening strategy was applied. Genotyping confirmed the double disruption in only one of the 11 cell clones obtained. Surprisingly, Sanger sequencing demonstrated the presence of 3 distinct frameshift mutations in the *Abcd2* locus (c.232delC, c.231_232del, c.212_230del) (Fig. 1A). After excluding the hypothesis of sequencing/PCR artifacts, we hypothesized that these mutations are associated to multinuclearity and/or aneuploidy. We indeed observed multinucleated cells in culture, which is frequent in BV-2 and other microglial cells [25]. Besides, a recent study aiming to obtain mutant BV-2 cells for the *Trem2* gene also faced with triallelic mutations associated with cell multinuclearity and aneuploidy including trisomy of chromosome 17 [26]. Moreover, while *Abcd1* is located on the X chromosome [27], *Abcd2* is on the chromosome 15 [28], a chromosome whose trisomy is frequently found in murine cell lines, probably due to the location of c-myc [29].

Anyhow, the disruption of the *Abcd1* and/or *Abcd2* genes in the mutant cell clones was confirmed by western blot analysis demonstrating the absence of ABCD1 protein in the *Abcd1*-deficient cell clone, the absence of ABCD2 in the *Abcd2*-deficient cell clone, and the absence of both proteins in the double mutant cell clone (Fig. 2). Interestingly, we noticed a weak increase in ABCD1 (×1.77 in the *Abcd2*$^{-/-}$ cells) and ABCD2 (×1.88 in the *Abcd1*$^{-/-}$ cells) signals in the single mutants compared to the wild type suggesting possible compensation mechanisms.

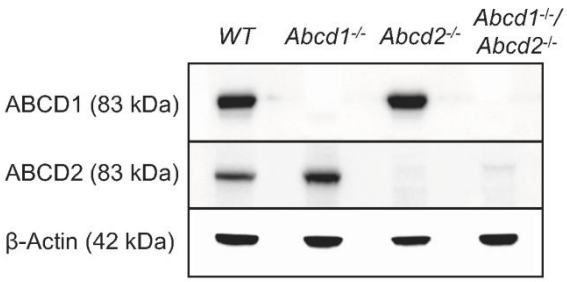


Fig. 2. Western blot analysis of ABCD1 and ABCD2 expression in mutant BV-2 cells. Whole cell lysates were separated on 7.5% SDS-PAGE, blotted on PVDF membrane and analyzed by immunoblotting with anti-ABCD1 (homemade serum 029), anti-ABCD2 (Abcam, ab102948) and anti-Actin antibodies.

3.2. Consequences of the absence of peroxisomal ABC transporters on fatty acid levels

In order to functionally validate the disruption of *Abcd1* and *Abcd2* genes, we conducted a lipid analysis to compare the fatty acid levels in WT and mutant cells with a particular focus on VLCFA. As said previously, *Abcd1* and *Abcd2* displaying a partial functional redundancy, accumulation of VLCFA was expected to occur only in the double mutant cell clone. This hypothesis has indeed been confirmed with a significant increase in the levels of C24:0, C26:0, C24:1 and C26:1 observed in the double mutant only (Table 1).

The C24:0/C22:0 and C26:0/C22:0 ratio, which are used as diagnosis markers for X-ALD, remained unchanged in the single mutants and were respectively 1.6- and 5.1-fold higher than the control ones in the *Abcd1*$^{-/-}$/*Abcd2*$^{-/-}$ cells (Fig. 3).

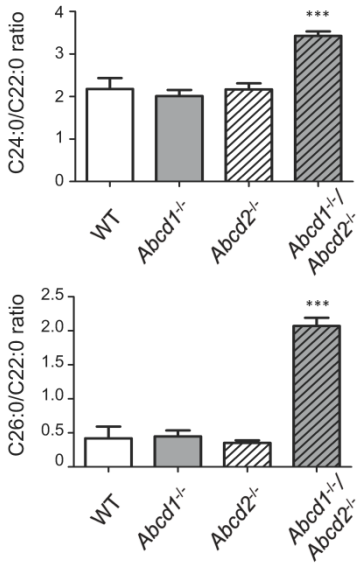


Fig. 3. VLCFA accumulate in *Abcd1*$^{-/-}$/*Abcd2*$^{-/-}$ BV-2 cells but not in ABCD1 or ABCD2 single mutants. FA content of BV-2 cells was measured by GC/MS. C26:0 and C24:0 values are normalized to C22:0 values (mean with SD of three independent experiments, ANOVA with Bonferroni post-hoc test; *** P value < 0.001).

Table 1.
Fatty acid levels in WT and mutant BV-2 cells cultivated during 48h.

	WT		*Abcd1*$^{-/-}$			*Abcd2*$^{-/-}$			*Abcd1*$^{-/-}$/*Abcd2*$^{-/-}$		
	Mean	**SD**	**Mean**	**SD**		**Mean**	**SD**		**Mean**	**SD**	
C16:0	17,716	2255	18,884	1789		18,890	5239		23,959	817	
C18:0	9925	1425	12,311	482		9704	1817		14,346	1055	*
C20:0	91.1	17.6	148	18.2	*	76.8	26.4		289	15.2	***
C22:0	28.9	5.68	35.5	3.27		26.1	6.61		55.4	7.20	**
C24:0	62.0	6.26	71.2	4.52		56.5	15.7		189	19.0	***
C26:0	11.6	3.68	15.8	1.69		9.24	2.85		114	9.58	***
SFA	27,834	3684	31,465	2247		28,763	7091		38,952	1850	
C16:1 n-7 trans	1637	412	924	129	*	608	201	**	1064	71.0	
C16:1 n-7 cis	5468	549	8718	658		9078	2153	*	8825	876	
C18:1 n-9	24,135	2902	21,867	1789		18,069	3128		22,416	1213	
C18:1 n-7	11,012	860	15,817	1503		16,184	3953		11,704	455	
C20:1 n-9	329	22.4	472	55.6		623	105	**	406	31.4	
C22:1 n-9	41.5	4.97	34.6	3.10		48.3	11.7		48.0	3.46	
C24:1 n-9	58.0	7.50	64.8	4.34		61.6	17.8		134	7.52	***
C26:1 n-9	15.4	2.40	19.9	1.20		13.7	3.73		76.6	3.60	***
MUFA	42,695	4162	47,917	3812		44,685	9500		44,673	2560	
C18:2 n-6	778	147	2079	229	***	1051	285		2567	92.0	***
C20:3 n-6	742	92.8	765	78.5		625	93.3		1261	42.2	***
C20:4 n-6	2258	275	3781	441	**	2347	273		5252	409	***
C20:5 n-3	1478	160	561	98.7	***	478	80.6	***	948	48.4	**
C22:6 n-3	1579	129	2425	224	**	1441	197		2744	147	***
PUFA	6836	778	9611	1066	*	5942	924		12,772	671	***
Total FA	77,365	8552	88,993	6921		79,390	17,422		96,397	4987	

Data represent mean levels of fatty acids (saturated (SFA), monounsaturated (MUFA), and polyunsaturated (PUFA)) measured by GC/MS and expressed in ng/mg of protein of 3 independent experiments with their respective standard deviation (SD).
Significant differences at p<0.001***, p < 0.01**, p<0.05* determined by ANOVA followed by Bonferroni post-hoc test are indicated.

As shown in Table 1, the total fatty acid level as well as the global quantity of the main species of fatty acids analyzed did not present significant differences between single mutant and control cells with the exception of PUFA in the *Abcd1* mutant cells. However, we observed increased levels of total FA, SFA, and PUFA in the *Abcd1*$^{-/-}$/*Abcd2*$^{-/-}$ cells, statistical significance being obtained only for PUFA. Besides VLCFA, significant increase was observed for saturated LCFA (C18:0, C20:0, C22:0) and for some PUFA (C18:2 n-6, C20:3 n-6, C20:4 n-6 (arachidonic acid, AA) and C22:6 n-3 (docosahexaenoic acid, DHA)) while C20:5 n-3 was found decreased. The *Abcd1*$^{-/-}$ cells recapitulated partially these observations in particular in the PUFA series. In the *Abcd2*$^{-/-}$ cells, a significant increase was observed for C16:1 n-7 cis and C20:1 n-9 levels while C16:1 n-7 trans and C20:5 n-3 levels were found decreased.

3.3. Cell morphology and growth curve of BV-2 mutant cell lines

The *Acox1*-deficient BV-2 cell clone that we recently obtained and characterized was shown to grow slower than WT cells [19]. A similar result was obtained with the *Abcd1* and *Abcd2* mutated BV-2 cells cultivated over a period of 4 days in comparison with WT cells (Fig. 4). At 48 h, *Abcd1*$^{-/-}$ and *Abcd1*$^{-/-}$/*Abcd2*$^{-/-}$ cells exhibited a significant growth retardation suggesting a slower division time. Growth retardation after 72 h of culture was significant for the three mutant cell clones, the *Abcd1*$^{-/-}$/*Abcd2*$^{-/-}$ cells presenting the highest difference with the WT cells. Noteworthy, cell death of BV-2 mutant cells, quantified using trypan blue, did not differ from that of WT cells.

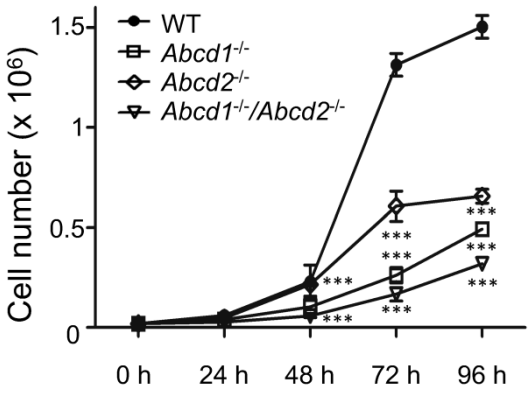


Fig. 4. Proliferation curves of mutant BV-2 cells. At t0, 2×10^4 cells were seeded. Data represent mean values of 3 independent experiments (cells, from the same passage number, thawed at different dates and cultivated during 48 h) with 3 technical replicates +/- SD. Statistically significant differences with WT cells determined by ANOVA with Bonferroni post-hoc test are indicated: *** P value < 0.001.

As in the case of *Acox1*-deficient BV-2 cells [19], we did not observe obvious morphological differences between WT and mutant BV-2 cells (data not shown), the vast majority of cells adopting a round shape typical of a microglial activated status [30]. We further analyzed the mutant BV-2 cells by electron microscopy using diaminobenzidine (DAB) staining, which allows cytochemical detection of p*eroxisomes (Fig. 5)*. Score-based blind analysis of micrographs suggested a weak increase in the number of peroxisomes in *Abcd2*$^{-/-}$ and *Abcd1*$^{-/-}$*/Abcd2*$^{-/-}$ cells and in the number of mitochondria in all mutant cells. A refined analysis did not demonstrate significant peroxisomal modification both in number and in size. However, it confirmed the increased number of mitochondria per micrographs (×1.95 in *Abcd1*$^{-/-}$, ×1.46 in *Abcd2*$^{-/-}$, and ×1.71 in *Abcd1*$^{-/-}$*/Abcd2*$^{-/-}$ cells). The size of mitochondria was moderately but significantly reduced in *Abcd1*$^{-/-}$ (0.435 µm^2 +/- 0.0196, n=133) and in *Abcd1*$^{-/-}$*/Abcd2*$^{-/-}$ (0.501 µm^2 +/- 0.0161, n=249) cells as compared to WT cells (0.603 +/- 0.0342, n=113). The mitochondrial size was however not significantly modified in the *Abcd2*$^{-/-}$ cells. Beyond these observations, the more striking differences concerned lipid droplets and lipid inclusions which appear in white in the micrographs (Fig. 5). The *Abcd1*$^{-/-}$ cells exhibit a significant increase in lipid droplets while *Abcd1*$^{-/-}$*/Abcd2*$^{-/-}$ cells display a very unique striated pattern along with lamellar-lipid figures with a whorled or spiral form. These features prompted us to further examine cells with Oil Red O staining for the presence of neutral lipids. As shown in Fig. 6A, a more intense labeling was observed in *Abcd1*$^{-/-}$ cells and this increased staining was even more pronounced in *Abcd1*$^{-/-}$*/Abcd2*$^{-/-}$ cells. Accumulation of neutral lipids, mainly cholesteryl-esters, represents a hallmark of peroxisomal disorders. To complete this analysis, we investigated whether total cholesterol level was modified in the mutant cells. Total cholesterol level was found significantly increased both in *Abcd1*$^{-/-}$ (×1.41) and in *Abcd1*$^{-/-}$*/Abcd2*$^{-/-}$ (×1.49) cells but not significantly modified in *Abcd2*$^{-/-}$ cells (Fig. 6B).

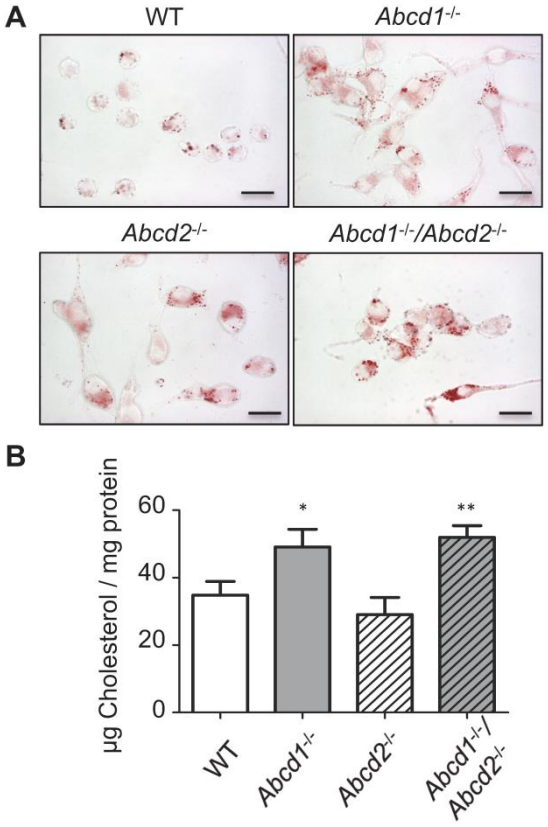


Fig. 6. Lipid accumulation in mutant BV-2 cells. (A) Light microscopic images of Oil Red O staining in WT, *Abcd1*$^{-/-}$, *Abcd2*$^{-/-}$, and *Abcd1*$^{-/-}$*/Abcd2*$^{-/-}$ BV-2 cells (bar=20 µm). (B) Total cholesterol levels of BV-2 cells measured by GC/MS and normalized to protein content. Data represent the mean values +/- SD of 3 independent experiments and are expressed as µg of cholesterol/mg of protein. Statistically significant differences determined by ANOVA with Bonferroni post-hoc test are indicated: ** P value < 0.01, * P value < 0.05.

3.4. Expression of key microglial genes in the BV-2 mutant cell lines

Microglial cells ensure an important role in brain homeostasis by controlling inflammation and participating to phagocytosis of apoptotic cells and myelin debris. As a preliminary study of the functional consequences of *Abcd1* and *Abcd2* deficiency in the BV-2 cells, we investigated the mRNA levels of several genes associated with inflammation control and phagocytosis such as *Trem2* (Triggering receptor expressed by myeloid cells-2) and *Mrc1* (mannose receptor C-type 1, CD206). Trem2 controls the phenotypic conversion of microglia and promotes phagocytosis [31]. *Mrc1* encodes a mannose receptor considered as a M2 polarization marker whose expression level was recently found decreased in cerebral adrenoleukodystrophy macrophages [32]. We also considered genes previously suspected to be modifier genes in X-linked adrenoleukodystrophy such as *Acsbg1*, which encodes a synthetase activating LCFA in the endoplasmic reticulum and playing an important role in brain [33], *Cd1d1* which encodes CD1d, a cell surface protein allowing lipid antigens to be presented to NKT lymphocytes [34] and genes encoding elongases

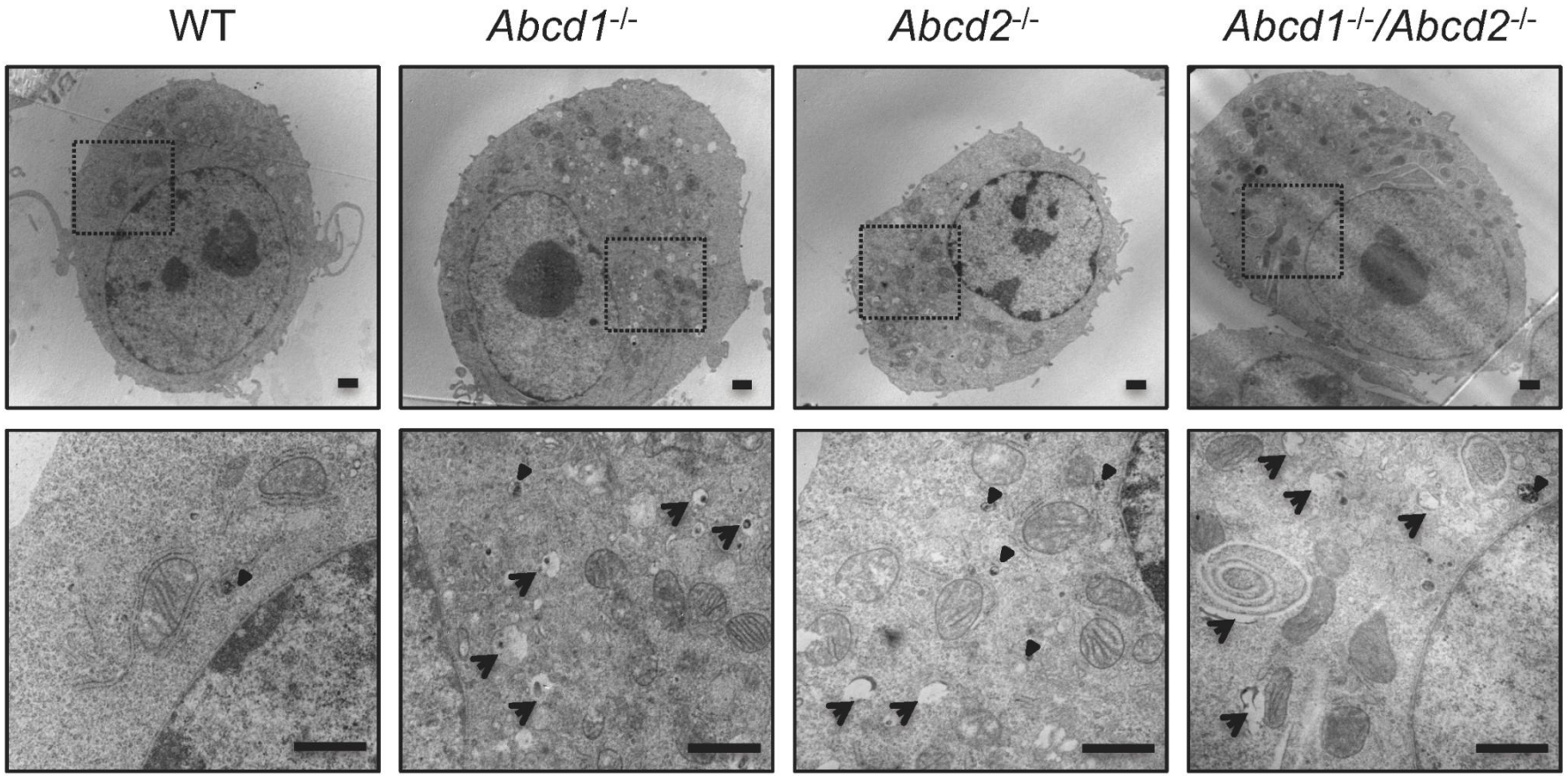


Fig. 5. Ultrastructure analysis of mutant BV-2 cells. Transmission electron micrographs (whole cell and respective higher magnification) of WT, *Abcd1*$^{-/-}$, *Abcd2*$^{-/-}$, and *Abcd1*$^{-/-}$/*Abcd2*$^{-/-}$ BV-2 cells (bar=2 µm). Peroxisomes and lipid droplets are indicated (arrowheads and short arrows respectively). Striated and whorled lipid inclusions, characteristic features of X-ALD, are present in the double mutant cells.

responsible for the endogenous synthesis of VLCFA [35]. If the *Elovl1* gene is probably not a modifier gene since its expression level was found unchanged in primary peritoneal macrophages of *Abcd1*/*Abcd2* double-deficient mice [16], we focused on the *Elovl7* gene recently demonstrated to be controlled by the mTOR pathway [36], a pathway that governs autophagy mechanisms and is suspected to play a major role in X-ALD [37]. As shown in Fig. 7, *Trem2* expression level was weakly increased in every mutant cells (×1.5-×2.1). *Mrc1* expression level was slightly decreased in the *Abcd1*$^{-/-}$*/Abcd2*$^{-/-}$ cells (×0.6), barely not modified in *Abcd1*$^{-/-}$ cells, and strikingly increased in the *Abcd2*$^{-/-}$ cells (×4.8). Concerning the putative modifier genes, in all the mutant cells, *Acsbg1* was slightly down-regulated (×0.4-×0.8) while both *Cd1d1* and *Elovl7* were strongly up-regulated.

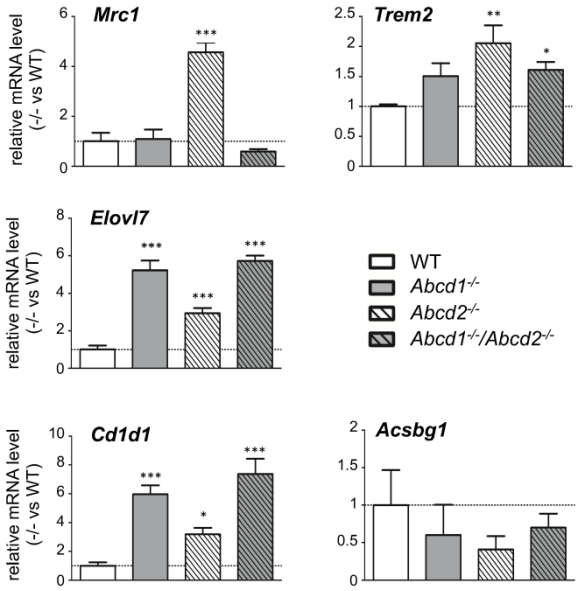


Fig. 7. Relative mRNA levels of key microglial genes in mutant BV-2 cells. Expression levels of genes involved in microglial functions and phagocytosis (the immune receptor Trem2, the mannose receptor MRC1/CD206) and putative modifier genes in X-ALD (*Acsbg1*, *Cd1d1* and *Elovl7*) were measured using RT-qPCR and normalized to *36B4*. Data represent the mean values +/- SD of 3 independent experiments and are expressed as relative expression levels in comparison with the corresponding expression level in WT cells taken arbitrary equal to 1. Statistically significant differences determined by ANOVA with Bonferroni post-hoc test are indicated: *** P value < 0.001, ** P value < 0.01, * P value < 0.05.

Discussion

In this study, our objective was to create a novel cell model useful in the context of X-ALD. Using CRISPR/Cas9 technology, we knocked out the *Abcd1* and *Abcd2* genes in BV-2 cells, a cell line commonly used as a substitute for primary microglia [18]. Contrarily to the *Acox1*-dificient cells that we generated using a strategy based on homologous directed recombination [19], here, we adopted a more direct strategy based on cell sorting and molecular screening of NHEJ events, strategy that has proven to be at least equally effective. We first confirmed mutations by DNA sequencing in the 3 cell clones as well as the correlated absence of ABCD1 and/or ABCD2 proteins by western blotting. Lipid analysis demonstrated the invalidation of peroxisomal ABC transporters in the double-mutant cells, the absence of both ABCD1 and ABCD2 proteins resulting in VLCFA accumulation (10-fold and 5-fold higher levels of C26:0 and C26:1 respectively in comparison with the respective levels in WT cells). Cross-compensation between ABCD1 and ABCD2 in single-deficient cells likely explains why VLCFA levels were not modified in single-mutant cells. These observations perfectly fit with what was observed in primary mouse peritoneal macrophages from *Abcd1* and *Abcd2* single- and double-deficient mice [16]. Of course, VLCFA accumulation could not be simply ascribed to the loss of peroxisomal β-oxidation since we observed an increased expression of *Elovl7* in the mutant cells. Of note, like in human skin fibroblasts of X-ALD patients [38], the *Elovl1* expression remained almost unchanged (data not shown). In addition to VLCFA, surprisingly, we found several differences in saturated LCFA, MUFA as well as in PUFA levels. Peroxisomal defects in association with ABCD1 deficiency have proven to induce endoplasmic reticulum stress as well as mitochondrial defects [37,39,40]. Fatty acid elongation in the ER and oxidation in mitochondria may consequently be altered. In support to this hypothesis, we noticed that double-mutant cells exhibit a marked growth retardation as well as ultrastructural modifications concerning mitochondria (reduced size and increased number). The rare published data about lipid metabolism in BV-2 microglial cells have indicated that saturated LCFA levels are increased and MUFA levels are decreased upon LPS activation [41]. Further experiments will be necessary to determine whether the peroxisomal defect associated with the absence of ABCD1 and ABCD2 mimics such an activation state. Transcriptomic analysis of the mutant cell clones which is in progress may help to determine the effects on various genes associated with lipid metabolism (acyl-CoA synthetases, elongases, desaturases, …). Concerning PUFA levels, both DHA and AA levels were found surprisingly increased in the *Abcd1*$^{-/-}$*/Abcd2*$^{-/-}$ cells. DHA and AA are known precursors of signaling lipids playing mainly neuroprotective or proinflammatory roles, respectively [42, 43]. Profiling of VLCFA in phospholipids and lysophospholipids has recently revealed that specific PUFA are enriched in *Abcd1*-deficient mice [44]. Altogether, in-depth lipidomic analysis on membrane species, cholesteryl esters and secreted lipids will be necessary to address the precise consequences of the mutations of the peroxisomal ABC transporters in the BV-2 microglial cells.

If we look specifically at the single mutant BV-2 cells, the *Abcd1*$^{-/-}$ cells did not demonstrate VLCFA accumulation and displayed a less-marked pattern than the double-mutant cells for LCFA, MUFA and PUFA. On the contrary, the *Abcd2*-deficient cells showed almost no change compared to WT cells, with the exception of increased levels of C16:1 n-7 (cis) and C20:1 n-9 and decreased levels of C16:1 n-7 (trans) and C20:5 n-3. Given the relatively high expression levels of both *Abcd1* and *Abcd2* genes in BV-2 cells [20], the known

functional redundancy regarding saturated and monounsaturated fatty acids [9, 45], and the specificity of ABCD2 towards MUFA and PUFA [10, 22, 45-47], these results raise questions. Considering the divergences in the levels of several MUFA, PUFA and VLCFA levels observed in adrenals, spinal cord, sciatic nerve, or in primary neurons of *Abcd1*-, *Abcd2*- or *Abcd1/Abcd2* KO mice, the consequences of a deficiency in *Abcd1* and/or *Abcd2* seem strictly tissue and cell specific [46]. An overview of the enzymatic content of BV-2 microglial cells related to fatty acid metabolism is probably the key to understanding such observations. As mentioned above, the upcoming results of transcriptomic analysis will be helpful in that task.

The *Abcd1*$^{-/-}$/*Abcd2*$^{-/-}$ BV-2 cells were shown to reproduce the main biochemical feature of X-ALD (accumulation of VLCFA) and exhibit ultrastructural features resembling those observed in X-ALD patients. The observed striated pattern as well as the whorled lipid inclusions perfectly match with what was observed in adrenals, sural nerves, testis and macrophages of demyelinated areas of X-ALD patients [48, 49]. Such lipid inclusions were also described in the adrenals of *Abcd1/Abcd2* double KO mice [9] and are probably related to the accumulation of VLCFA-cholesteryl esters [50, 51]. The absence of such lipid figures in single mutant cells is likely associated to compensatory effects between ABCD1 and ABCD2 proteins. Oil Red O staining demonstrated accumulation of neutral lipids in the double mutant BV-2 cells and to a lesser extent in the *Abcd1*-deficient cells. These observations were correlated with increased levels of cholesterol. The exact link between cholesterol metabolism and peroxisomal functions is still under debate. It appears clear that cholesterol levels control the expression level of *Abcd2* [52-54] and interfere with saturated and monounsaturated VLCFA [55]. The consequences of peroxisomal defect on cholesterol metabolism have been more rarely described. Increased plasma level of cholesterol was observed in *Abcd1* KO mice [56] and cholesterol accumulation was observed in fibroblasts, adrenals, and cerebellum of *Abcd1* KO mice as well as in human fibroblasts from patients suffering from peroxisomal biogenesis disorders (Infantile Refsum disease and Zellweger syndrome) [50]. The blockage of cholesterol transport has been suggested to participate in peroxisomal pathologies. Cholesterol, which may also serve as a substrate for oxidized derivatives responsible for deleterious effects in brain or as a modifier of membrane properties, could largely contribute to the neurodegenerative process in X-ALD in case of accumulation. The *Abcd1*$^{-/-}$/*Abcd2*$^{-/-}$ BV-2 cells may therefore represent a very relevant in vitro model to answer these questions.

The preliminary investigations of the impact of the absence of peroxisomal ABC transporters in microglial BV-2 cells on gene expression have confirmed the utility of these new cellular models. First, we highlighted that the expression of *Trem2* and *Mrc1* genes were modified suggesting, as in the case of *Acox1*-deficient cells [19], that phagocytosis ability is likely modified in the mutant cells. Further experiments will be necessary to evaluate the capacity of BV-2 mutant cells to engulf fluorescent beads, myelin debris or apoptotic cells, a microglial function that is considered to be a pathogenesis trigger event [6]. Besides the need to eliminate dying myelinating cells, phagocytosis has been shown to provide important signals for resolving inflammation. Our results have shown that the *Acsbg1* gene is modestly down-regulated in every mutant cells. Although non statistically significant, these results perfectly match the decreased expression observed in the white matter of patients with AMN or cALD [33]. Concerning *Cd1d1* expression that was found strongly increased in mutant cells (×7.37 in *Abcd1*$^{-/-}$/*Abcd2*$^{-/-}$), it suggests modifications in the ability of microglial cells to present lipid antigens to NKT cells. In patients, *CD1d* expression was found slightly decreased in B lymphocytes and unchanged in monocytes [57]. There was no difference in various cells of the *Abcd1* null mice [57] but *Cd1d1* expression was not investigated in *Abcd1/Abcd2* double-deficient mice. If *CD1d* polymorphism was positively associated with X-ALD, it failed to reach statistical significance like many linkage studies in rare disorders [34]. Our results suggest that further studies would be useful to test whether these results reflect species differences or confirm a role of the CD1d protein in the pathology. Finally, *Elovl7* was found up-regulated in every mutant cells, particularly in the *Abcd1*$^{-/-}$ and *Abcd1*$^{-/-}$/*Abcd2*$^{-/-}$ cells. A genome-wide association study concluded that *Elovl7* could be linked to multiple system atrophy, a progressive neurodegenerative disorder also known as Shy–Drager syndrome [58]. Further investigations in X-ALD patients should be carried out to confirm whether *Elovl7* is up-regulated and associated with the pathology.

Conclusion

In summary, by using CRISPR/Cas9 editing, we have generated 3 mutant microglial cell lines mutated in *Abcd1* and/or *Abcd2* genes. Preliminary characterization of the double mutant cell clone has confirmed the main biochemical observations made in tissues from *Abcd1*$^{-/-}$ mice models and skin fibroblasts of X-ALD patients, i.e. the accumulation of VLCFA. Ultrastructure analysis in this cell clone demonstrated mitochondrial modifications as well as the presence of striated and whorled lipid inclusions similar to those observed in brain macrophages of X-ALD patients. Of note, the comparison of the double mutant with the single mutant cell clones that demonstrated mild or intermediate biochemical and cellular phenotypes, will represent a good opportunity to better understand the specific roles of peroxisomal ABC transporters ABCD1 and ABCD2 and the consequences of their defects in microglial cells. Expression levels of key microglial genes as well as putative modifier genes in the context of X-ALD were found modified. Transcriptomic RNAseq analysis is in progress to confirm these observations and reveal putative other dysregulated genes involved in RedOx homeostasis, inflammatory responses, and unexplored pathways in relation with microglial functions. These novel cell models will offer the advantage to test the impact of ABCD1 and/or ABCD2 deficiency in a key cell type for

neurodegenerative process and to test original hypotheses on the involvement of peroxisome in phagocytosis, inflammatory and immune response. Microglial *Abcd1*$^{-/-}$ */Abcd2*$^{-/-}$ cells will offer opportunities to further progress in the understanding of the physiopathogenesis of X-ALD. The cells will also offer the opportunity to set up screening assays to identify corrective molecules with a therapeutic potential for X-ALD.

Acknowledgement

This work was supported by the Ministère de l'Education Nationale et de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche (France) and by institutional grants from INSERM, CNRS and Aix-Marseille University to the CIML. Quentin Raas received a fellowship from ARSEP (Association for Research on Multiple Sclerosis). We thank the DImaCell platform for technical assistance in TEM (Microscopy Centre INRA/uB) and the cytometry platform of Dijon for cell sorting (INSERM/UB). We acknowledge the PICSL imaging facility of the CIML (ImagImm), member of the national infrastructure France-BioImaging supported by the French National Research Agency (ANR-10-INBS-04). We thank Hai Tao He and Didier Marguet for hosting Quentin Raas for a few months at CIML.

References

[1] D. Trompier, S. Savary, X-linked Adrenoleukodystrophy, Morgan & Claypool Life Sciences, 2013.

[2] J. Mosser, A.M. Douar, C.O. Sarde, P. Kioschis, R. Feil, H. Moser, A.M. Poustka, J.L. Mandel, P. Aubourg, Putative X-linked adrenoleukodystrophy gene shares unexpected homology with ABC transporters, Nature 361 (1993) 726-730.

[3] D. Low, F. Ginhoux, Recent advances in the understanding of microglial development and homeostasis, Cell. Immunol. (2018).

[4] F.S. Eichler, J.Q. Ren, M. Cossoy, A.M. Rietsch, S. Nagpal, A.B. Moser, M.P. Frosch, R.M. Ransohoff, Is microglial apoptosis an early pathogenic change in cerebral X-linked adrenoleukodystrophy?, Ann. Neurol. 63 (2008) 729-742.

[5] N. Cartier, S. Hacein-Bey-Abina, C.C. Bartholomae, G. Veres, M. Schmidt, I. Kutschera, M. Vidaud, U. Abel, L. Dal-Cortivo, L. Caccavelli, N. Mahlaoui, V. Kiermer, D. Mittelstaedt, C. Bellesme, N. Lahlou, F. Lefrere, S. Blanche, M. Audit, E. Payen, P. Leboulch, B. l'Homme, P. Bougneres, C. Von Kalle, A. Fischer, M. Cavazzana-Calvo, P. Aubourg, Hematopoietic stem cell gene therapy with a lentiviral vector in X-linked adrenoleukodystrophy, Science 326 (2009) 818-823.

[6] Y. Gong, N. Sasidharan, F. Laheji, M. Frosch, P. Musolino, R. Tanzi, D.Y. Kim, A. Biffi, J. El Khoury, F. Eichler, Microglial dysfunction as a key pathological change in adrenomyeloneuropathy, Ann. Neurol. 82 (2017) 813-827.

[7] A.S. Paintlia, A.G. Gilg, M. Khan, A.K. Singh, E. Barbosa, I. Singh, Correlation of very long chain fatty acid accumulation and inflammatory disease progression in childhood X-ALD: implications for potential therapies., Neurobiol. Dis. 14 (2003) 425-439.

[8] G. Lombard-Platet, S. Savary, C.O. Sarde, J.L. Mandel, G. Chimini, 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 (1996) 1265-1269.

[9] A. Pujol, I. Ferrer, C. Camps, E. Metzger, C. Hindelang, N. Callizot, M. Ruiz, T. Pampols, M. Giros, J.L. Mandel, Functional overlap between ABCD1 (ALD) and ABCD2 (ALDR) transporters: a therapeutic target for X-adrenoleukodystrophy, Hum. Mol. Genet. 13 (2004) 2997-3006.

[10] E. Genin, F. Geillon, C. Gondcaille, A. Athias, P. Gambert, D. Trompier, S. Savary, Substrate Specificity Overlap and Interaction between Adrenoleukodystrophy Protein (ALDP/ABCD1) and Adrenoleukodystrophy-related Protein (ALDRP/ABCD2), J. Biol. Chem. 286 (2011) 8075-8084.

[11] A. Pujol, C. Hindelang, N. Callizot, U. Bartsch, M. Schachner, J.L. Mandel, Late onset neurological phenotype of the X-ALD gene inactivation in mice: a mouse model for adrenomyeloneuropathy., Hum. Mol. Genet. 11 (2002) 499-505.

[12] I. Ferrer, J.P. Kapfhammer, C. Hindelang, S. Kemp, N. Troffer-Charlier, V. Broccoli, N. Callyzot, P. Mooyer, J. Selhorst, P. Vreken, R.J. Wanders, J.L. Mandel, A. Pujol, Inactivation of the peroxisomal ABCD2 transporter in the mouse leads to late-onset ataxia involving mitochondria, Golgi and endoplasmic reticulum damage, Hum. Mol. Genet. 14 (2005) 3565-3577.

[13] S. Forss-Petter, H. Werner, J. Berger, H. Lassmann, B. Molzer, M.H. Schwab, H. Bernheimer, F. Zimmermann, K.A. Nave, Targeted inactivation of the X-linked adrenoleukodystrophy gene in mice, J. Neurosci. Res. 50 (1997) 829-843.

[14] T. Kobayashi, N. Shinnoh, A. Kondo, T. Yamada, Adrenoleukodystrophy protein-deficient mice represent abnormality of very long chain fatty acid metabolism, Biochem. Biophys. Res. Commun. 232 (1997) 631-636.

[15] J.F. Lu, A.M. Lawler, P.A. Watkins, J.M. Powers, A.B. Moser, H.W. Moser, K.D. Smith, A mouse model for X-linked adrenoleukodystrophy, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 94 (1997) 9366-9371.

[16] Z. Muneer, C. Wiesinger, T. Voigtlander, H.B. Werner, J. Berger, S. Forss-Petter, Abcd2 is a strong modifier of the metabolic impairments in peritoneal macrophages of abcd1-deficient mice, PLoS ONE 9 (2014) e108655.

[17] E. Blasi, R. Barluzzi, V. Bocchini, R. Mazzolla, F. Bistoni, Immortalization of murine microglial cells by a v-raf/v-myc carrying retrovirus, J. Neuroimmunol. 27 (1990) 229-237.

[18] A. Henn, S. Lund, M. Hedtjarn, A. Schrattenholz, P. Porzgen, M. Leist, The suitability of BV2 cells as alternative model system for primary microglia cultures or for animal experiments examining brain inflammation, ALTEX 26 (2009) 83-94.

[19] Q. Raas, F.E. Saih, C. Gondcaille, D. Trompier, Y. Hamon, V. Leoni, C. Caccia, B. Nasser, M. Jadot, F. Menetrier, G. Lizard, M. Cherkaoui-Malki, P. Andreoletti, S. Savary, A microglial cell model for acyl-CoA oxidase 1 deficiency, Biochimica et biophysica acta. Molecular and cell biology of lipids (2018). DOI: 10.1016/j.bbalip.2018.10.005

[20] M. Debbabi, T. Nury, I. Helali, E.M. Karym, F. Geillon, C. Gondcaille, D. Trompier, A. Najid, S. Terreau, M. Bezine, A. Zarrouk, A. Vejux, P. Andreoletti, M. Cherkaoui-Malki, S. Savary, G. Lizard, Flow Cytometric Analysis of the Expression Pattern of Peroxisomal Proteins, Abcd1, Abcd2, and Abcd3 in BV-2 Murine Microglial Cells, Methods Mol. Biol. 1595 (2017) 257-265.

[21] M. Jinek, K. Chylinski, I. Fonfara, M. Hauer, J.A. Doudna, E. Charpentier, A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity, Science 337 (2012) 816-821.

[22] F. Geillon, C. Gondcaille, S. Charbonnier, C.W. Van Roermund, T.E. Lopez, A.M.M. Dias, J.-P.P. de Barros, C. Arnould, R.J. Wanders, D. Trompier, S. Savary, Structure-Function Analysis of Peroxisomal ATP-binding Cassette Transporters Using Chimeric Dimers, J. Biol. Chem. 289 (2014) 24511-24520.

[23] V. Leoni, T. Nury, A. Vejux, A. Zarrouk, C. Caccia, M. Debbabi, A. Fromont, R. Sghaier, T. Moreau, G. Lizard, Mitochondrial dysfunctions in 7-ketocholesterol-treated 158N oligodendrocytes without or with alpha-tocopherol: Impacts on the cellular profil of tricarboxylic cycle-associated organic acids, long chain saturated and unsaturated fatty acids, oxysterols, cholesterol and cholesterol precursors, J. Steroid. Biochem. Mol. Biol. 169 (2017) 96-110.

[24] C. Gondcaille, E.C. Genin, T.E. Lopez, A.M.M. Dias, F. Geillon, P. Andreoletti, M. Cherkaoui-Malki, T. Nury, G. Lizard, I. Weinhofer, J. Berger, E.T. Kase, D. Trompier, S. Savary, LXR antagonists induce ABCD2 expression, Biochimica Et Biophysica Acta-Molecular and Cell Biology of Lipids 1841 (2014) 259-266.
[25] T.C. Hornik, U. Neniskyte, G.C. Brown, Inflammation induces multinucleation of Microglia via PKC inhibition of cytokinesis, generating highly phagocytic multinucleated giant cells, J. Neurochem. 128 (2014) 650-661.
[26] Y.M. Lim, H. Rutter, R. Killick, A. Hodges, CRISPR/Cas9-mediated gene editing of TREM2 in monocytic and microglial cel lines Alzheimers Dement. 13 (2017) P322.
[27] M.A. Kennedy, S.A. Rowland, A.L. Miller, C.M. Morris, L.A. Neville, A. Dodd, W.J. Fifield, D.R. Love, Structure and location of the murine adrenoleukodystrophy gene, Genomics 32 (1996) 395-400.
[28] S. Savary, N. TrofferCharlier, G. Gyapay, M. Mattei, G. Chimini, Chromosomal localization of the adrenoleukodystrophy-related gene in man and mice, Europ. J. Hum. Genet. 5 (1997) 99-101.
[29] M. Banerjee, F. Wiener, J. Spira, M. Babonits, M.G. Nilsson, J. Sumegi, G. Klein, Mapping of the c-myc, pvt-1 and immunoglobulin kappa genes in relation to the mouse plasmacytoma-associated variant (6;15) translocation breakpoint, EMBO J. 4 (1985) 3183-3188.
[30] M.A. Laurenzi, C. Arcuri, R. Rossi, P. Marconi, V. Bocchini, Effects of microenvironment on morphology and function of the microglial cell line BV-2, Neurochem. Res. 26 (2001) 1209-1216.
[31] T.R. Jay, V.E. von Saucken, G.E. Landreth, TREM2 in neurodegenerative diseases, Mol. Neurodegener. 12 (2017) 56.
[32] I. Weinhofer, B. Zierfuss, S. Hametner, M. Wagner, N. Popitsch, C. Machacek, B. Bartolini, G. Zlabinger, A. Ohradanova-Repic, H. Stockinger, W. Kohler, R. Hoftberger, G. Regelsberger, S. Forss-Petter, H. Lassmann, J. Berger, Impaired plasticity of macrophages in X-linked adrenoleukodystrophy, Brain (2018).
[33] M. Asheuer, I. Bieche, I. Laurendeau, A. Moser, B. Hainque, M. Vidaud, P. Aubourg, Decreased expression of ABCD4 and BG1 genes early in the pathogenesis of X-linked adrenoleukodystrophy, Hum. Mol. Genet. 14 (2005) 1293-1303.
[34] M. Barbier, A. Sabbagh, E. Kasper, M. Asheuer, O. Ahouansou, I. Pribill, S. Forss-Petter, M. Vidaud, J. Berger, P. Aubourg, CD1 gene polymorphisms and phenotypic variability in X-linked adrenoleukodystrophy, PLoS ONE 7 (2012) e29872.
[35] A. Kihara, Very long-chain fatty acids: elongation, physiology and related disorders, J. Biochem. 152 (2012) 387-395.
[36] J.G. Purdy, T. Shenk, J.D. Rabinowitz, Fatty acid elongase 7 catalyzes lipidome remodeling essential for human cytomegalovirus replication, Cell Rep. 10 (2015) 1375-1385.
[37] N. Launay, C. Aguado, S. Fourcade, M. Ruiz, L. Grau, J. Riera, C. Guilera, M. Giros, I. Ferrer, E. Knecht, A. Pujol, Autophagy induction halts axonal degeneration in a mouse model of X-adrenoleukodystrophy, Acta Neuropathol. (Berl) 129 (2015) 399-415.
[38] R. Ofman, I.M. Dijkstra, C.W. van Roermund, N. Burger, M. Turkenburg, A. van Cruchten, C.E. van Engen, R.J. Wanders, S. Kemp, The role of ELOVL1 in very long-chain fatty acid homeostasis and X-linked adrenoleukodystrophy, EMBO Mol. Med. 2 (2010) 90-97.
[39] J. Lopez-Erauskin, J. Galino, P. Bianchi, S. Fourcade, A.L. Andreu, I. Ferrer, C. Munoz-Pinedo, A. Pujol, Oxidative stress modulates mitochondrial failure and cyclophilin D function in X-linked adrenoleukodystrophy, Brain 135 (2012) 3584-3598.
[40] S. Fourcade, J. Lopez-Erauskin, M. Ruiz, I. Ferrer, A. Pujol, Mitochondrial dysfunction and oxidative damage cooperatively fuel axonal degeneration in X-linked adrenoleukodystrophy, Biochimie 98 (2014) 143-149.
[41] E.B. Button, A.S. Mitchell, M.M. Domingos, J.H. Chung, R.M. Bradley, A. Hashemi, P.M. Marvyn, A.C. Patterson, K.D. Stark, J. Quadrilatero, R.E. Duncan, Microglial cell activation increases saturated and decreases monounsaturated fatty acid content, but both lipid species are proinflammatory, Lipids 49 (2014) 305-316.
[42] S. Savary, D. Trompier, P. Andreoletti, F. Le Borgne, J. Demarquoy, G. Lizard, Fatty Acids - Induced Lipotoxicity and Inflammation, Curr. Drug Metab. 13 (2012) 1358-1370.
[43] N.G. Bazan, Docosanoids and elovanoids from omega-3 fatty acids are pro-homeostatic modulators of inflammatory responses, cell damage and neuroprotection, Mol. Aspects Med. (2018).
[44] K. Hama, Y. Fujiwara, M. Morita, F. Yamazaki, Y. Nakashima, S. Takei, S. Takashima, M. Setou, N. Shimozawa, T. Imanaka, K. Yokoyama, Profiling and Imaging of Phospholipids in Brains of Abcd1-Deficient Mice, Lipids 53 (2018) 85-102.
[45] C.W. van Roermund, W.F. Visser, L. Ijlst, H.R. Waterham, R.J. Wanders, Differential substrate specificities of human ABCD1 and ABCD2 in peroxisomal fatty acid beta-oxidation, Biochim. Biophys. Acta 1811 (2011) 148-152.
[46] S. Fourcade, M. Ruiz, C. Camps, A. Schluter, S.M. Houten, P.A. Mooyer, T. Pampols, G. Dacremont, R.J. Wanders, M. Giros, A. Pujol, A key role for the peroxisomal ABCD2 transporter in fatty acid homeostasis, Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab. 296 (2009) E211-221.
[47] J. Liu, N.S. Sabeva, S. Bhatnagar, X.A. Li, A. Pujol, G.A. Graf, ABCD2 is abundant in adipose tissue and opposes the accumulation of dietary erucic acid (C22:1) in fat, J. Lipid Res. 51 (2010) 162-168.
[48] H.H. Schaumburg, J.M. Powers, K. Suzuki, C.S. Raine, Adreno-leukodystrophy (sex-linked Schilder disease). Ultrastructural demonstration of specific cytoplasmic inclusions in the central nervous system, Arch. Neurol. 31 (1974) 210-213.
[49] J.M. Powers, H.H. Schaumburg, Adreno-leukodystrophy (sex-linked Schilder's disease). A pathogenetic hypothesis based on ultrastructural lesions in adrenal cortex, peripheral nerve and testis, Am. J. Pathol. 76 (1974) 481-491.
[50] M. Igarashi, H.H. Schaumburg, J. Powers, Y. Kishmoto, E. Kolodny, K. Suzuki, Fatty acid abnormality in adrenoleukodystrophy, J. Neurochem. 26 (1976) 851-860.
[51] G. Kellner-Weibel, B. McHendry-Rinde, M.P. Haynes, S. Adelman, Evidence that newly synthesized esterified cholesterol is deposited in existing cytoplasmic lipid inclusions, J. Lipid Res. 42 (2001) 768-777.
[52] D. Trompier, C. Gondcaille, G. Lizard, S. Savary, Regulation of the adrenoleukodystrophy-related gene (ABCD2): Focus on oxysterols and LXR antagonists, Biochem. Biophys. Res. Commun. 446 (2014) 651-655.
[53] I. Weinhofer, S. Forss-Petter, M. Zigman, J. Berger, Cholesterol regulates ABCD2 expression: implications for the therapy of X-linked adrenoleukodystrophy, Hum. Mol. Genet. 11 (2002) 2701-2708.
[54] I. Weinhofer, M. Kunze, H. Rampler, A.L. Bookout, S. Forss-Petter, J. Berger, Liver X receptor alpha interferes with SREBP1c-mediated Abcd2 expression. Novel cross-talk in gene regulation, J. Biol. Chem. 280 (2005) 41243-41251.
[55] M. Engelen, R. Ofman, P.A. Mooijer, B.T. Poll-The, R.J. Wanders, S. Kemp, Cholesterol-deprivation increases mono-unsaturated very long-chain fatty acids in skin fibroblasts from patients with X-linked adrenoleukodystrophy, Biochim. Biophys. Acta 1781 (2008) 105-111.
[56] I. Weinhofer, S. Forss-Petter, M. Kunze, M. Zigman, J. Berger, X-linked adrenoleukodystrophy mice demonstrate abnormalities in cholesterol metabolism, FEBS Lett. 579 (2005) 5512-5516.
[57] A.S. Gautron, B. Giquel, L. Beaudoin, E. Autrusseau, A. Speak, F. Platt, S. Kemp, A. Pujol, P. Aubourg, A. Lehuen, Invariant NKT cells in adrenoleukodystrophy patients and mice, J. Neuroimmunol. 229 (2010) 204-211.
[58] A. Sailer, S.W. Scholz, M.A. Nalls, C. Schulte, M. Federoff, T.R. Price, A. Lees, O.A. Ross, D.W. Dickson, K. Mok, N.E. Mencacci, L. Schottlaender, V. Chelban, H. Ling, S.S. O'Sullivan, N.W. Wood, B.J. Traynor, L. Ferrucci, H.J. Federoff, T.R. Mhyre, H.R. Morris, G. Deuschl, N. Quinn, H. Widner, A. Albanese, J. Infante, K.P. Bhatia, W. Poewe, W. Oertel, G.U. Hoglinger, U. Wullner, S. Goldwurm, M.T. Pellecchia, J. Ferreira, E. Tolosa, B.R. Bloem, O. Rascol, W.G. Meissner, J.A. Hardy, T. Revesz, J.L. Holton, T. Gasser, G.K. Wenning, A.B. Singleton, H. Houlden, G. European Multiple System Atrophy Study, U.K.M.S.A.S.G. the, A genome-wide association study in multiple system atrophy, Neurol. 87 (2016) 1591-1598.

I.4. Discussion annexe aux articles

Deux stratégies de génération de modèles cellulaires déficients en protéines peroxysomales par la technique CRISPR-Cas9 à partir de la lignée de cellules microgliales murines BV-2 ont été utilisées avec succès. Ces deux stratégies, reposant soit sur une insertion par recombinaison homologue (utilisée pour le clone *Acox1*$^{-/-}$*)*, soit sur la réparation non-homologue (utilisée pour les clones *Abcd1*$^{-/-}$, *Abcd2*$^{-/-}$ et double mutant) ont permis de sélectionner des cellules présentant les inactivations géniques recherchées. La stratégie utilisant la recombinaison homologue, initialement prévue pour la sélection de tous les clones, présente l'inconvénient de sélectionner très fortement les cellules ayant un avantage de croissance, du fait de la double sélection antibiotique (étalée sur 2 semaines) et du clonage après tri cellulaire. Cette sélection importante a pour inconvénient majeur de limiter fortement l'hétérogénéité des génotypes parmi les cellules obtenues. En effet, après avoir réalisé la sélection des clones déficients en ACOX1, parmi les 52 clones dont le génotype a été testé, pas plus de 3 génotypes différents ont pu être observés et un seul de ces génotypes correspondait à une inactivation bi-allélique du gène *Acox1*. Cette inefficacité dans l'obtention de clones déficients distincts nous a conduit à mettre de côté la recombinaison homologue et la sélection antibiotique. La seconde stratégie permet de contourner ces problèmes mais, en contrepartie, résulte en une moindre efficacité et une plus faible fréquence d'obtention des mutations souhaitées. Plusieurs tentatives ont été effectuées et plusieurs mois de mise au point ont été nécessaires pour obtenir les clones cellulaires dont la caractérisation a été présentée (le clone double-déficient pour ABCD1 et ABCD2 n'a été obtenu qu'en septembre 2017). Malheureusement, les criblages et génotypages effectués jusqu'à présent n'ont permis de retenir que peu de clones et de ne caractériser qu'un seul clone par génotype.

Des anomalies de caryotype, d'ailleurs fréquentes dans de nombreuses lignées cellulaires, ont pu être observées dans les cellules BV-2. Elles sont susceptibles d'être associées à la capacité des cellules microgliales à présenter plusieurs noyaux (cellules multi-nucléées) ou pourraient être liées à la technique d'immortalisation de ces cellules par v-myc. Le caryotypage des cellules BV-2 WT et déficientes est en cours au laboratoire de cytogénétique du CHU de Dijon (collaboration avec le Dr. Patrick Callier). Ce laboratoire, non spécialiste de la souris, nous a pour l'instant fourni des résultats partiels et préliminaires qui sont en cours de confirmation à l'aide la technique de peinture chromosomique (multi-FISH). A l'heure actuelle, l'analyse préliminaire démontre la présence de nombreux chromosomes additionnels mais ne montre apparemment pas de différences entre les cellules

déficientes et les cellules sauvages. Cela indique qu'il n'y a pas eu de variation du nombre de chromosomes en lien avec la stratégie de sélection et d'édition génétique CRISPR-Cas9. Ces anomalies de caryotype ont rendu l'interprétation des résultats de génotypages plus complexe que prévu. En effet, l'incapacité à déterminer le génotype exact du fait d'une polyploïdie probable a conduit à l'élimination d'un grand nombre de clones sélectionnés.

II. Conséquences fonctionnelles des déficiences peroxysomales dans les cellules microgliales

II.1. Profils transcriptomiques des cellules déficientes

Les modèles cellulaires présentés dans ces deux articles ont été l'objet d'une étude plus approfondie pour comprendre les conséquences des inactivations géniques sur leurs fonctions cellulaires. En partenariat avec la plateforme de séquençage de l'Institut de génétique et de biologie moléculaire et cellulaire de Strasbourg, GenomEast, l'analyse transcriptomique des cellules BV-2 WT et déficientes en ACOX1, ABCD1, ABCD2 et double-déficientes en ABCD1 et ABCD2, traitées ou non, a été réalisée par séquençage aléatoire du transcriptome (RNAseq).

L'analyse a été effectuée sur les ARN totaux des cellules récupérés après 24 h de traitement LPS (1 µg/ml), ou acide hexacosanoïque (C26:0) 10 µM, ou 25-hydroxycholestérol (25HC) 10 µM, ou bien LPS et C26:0 combinés, ou LPS et 25HC combinés ou bien de véhicule pour la condition contrôle. Cela représente 6 conditions différentes de traitement pour les 5 lignées cellulaires différentes, ce qui fait au total 30 points d'analyse distincts, sachant que des triplicats biologiques sont réalisés pour chaque point d'analyse. Les véhicules choisis pour permettre la solubilisation du 25HC et du C26:0 sont l'éthanol (0,1%) et l'α-cyclodextrine (0,5 mM) respectivement. Afin de réduire le nombre de conditions contrôles dans cette étude, un véhicule commun à toutes les conditions de culture a été choisi et correspond à la combinaison éthanol 0,1%, α-cyclodextrine 0,5 mM. L'α-cyclodextrine forme des complexes avec les lipides très apolaires et présente la capacité d'extraire certains lipides membranaires. Bien qu'un effet du véhicule ne puisse être exclu à la dose utilisée, aucune toxicité cellulaire n'a pu être observée par mesure d'expression génique ou par analyse ultra-structurale en microscopie électronique (données non présentées).

Les ARNs de trois expériences indépendantes ont été purifiés à l'aide d'un kit RNeasy (Qiagen) et retro-transcrits en ADN complémentaire pour contrôler leur qualité et les effets

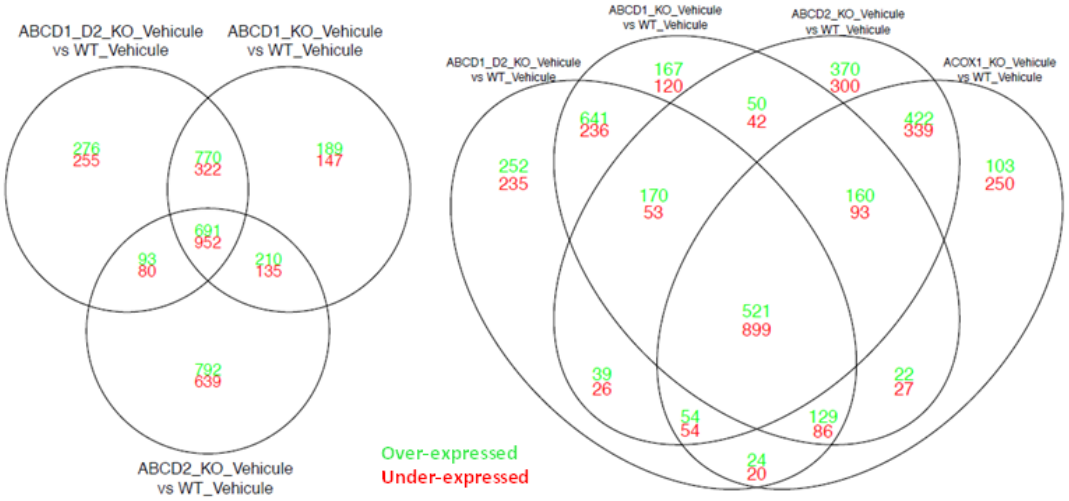
des traitements par RT-qPCR (l'analyse a porté sur quelques gènes connus pour répondre à ces traitements, par exemple *Nos2*, *Gpx, Sod2 Abcd2)*. La qualité et la quantité des ARN ont été contrôlées et les traitements LPS et 25HC ont ainsi pu être validés. En revanche, aucune certitude n'a pu être obtenue pour le traitement C26:0. La décision a néanmoins été prise d'envoyer les ARN à la plateforme de séquençage de Strasbourg. L'analyse transcriptomique des cellules traitées par le C26:0 n'a malheureusement pas permis de tirer de conclusion sur les effets d'une plus forte accumulation d'AGTLC dans ces cellules. Les comparaisons au véhicule démontrent des profils quasi-identiques et ne permettent pas d'identifier un effet du traitement (l'analyse statistique indique une absence de différences entre les profils comparés). Des tests réalisés a posteriori semblent indiquer que, malgré l'utilisation d'un protocole de solubilisation déjà éprouvé et basé sur l'utilisation d'α-cyclodextrine, la solubilisation du C26:0 a été hélas insuffisante.

Au sein de la plateforme de séquençage, les librairies d'ARN ont ensuite été générées à l'aide d'un kit Trueseq (Illumina), avant d'être retro transcrites en ADN complémentaire et enrichies par PCR. La technologie Illumina HiSeq 4000 Sequencing a été utilisée pour le séquençage. Il convient de noter que l'analyse biostatistique portant sur la comparaison des résultats obtenus dans cette étude transcriptomique a permis de générer énormément de données. Pour des questions de temps et par souci de clarté, seulement une dizaine de comparaisons, sur la soixantaine que nous avons reçues, ont pu être analysées et sont présentées ici.

Cette approche non-biaisée couplée à l'importante reproductibilité des expériences de cultures cellulaires permet d'identifier un très grand nombre de gènes différentiellement exprimés. Ainsi, en condition standard (véhicule), plus de 3000 gènes sont régulés positivement ou négativement dans chacune des lignées déficientes par comparaison aux cellules BV-2 WT (Figure 9). Les nombres de gènes différentiellement exprimés, uniques ou communs aux différents génotypes sont présentés sous-forme d'un diagramme de Venn. Dans chacun des modèles cellulaires déficients, près de 40% de ces gènes régulés sont communs aux 4 lignées déficientes.

A

Name of the comparison (A vs B)	Number of over-expressed genes (A>B)	Number of under-expressed genes (A<B)	Number of significantly differentially expressed genes
ABCD1_D2_KO_Vehicule vs WT_Vehicule	1830	1609	3439
ABCD1_KO_Vehicule vs WT_Vehicule	1860	1556	3416
ABCD2_KO_Vehicule vs WT_Vehicule	1786	1806	3592
ACOX1_KO_Vehicule vs WT_Vehicule	1435	1768	3203
ABCD1_KO_Vehicule vs ABCD1_D2_KO_Vehicule	172	95	267
ABCD2_KO_Vehicule vs ABCD1_D2_KO_Vehicule	1022	1253	2275
ABCD1_KO_Vehicule vs ABCD2_KO_Vehicule	1045	740	1785
ABCD1_D2_KO_Vehicule vs ACOX1_KO_Vehicule	1324	668	1992
ABCD1_KO_Vehicule vs ACOX1_KO_Vehicule	1180	433	1613
ABCD2_KO_Vehicule vs ACOX1_KO_Vehicule	270	60	330



B

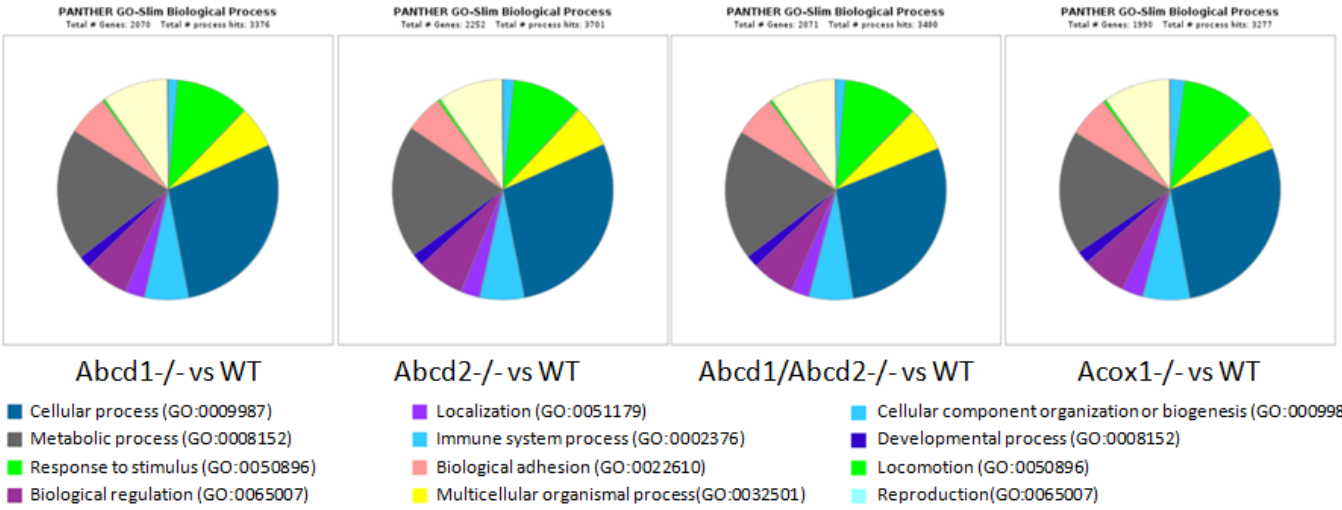


Figure 9 : Analyse des gènes différentiellement exprimés dans les cellules BV-2 WT et déficientes en condition standard.

Tableau présentant le nombre de gènes positivement ou négativement régulés pour chaque comparaison. Répartition des gènes négativement ou positivement régulés au sein des cellules BV-2 déficientes en ABCD1, ABCD2, ABCD1/ABCD2 ou ACOX1 par comparaison aux cellules BV-2 WT. Les gènes négativement (rouge) ou positivement (vert) régulés communs aux différents KO sont présentés sous-forme d'un diagramme de Venn (A). Répartition des 3436 gènes différentiellement exprimés dans les 4 KO en termes de « Gene Ontology-Biological Process » à l'aide du système de classification Panther (B). Le seuil de significativité est fixé tel que : valeur p ajustée <0.05 et |log2(KO/WT)|>1.

Les termes GO-BP ont été utilisés dans cette étude (Figure 9B) pour préciser les voies de signalisation et processus cellulaire associés à ces régulations géniques. Gene Ontology (GO) est un système visant à intégrer les relations et concepts associés aux fonctions des gènes. Ce système s'attache à décrire les fonctions de gènes selon des aspects moléculaires (« molecular function »), selon leur compartimentation cellulaire (« cellular component ») et selon les processus biologiques dans lesquels ils sont impliqués (« biological process » ou BP). Les listes des gènes régulés définies pour chacune des conditions comparées permettent d'évaluer l'enrichissement pour chaque terme de GO-BP puis une analyse statistique permet de déterminer quels sont les termes de GO-BP pour lesquels l'enrichissement est le plus pertinent. Une analyse faite à l'aide de la base de données et de l'algorithme PANTHER (« Protein ANalysis THrough Evolutionary Relationships »), montre des répartitions semblables des termes généraux de GO-BP au sein des listes de gènes connus pour chacune des 4 comparaisons de génotype (Figure 9). Cette répartition, au premier abord comparable, reste à relativiser compte tenu du grand nombre de gènes analysés. Les cellules déficientes en ABCD1, ABCD2, ABCD1 et ABCD2 ou ACOX1 présentent un enrichissement significatif (p value < 0.1) pour 331, 371, 370 et 406 termes de GO-BP respectivement par comparaison aux cellules WT. Parmi les 10 termes de GO-BP dont l'enrichissement est le plus significatif, les termes « immune system process », « inflammatory response » et « positive regulation of cell migration » sont les plus représentés (Tableau 5). Ces termes sont fortement susceptibles de traduire une atteinte de la réponse immunitaire des cellules microgliales consécutive à l'inactivation des gènes *ABCD1, ABCD2* ou *ACOX1*. Bien que le défaut métabolique semble moins représenté parmi les termes les plus enrichis, le terme « fatty acid metabolic process » (GO:0006631) apparaît également avec un enrichissement significatif dans les 4 lignées déficientes (valeur p=0,035 pour *Abcd1*$^{-/-}$; p=0,031 pour *Abcd2*$^{-/-}$, p=0,003 pour *Abcd1*$^{-/-}$ /*Abcd2*$^{-/-}$, p=0,005 *pour Acox1*$^{-/-}$). Enfin, l'hypothèse d'une accumulation de cholestérol sous forme estérifiée dans les cellules *Abcd1*$^{-/-}$ évoquée dans l'article soumis à BBA « CRISPR/Cas9-mediated knockout of *Abcd1* and *Abcd2* genes in BV-2 cells: novel microglial models for X-linked Adrenoleukodystrophy » semble pertinente de par la présence du terme « positive regulation of cholesterol esterification » (GO:0010873) parmi les termes significativement enrichis dans les cellules déficientes en ABCD1 (p=0,041).

Abcd1-/- vs WT				Abcd2-/- vs WT			
Top 10 Term	GOTERM_BiologicalProcess_DIRECT	# genes (/2191)	PValue	Top 10 Term	GOTERM_BiologicalProcess_DIRECT	# genes (/2367)	PValue
GO:0002376	immune system process	93	5.25E-11	GO:0002376	immune system process	108	5.38E-15
GO:0007275	multicellular organism development	184	3.21E-08	GO:0006954	inflammatory response	84	1.44E-08
GO:0042127	regulation of cell proliferation	58	4.72E-08	GO:0007155	cell adhesion	107	4.52E-08
GO:0030335	positive regulation of cell migration	52	2.32E-07	GO:0030335	positive regulation of cell migration	54	4.31E-07
GO:0007399	nervous system development	80	6.24E-07	GO:0016310	phosphorylation	121	2.60E-06
GO:0006954	inflammatory response	72	4.01E-06	GO:0050830	defense response to Gram-positive bacterium	30	4.33E-06
GO:0006816	calcium ion transport	37	8.94E-06	GO:0019882	antigen processing and presentation	21	7.46E-06
GO:0006955	immune response	59	1.08E-05	GO:0042102	positive regulation of T cell proliferation	23	1.08E-05
GO:0010628	positive regulation of gene expression	79	1.14E-05	GO:0006629	lipid metabolic process	93	1.54E-05
GO:0009615	response to virus	26	1.24E-05	GO:0009615	response to virus	27	1.54E-05

Abcd1/Abcd2-/- vs WT				Acox1-/- vs WT			
Top 10 Term	GOTERM_BiologicalProcess_DIRECT	# genes (/2183)	PValue	Top 10 Term	GOTERM_BiologicalProcess_DIRECT	# genes (/2065)	PValue
GO:0002376	immune system process	105	3.97E-16	GO:0002376	immune system process	102	2.7E-16
GO:0007275	multicellular organism development	185	1.48E-08	GO:0007155	cell adhesion	104	2.3E-10
GO:0006954	inflammatory response	77	9.68E-08	GO:0030335	positive regulation of cell migration	52	3.5E-08
GO:0006955	immune response	64	2.04E-07	GO:0032729	positive regulation of interferon-gamma production	22	8.3E-08
GO:0042127	regulation of cell proliferation	54	1.42E-06	GO:0006954	inflammatory response	73	2.2E-07
GO:0007155	cell adhesion	95	1.86E-06	GO:0050830	defense response to Gram-positive bacterium	30	2.6E-07
GO:0030335	positive regulation of cell migration	49	3.00E-06	GO:0097192	extrinsic apoptotic signaling pathway in abs. of ligan	18	1.4E-06
GO:0006816	calcium ion transport	37	8.23E-06	GO:0045087	innate immune response	78	2.6E-06
GO:0030154	cell differentiation	133	2.97E-05	GO:0007275	multicellular organism development	166	2.8E-06
GO:0006468	protein phosphorylation	103	3.95E-05	GO:0006955	immune response	58	3.7E-06

Tableau 5 : Analyse d'enrichissement en termes « Gene Ontology-Biological Process » des gènes différentiellement exprimés dans les cellules BV-2 déficientes par rapport aux cellules WT, en condition standard.
Liste des 10 termes de « Gene Ontology-Biological Process » présentant les enrichissements les plus significatifs parmi les gènes différentiellement exprimés dans chacun des KO par comparaison aux cellules BV-2 WT. Les analyses ont été réalisées à l'aide de la base de données bioinformatique DAVID 6.8. Le seuil de significativité est fixé tel que : p value ajustée <0.05 et |log2(KO/WT)|>1.

En parallèle, un second outil bioinformatique, « KEGG pathway », a été utilisé pour mettre en évidence des voies de signalisation affectées dans ces cellules. L'analyse « KEGG pathway » de ces mêmes listes de gènes indique des dérégulations de voies associées à une réponse inflammatoire comme les voies de signalisation NF-κB ou TNFα (Tableau 6). Cette analyse permet également d'identifier une altération des processus cellulaires associés aux lysosomes et aux phagosomes dans les 4 lignées déficientes. Ces termes semblent particulièrement pertinents vis-à-vis de l'hypothèse émise concernant l'atteinte des fonctions de phagocytose des cellules microgliales et sont revus plus loin dans la discussion.

Abcd1-/- vs WT			
Term	KEGG_PATHWAY	# genes /908	PValue
mmu04514	Cell adhesion molecules (CAMs)	42	1.08E-06
mmu04060	Cytokine-cytokine receptor interaction	53	1.22E-05
mmu04668	TNF signaling pathway	28	1.09E-04
mmu04010	MAPK signaling pathway	47	0.00152
mmu04064	NF-kappa B signaling pathway	23	0.00162
mmu04310	Wnt signaling pathway	29	0.00343
mmu04911	Insulin secretion	20	0.00448
mmu04142	Lysosome	25	0.00729
mmu04145	Phagosome	32	0.01119
mmu04810	Regulation of actin cytoskeleton	37	0.01601
mmu04062	Chemokine signaling pathway	34	0.02024
mmu00910	Nitrogen metabolism	6	0.04101
mmu04620	Toll-like receptor signaling pathway	19	0.04561
mmu00561	Glycerolipid metabolism	12	0.07214
mmu04151	PI3K-Akt signaling pathway	51	0.08351

Abcd2-/- vs WT			
Term	KEGG_PATHWAY	# genes /1016	PValue
mmu04514	Cell adhesion molecules (CAMs)	47	1.70E-07
mmu04145	Phagosome	48	6.29E-07
mmu04142	Lysosome	36	3.93E-06
mmu04060	Cytokine-cytokine receptor interaction	56	3.33E-05
mmu04010	MAPK signaling pathway	52	9.97E-04
mmu00565	Ether lipid metabolism	15	0.00105
mmu04612	Antigen processing and presentation	22	0.00167
mmu04668	TNF signaling pathway	26	0.00335
mmu00564	Glycerophospholipid metabolism	23	0.00442
mmu04070	Phosphatidylinositol signaling system	23	0.00657
mmu00562	Inositol phosphate metabolism	18	0.00790
mmu00603	Glycosphingolipid biosynthesis	7	0.00885
mmu00600	Sphingolipid metabolism	13	0.01891
mmu04064	NF-kappa B signaling pathway	21	0.02561
mmu03320	PPAR signaling pathway	18	0.02886

Abcd1/Abcd2-/- vs WT			
Term	KEGG_PATHWAY	# genes /926	PValue
mmu04060	Cytokine-cytokine receptor interaction	54	1.00E-05
mmu04514	Cell adhesion molecules (CAMs)	40	1.16E-05
mmu04310	Wnt signaling pathway	33	2.28E-04
mmu04668	TNF signaling pathway	27	3.81E-04
mmu04010	MAPK signaling pathway	50	3.87E-04
mmu04151	PI3K-Akt signaling pathway	60	0.00392
mmu04064	NF-kappa B signaling pathway	22	0.00471
mmu04620	Toll-like receptor signaling pathway	22	0.00764
mmu04142	Lysosome	25	0.00925
mmu04660	T cell receptor signaling pathway	22	0.01070
mmu04911	Insulin secretion	18	0.02474
mmu00603	Glycosphingolipid biosynthesis	6	0.02620
mmu04612	Antigen processing and presentation	17	0.03218
mmu04145	Phagosome	30	0.03983747
mmu04144	Endocytosis	44	0.04546271

Acox1-/- vs WT			
Term	KEGG_PATHWAY	# genes /887	PValue
mmu04514	Cell adhesion molecules (CAMs)	43	2.06E-07
mmu04060	Cytokine-cytokine receptor interaction	57	2.18E-07
mmu04145	Phagosome	41	1.03E-05
mmu04010	MAPK signaling pathway	53	1.62E-05
mmu04668	TNF signaling pathway	28	7.28E-05
mmu04142	Lysosome	28	5.29E-04
mmu04064	NF-kappa B signaling pathway	23	0.00119
mmu04612	Antigen processing and presentation	19	0.00468
mmu00564	Glycerophospholipid metabolism	19	0.01937
mmu00603	Glycosphingolipid biosynthesis	6	0.02209
mmu01040	Biosynthesis of unsaturated fatty acids	8	0.02901
mmu04151	PI3K-Akt signaling pathway	53	0.02963
mmu03320	PPAR signaling pathway	16	0.03675
mmu04062	Chemokine signaling pathway	32	0.03889226
mmu01212	Fatty acid metabolism	11	0.06142208

Tableau 6 : Analyse d'enrichissement en termes « KEGG Pathway » des gènes différentiellement exprimés dans les cellules BV-2 déficientes par rapport aux cellules WT, en condition standard.
Liste de 15 termes issus de l'analyse « KEGG Pathway » significativement enrichis parmi les gènes différentiellement exprimés dans chacun des KO par comparaison aux cellules BV-2 WT. Les analyses ont été réalisées à l'aide de la base de données bioinformatique DAVID 6.8. Le seuil de significativité est fixé tel que : valeur p ajustée <0.05 et |log2(KO/WT)|>1.

Le LPS est une molécule couramment utilisée expérimentalement pour induire une réponse inflammatoire. Le LPS d'E. coli O55:B5 a été donc employé dans plusieurs de nos expériences à la dose de 1 µg/ml durant 24 heures. Bien que cette dose semble particulièrement élevée, aucune atteinte de la viabilité cellulaire des cellules BV-2 n'a pu être observée. D'autre part, le suivi cinétique de l'expression des cytokines pro-inflammatoires TNFα et IL-1β dans ces cellules indique des niveaux d'expression élevés et comparables entre 6 et 24 heures après le début du traitement (données non-présentées). L'étude transcriptomique réalisée permet donc également d'évaluer la capacité des cellules microgliales BV-2 WT et déficientes à induire une réponse pro-inflammatoire spécifique en réponse au LPS. L'analyse en termes de GO-BP à l'aide de l'algorithme PANTHER des gènes régulés par le LPS montre une répartition comparable des termes généraux pour les cellules BV-2 quel que soit le génotype (Figure 10B).

A

Name of the comparison (A vs B)	Number of over-expressed genes (A>B)	Number of under-expressed genes (A<B)	Number of significantly differentially expressed genes
WT_25HC vs WT_Vehicule	256	95	351
WT_25HC_plus_LPS vs WT_Vehicule	615	366	981
WT_Vehicule_plus_LPS vs WT_Vehicule	516	375	891
ABCD1_D2_KO_25HC vs ABCD1_D2_KO_Vehicule	154	76	230
ABCD1_D2_KO_25HC_plus_LPS vs ABCD1_D2_KO_Vehicule	1282	669	1951
ABCD1_D2_KO_Vehicule_plus_LPS vs ABCD1_D2_KO_Vehicule	1207	516	1723
ABCD1_KO_25HC vs ABCD1_KO_Vehicule	123	160	283
ABCD1_KO_25HC_plus_LPS vs ABCD1_KO_Vehicule	1092	781	1873
ABCD1_KO_Vehicule_plus_LPS vs ABCD1_KO_Vehicule	1014	574	1588
ABCD2_KO_25HC vs ABCD2_KO_Vehicule	547	568	1115
ABCD2_KO_25HC_plus_LPS vs ABCD2_KO_Vehicule	1318	1246	2564
ABCD2_KO_Vehicule_plus_LPS vs ABCD2_KO_Vehicule	962	805	1767
ACOX1_KO_25HC vs ACOX1_KO_Vehicule	683	506	1189
ACOX1_KO_25HC_plus_LPS vs ACOX1_KO_Vehicule	1927	1468	3395
ACOX1_KO_Vehicule_plus_LPS vs ACOX1_KO_Vehicule	1352	744	2096

B

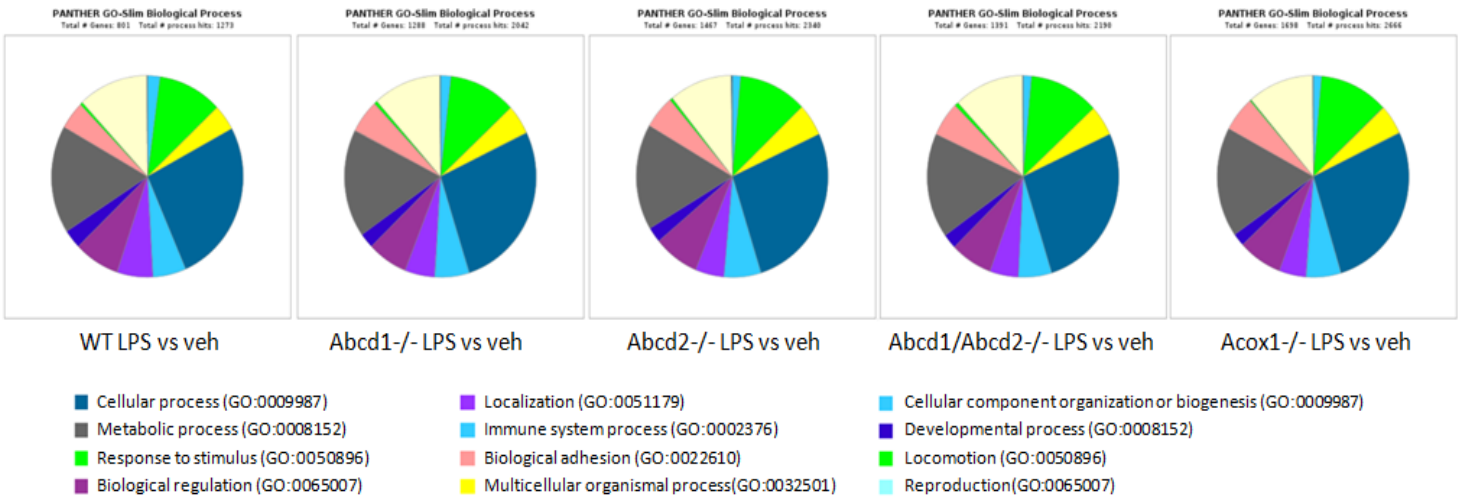


Figure 10 : Analyse des gènes différentiellement exprimés dans les cellules BV-2 WT et KO suite au traitement des cellules par le LPS ou le 25HC.
Répartition des gènes négativement ou positivement régulés au sein des cellules BV-2 WT ou déficientes en ABCD1, ABCD2 ou ACOX1 suite au traitement par le LPS ou le 25HC, par comparaison aux mêmes cellules en condition standard (A). Répartition des gènes différentiellement exprimés en réponse au LPS pour chaque génotype en termes de « Gene Ontology-Biological Process » à l'aide du système de classification Panther (B). Le seuil de significativité est fixé tel que : valeur p ajustée <0.05 et |log2(KO/WT)|>1.

Les termes présentant l'enrichissement le plus significatif comprennent assez logiquement les termes « immune system process », « inflammatory response », « innate immune response », « response to LPS » ou « cellular response to LPS » (Tableau 7) vu que les cellules ont préalablement été traitées au LPS. L'expression des principaux gènes affectés par la réponse au LPS est détaillée et discutée plus loin dans cette partie.

WT vs + LPS			
Term	GOTERM_BiologicalProcess	Count	PValue
GO:0002376	immune system process	76	4.00E-33
GO:0006954	inflammatory response	62	1.16E-24
GO:0009615	response to virus	32	4.13E-23
GO:0045087	innate immune response	64	1.39E-22
GO:0006955	immune response	44	9.88E-16
GO:0051607	defense response to virus	33	1.96E-14
GO:0071346	cellular response to IFN-gamma	22	2.90E-14
GO:0032496	response to LPS	34	4.16E-13
GO:0006935	chemotaxis	26	1.37E-12
GO:0042832	defense response to protozoan	14	1.69E-11

Abcd1-/- vs + LPS			
Term	GOTERM_BiologicalProcess	Count	PValue
GO:0002376	immune system process	101	1.82E-37
GO:0045087	innate immune response	84	6.96E-24
GO:0006954	inflammatory response	76	4.76E-23
GO:0006955	immune response	66	2.14E-22
GO:0009615	response to virus	36	3.31E-21
GO:0051607	defense response to virus	47	7.57E-19
GO:0035458	cellular response to IFN-beta	21	2.71E-14
GO:0042832	defense response to protozoan	17	1.78E-12
GO:0032496	response to LPS	42	2.07E-12
GO:0045071	negative regulation of viral genc	17	6.56E-12

Abcd2-/- vs + LPS			
Term	GOTERM_BiologicalProcess	Count	PValue
GO:0002376	immune system process	100	6.45E-32
GO:0006954	inflammatory response	92	3.14E-30
GO:0045087	innate immune response	84	3.13E-20
GO:0006955	immune response	64	4.03E-18
GO:0009615	response to virus	30	1.03E-13
GO:0071356	cellular response to TNF	33	1.20E-12
GO:0006935	chemotaxis	33	9.64E-12
GO:0051607	defense response to virus	38	1.54E-10
GO:0071222	cellular response to LPS	43	2.39E-10
GO:0007165	signal transduction	145	4.27E-10

Abcd1/Abcd2-/- vs + LPS			
Term	GOTERM_BiologicalProcess	Count	PValue
GO:0002376	immune system process	106	1.64E-38
GO:0006954	inflammatory response	79	4.52E-23
GO:0009615	response to virus	38	2.84E-22
GO:0045087	innate immune response	84	8.10E-22
GO:0006955	immune response	65	4.92E-20
GO:0051607	defense response to virus	48	2.26E-18
GO:0071346	cellular response to IFN-gamma	27	3.09E-14
GO:0032496	response to LPS	46	6.70E-14
GO:0035458	cellular response to IFN-beta	21	1.08E-13
GO:0071347	cellular response to IL-1	28	3.45E-13

Acox1-/- vs + LPS			
Term	GOTERM_BiologicalProcess	Count	PValue
GO:0002376	immune system process	121	2.66E-41
GO:0006954	inflammatory response	101	1.64E-31
GO:0045087	innate immune response	99	1.34E-24
GO:0006955	immune response	68	2.38E-17
GO:0009615	response to virus	34	1.80E-15
GO:0032496	response to LPS	49	1.55E-12
GO:0071356	cellular response to TNF	34	1.19E-11
GO:0051607	defense response to virus	42	5.07E-11
GO:0071222	cellular response to LPS	48	5.39E-11
GO:0042832	defense response to protozoan	16	1.54E-09

Tableau 7 : Analyse d'enrichissement en termes de « Gene Ontology-Biological Process » des gènes différentiellement exprimés dans les cellules BV-2 WT ou déficientes en réponse au LPS.
Liste des 10 termes de « Gene Ontology-Biological Process » présentant les enrichissements les plus significatif parmi les gènes différentiellement exprimés en réponse au LPS par comparaison au véhicule pour chaque génotype. Les analyses ont été réalisées à l'aide de la base de données bioinformatique DAVID 6.8. Le seuil de significativité est fixé tel que : valeur p ajustée <0.05 et |log2(KO/WT)|>1.

En parallèle, une contribution du 25-HC dans la pathogénèse de l'X-ALD a récemment été rapportée (Jang, Park et al. 2016) et nous avons ainsi souhaité contrôler son effet sur les cellules microgliales BV-2. L'analyse transcriptomique des cellules traitées par le 25-HC par comparaison au véhicule révèle l'expression différentielle d'un certain nombre de gènes (Figure 10), ce nombre étant plus restreint par rapport au nombre obtenu suite au traitement LPS. Cette analyse semble indiquer une forte dérégulation du métabolisme du cholestérol et une augmentation de l'expression de l'« Oxysterol-binding protein 2 » (OSBP2)

ou encore des chimiokines CCL3 et CXCL2 (données non-présentées). Ces inductions pourraient expliquer la microgliose réactive observée *in vivo* en réponse au 25-HC (Jang, Park et al. 2016). Cependant, aucune modification transcriptionnelle ne suggère un changement susceptible d'induire l'activation de l'inflammasome NLRP3 rapportée (Jang, Park et al. 2016). D'autre part, le LPS ne semble pas potentialiser l'effet du 25-HC. En effet, une part importante des gènes induits indépendamment par un traitement LPS ou 25-HC semblent également induits à des niveaux comparables par le traitement combiné mais aucun des gènes régulés ne semble spécifique au traitement combiné.

II.2. Conséquences métaboliques des inactivations géniques

L'accumulation d'AGTLC, défaut majeur résultant de l'inactivation des transporteurs ABCD1 et ABCD2 ou de l'enzyme ACOX1 a pu être confirmée dans nos modèles de cellules microgliales BV-2. Comme pressentie, du fait de l'expression des deux transporteurs ABCD1 et ABCD2 dans les cellules BV-2 et du fait de leur redondance fonctionnelle partielle, l'accumulation d'AGTLC n'est observable qu'en l'absence de ces deux protéines. Cependant, outre l'accumulation d'AGTLC, ces cellules présentent également d'importantes anomalies dans les niveaux d'AG saturés, mono et polyinsaturés (Tableau 1, article *A microglial cell model for acyl-CoA oxidase 1 deficiency* et Tableau 1, article *CRISPR/Cas9-mediated knockout of Abcd1 and Abcd2 genes in BV-2 cells: novel microglial models for X-linked Adrenoleukodystrophy*). L'analyse transcriptomique met en évidence des dérégulations de nombreux gènes intervenant dans le métabolisme lipidique dont certains sont présentés en Figure 11.

Indépendamment de l'accumulation d'AGTLC, une baisse du contenu en acide eicosapentaénoïque (EPA, C20:5 n-3) a pu être mesurée dans les 4 lignées déficientes. Cette accumulation est couplée à une augmentation du contenu en AA (C20:4 n-6) dans les cellules déficientes en ABCD1 et ABCD1/ABCD2. L'EPA et l'AA sont précurseurs des eïcosanoïdes et sont généralement associés à des effets anti-inflammatoire ou pro-inflammatoire respectivement. La synthèse et la libération de ces médiateurs lipidiques sont donc fortement susceptibles d'être modifiées. De fortes baisses d'expression de plusieurs désaturases et élongases ainsi que de cyclo-oxygénases et lipoxygénases, dont certaines jouent un rôle central dans la voie métabolique de synthèse des eicosanoïdes (Savary, Trompier et al. 2012) sont observées dans les 4 lignées microgliales déficientes (Figure 11). Un grand nombre de gènes dont l'expression est fortement réprimée codent pour des protéines localisées au RE.

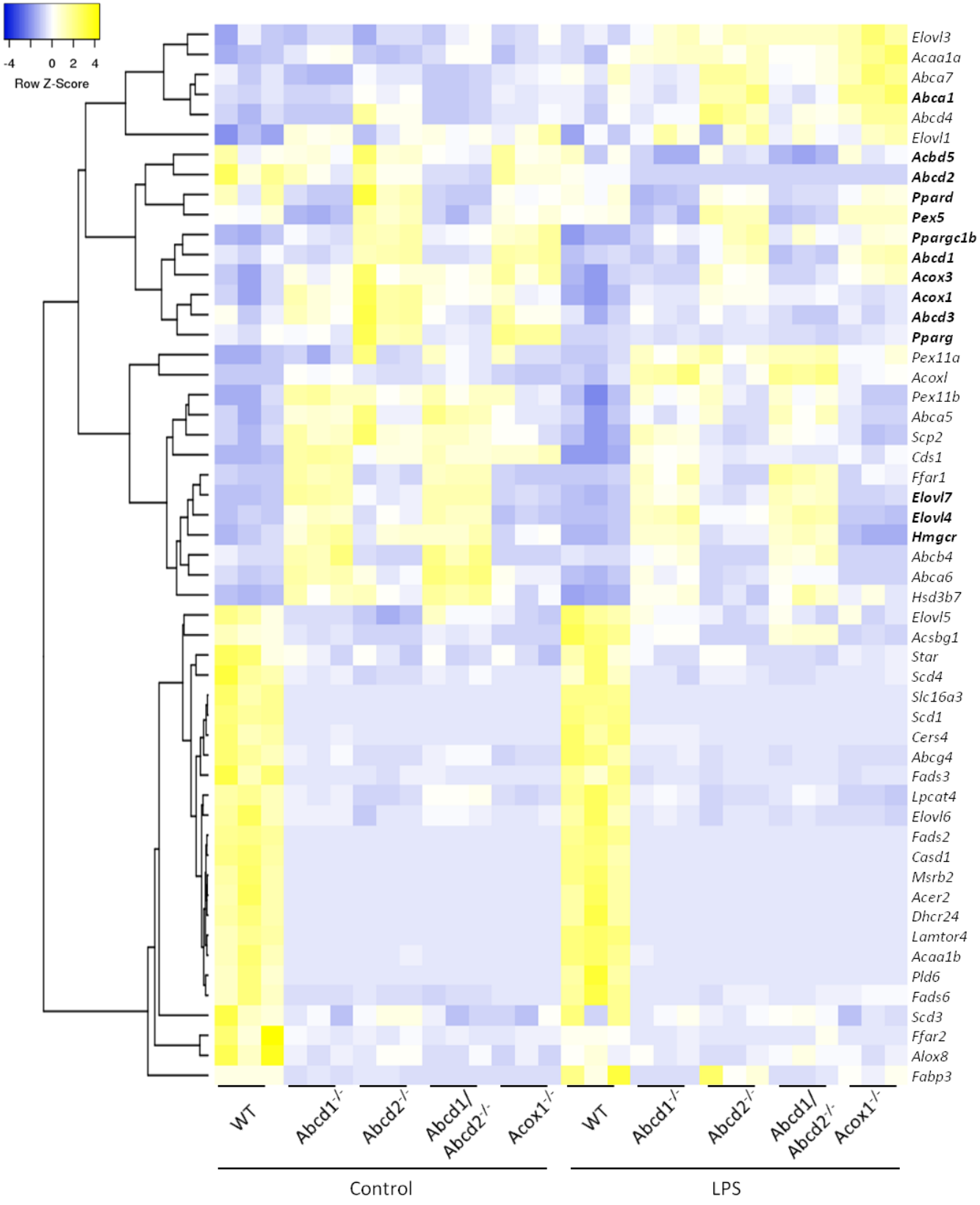


Figure 11 : Gènes différentiellement exprimés dans les cellules BV-2 déficientes en ABCD1, ABCD2, ABCD1/ABCD2, ou ACOX1 associés au métabolisme lipidique ou au peroxysome.
« Heatmap » présentant le nombre de « reads » normalisés pour chaque gène (z score par ligne) pour chaque génotype en condition standard et en condition LPS. Les analyses ont été réalisées à l'aide de la base de données bioinformatique DAVID 6.8. L'algorithme de regroupement hiérarchique selon une corrélation de Pearson des distances moyennes est représenté par un dendrogramme. Le seuil de significativité pour les différences d'expression est fixé tel que : p value ajustée <0.05.

Les cellules microgliales déficientes en ABCD1 et double-déficientes en ABCD1/ABCD2 présentent des profils différents des autres génotypes avec notamment une régulation positive de l'expression d'ELOVL4 et ELOVL7 (Figure 11). ELOVL4 et ELOVL7 présenterait une plus forte affinité pour les AG à chaîne longue polyinsaturés (Naganuma, Sato et al. 2011, Jun, Mukherjee et al. 2017).

En parallèle, ELOVL5 et ELOVL6, dont les expressions sont régulées, négativement présenteraient des affinités plus fortes pour le C18:3 et les AG à chaîne longue saturés respectivement. Bien qu'il soit compliqué de relier directement ces observations aux taux d'AG mesurés dans ces clones, ces variations d'expression sont fortement susceptibles de contribuer aux anomalies lipidiques révélées.

Une plus forte expression d'ABCD1 a pu être mesurée dans les cellules microgliales déficientes en ABCD2 et ACOX1 (x1,74 / x1,84, respectivement) suggérant un mécanisme de régulation génique de ce transporteur. Il ne semble cependant pas y avoir d'expression compensatoire d'ABCD2 dans les cellules déficientes en ABCD1. Les cellules déficientes en ABCD2 et ACOX1 présentent également une plus forte expression de plusieurs gènes codant pour des protéines peroxysomales comme ABCD3 et ACOX1 (la mutation introduite n'empêchant pas la transcription du gène). Le regroupement hiérarchique met en évidence des motifs d'expression similaires pour la majorité des gènes peroxysomaux dérégulés, y compris *ABCD1*. La plus forte expression de PPARγ (et PGC1β) joue potentiellement un rôle dans ces régulations géniques. Une forte baisse d'expression de PPARδ est mesurée dans les cellules déficientes en ABCD1 et ABCD1/ABCD2. Ce récepteur semble jouer un rôle central dans le contrôle du métabolisme énergétique de la cellule en promouvant la β-oxydation des AG et contrôlant la phosphorylation oxydative (OXPHOS) mitochondriale (Luquet, Gaudel et al. 2005). De façon surprenante, aucune expression de PPARα n'a pu être détectée dans les cellules BV-2 et suggère donc d'autres mécanismes de modulation de la prolifération peroxysomale. Une forte régulation négative de l'expression de gènes codant pour des protéines peroxysomale, comme ABCD2, ou pour PPARγ semble résulter de l'activation des cellules microgliales et de la réponse au LPS. Une baisse des activités enzymatiques peroxysomales catalase et ACOX1 a déjà été mise en évidence dans les cellules BV-2 en présence de LPS (Saih, Andreoletti et al. 2017). Confortant cette idée, des résultats préliminaires de mesure d'AG dans les cellules BV-2 déficientes en ACOX1 semblent confirmer une plus forte accumulation d'AGTLC en présence de LPS. Il est possible qu'une accumulation d'AGTLC plus marquée en condition inflammatoire ait des conséquences néfastes dans les cellules microgliales. Des analyses complémentaires en GC-MS dans nos

cellules activées par le LPS et l'analyse de la respiration cellulaire devraient permettre de répondre prochainement à ces questions.

Outre ces altérations du métabolisme peroxysomal, des régulations d'expression de plusieurs transporteurs susceptibles de moduler les contenus en cholestérol intracellulaire sont observées en conséquence des inactivations géniques ou de l'activation par le LPS. ABCA1, régulateur majeur de l'efflux de cholestérol dans les macrophages et dont l'expression est dérégulée dans les macrophages dérivés de patient X-ALD (Weinhofer, Zierfuss et al. 2018), se trouve être surexprimé dans les cellules microgliales BV-2 déficientes en ABCD2 ou ACOX1 et activées par le LPS. En parallèle, une plus forte expression des transporteurs ABCA5 et ABCA6 est observée dans les cellules déficientes en ABCD1 ou double-déficientes en ABCD1/ABCD2. Ces transporteurs semblent impliqués dans le trafic vésiculaire/lysosomal du cholestérol et pourraient être associés à l'accumulation de cholestérol mesurée dans ces cellules (Figure 11).

En plus des mesures des niveaux de cholestérol, des analyses de GC-MS ont été effectuées pour plusieurs intermédiaires de la voie de biogenèse des stéroïdes et dérivés oxydés du cholestérol. Les baisses significatives des niveaux de lanostérol et lathostérol dans les 4 lignées déficientes, semblent être de bons indicateurs d'une altération de la voie de biosynthèse du cholestérol (Figure 12).

A

ng/mg prot.	WT		ABCD1-/-		ANOVA (vs WT)	ABCD2-/-		ANOVA (vs WT)	ABCD1-/- ABCD2-/-		ANOVA (vs WT)	ACOX1-/-		ANOVA (vs WT)
Cholesterol	34848	4023	49132	5248	*	29000	5109		51988	3414	**	32685	2899	
Desmosterol	737	74,66	725	84,99		744	156,66		700	47,72		1012	96,96	*
Lathosterol	65,1	11,46	40,6	2,60	**	19,9	2,95	***	46,5	5,64	*	26,0	5,16	***
Lanosterol	185	27,54	93,1	10,01	***	102	21,62	**	92,0	8,16	***	87,7	16,15	***
7alpha-hydroxycholesterol	2,46	0,46	3,08	0,31		2,01	0,56		2,89	0,20		3,05	0,17	
7beta-hydroxycholesterol	1,76	0,15	2,17	0,16		1,73	0,43		1,82	0,24		1,72	0,19	
5beta-cholestane-3alpha,7alpha,12alpha-triol	4,70	0,35	4,44	0,41		2,35	0,51	**	5,36	0,45		4,95	0,81	
7-ketocholesterol	2,40	0,30	3,54	0,25		2,41	0,58		3,40	0,47		3,44	0,45	
27-hydroxycholesterol	50,6	3,10	69,6	8,33		82,4	14,35	**	95,5	3,91	***	68,8	1,97	
25-hydroxycholesterol	118	1,99	199	14,18		263	57,22	**	211	23,42	*	176	26,77	

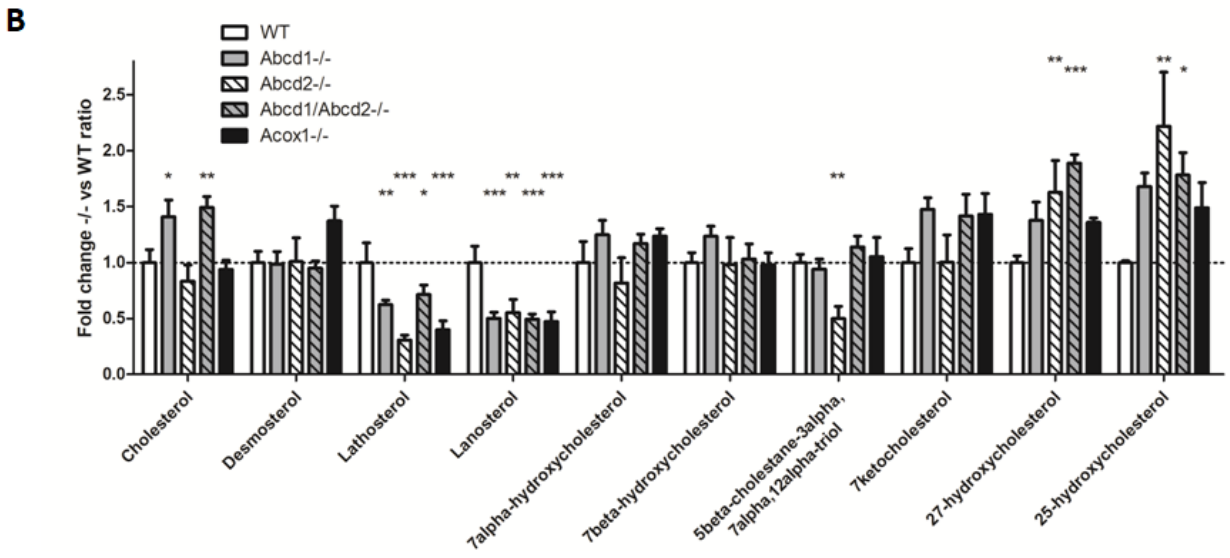


Figure 12 : Mesure des contenus cellulaires en stérols des cellules BV-2 WT et des cellules déficientes en ABCD1, ABCD2, ABCD1/ABCD2, ou ACOX1.
*Les taux de stérols totaux sont mesurés par GC-MS et rapportés aux contenus protéiques des échantillons. Les moyennes et écart-types de 3 expériences indépendantes sont exprimés en ng stérol/mg protéine (A). Les valeurs normalisées sont rapportées aux valeurs mesurées dans les BV-2 WT (B). Les différences significatives observées après ANOVA et ajustement de Bonferroni sont indiquées comme suit : * P value < 0.05, ** P value < 0.01, *** P value <0.001.*

Ces observations semblent bien corrélées à la forte baisse d'expression de la 24-dehydrocholesterol reductase (DHCR24) mesurée dans ces cellules (Figure 11). En parallèle, une augmentation d'expression d'HMGCR, enzyme clé de la synthèse du cholestérol semble être associée à l'accumulation de ce dernier dans les cellules déficientes en ABCD1 et ABCD1/ABCD2. La baisse d'expression du transporteur mitochondrial StAR peut également suggérer un important remaniement de la répartition intracellulaire du cholestérol (Figure 11). Par ailleurs, les mesures des niveaux de 7-beta et 7-alpha-hydroxycholestérol ne démontrent pas de différences entre les génotypes. En revanche, une tendance à l'augmentation du taux de 7-cétocholestérol, produit de l'auto-oxydation du cholestérol, dans les cellules déficientes en ABCD1, ABCD1/ABCD2 ou ACOX1, suggère une élévation du niveau de molécules pro-oxydantes dans ces cellules (Figure 12). Le 27-hydroxycholestérol et le 25-HC, dont les synthèses dépendent des activités des enzymes CYP27A1 et 25-hydroxylase respectivement, voient leurs taux augmentés de façon significative dans les cellules déficientes en ABCD2 et ABCD1/ABCD2. Toutefois, aucune augmentation d'expression de la 25-hydroxylase n'a pu être mise en évidence dans l'analyse transcriptomique suggérant davantage une origine non-enzymatique. De par leurs interactions avec SREBP ou LXR, ces molécules agissent comme d'importants régulateurs du métabolisme du cholestérol et de ses dérivés mais également du

métabolisme des AG (Fu, Menke et al. 2001). Leurs accumulations seraient donc aussi en mesure d'expliquer les dérégulations importantes des contenus lipidiques dans les cellules microgliales déficientes. Ces oxystérols sont également connus pour modifier la fluidité membranaire et les interactions moléculaires au sein des membranes. Ce point sera développé plus loin dans la discussion.

Enfin, des dosages cellulaires par analyse GC-MS ont également été réalisés pour plusieurs acides organiques et intermédiaires du cycle du Krebbs. Ces analyses révèlent des diminutions des contenus en pyruvate, fumarate et malate essentiellement (Figure 13).

A

ng/mg prot.	WT		ABCD1-/-		ANOVA (vs WT)	ABCD2-/-		ANOVA (vs WT)	ABCD1-/- ABCD2-/-		ANOVA (vs WT)	ACOX1-/-		ANOVA (vs WT)
Lactate	236,46	44,23	301,37	28,55		330,40	60,92		312,88	37,41		324,35	38,70	
Pyruvate	11,69	0,69	7,26	0,69	*	6,22	1,87	**	5,75	0,40	**	11,98	1,85	
Citrate	32,25	4,52	22,53	0,68		26,56	6,78		16,46	4,37	**	38,05	1,24	
Succinate	6,19	1,41	6,58	1,42		6,03	1,47		7,12	0,67		5,87	0,79	
Fumarate	20,22	4,75	12,60	2,10	*	9,78	2,51	**	15,86	1,07		11,42	0,75	*
Malate	49,88	9,46	29,84	3,71	**	17,88	2,36	***	13,79	3,17	***	13,51	2,08	***

B

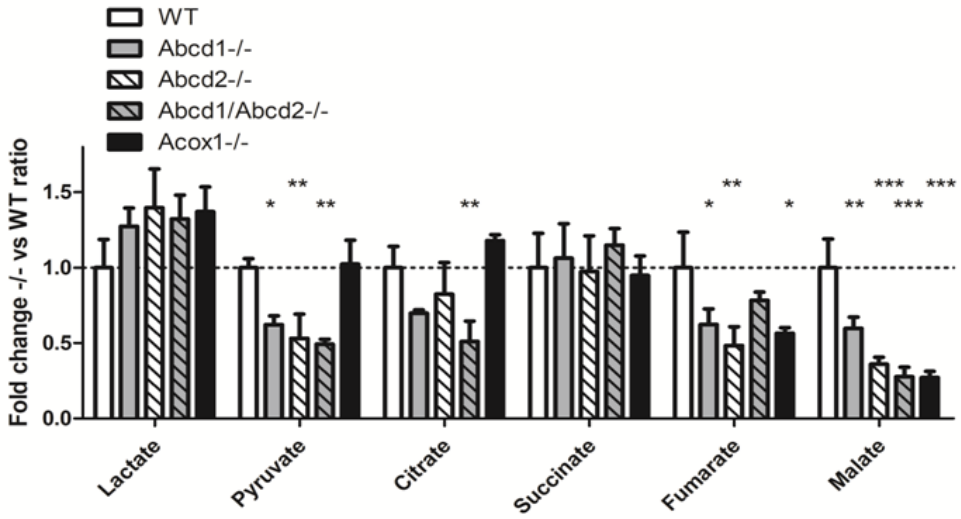


Figure 13 : Mesure des contenus cellulaires en acides organiques des cellules BV-2 WT et des cellules déficientes en ABCD1, ABCD2, ABCD1/ABCD2 ou ACOX1.
*Les taux d'acides organiques sont mesurés par GC-MS et rapportés aux contenus protéiques des échantillons. Les moyennes et écart-types de 3 expériences indépendantes sont exprimés en ng/mg protéine (A). Les valeurs normalisées sont rapportées aux valeurs mesurées dans les BV-2 WT (B). Les différences significatives observées après ANOVA et ajustement de Bonferroni sont indiquées comme suit : * valeur P < 0.05, ** valeur P< 0.01, *** valeur P <0.001.*

La respiration mitochondriale est connue pour être inhibée au sein des macrophages en réponse au LPS et la synthèse de NO semble jouer un rôle important dans cette régulation (Brown 2001). Il est alors envisageable que celui-ci soit responsable d'une atteinte mitochondriale dans les cellules déficientes ABCD1, ABCD2 ou ACOX1.

D'autre part, il convient de préciser que les analyses des contenus cellulaires par GC-MS dans cette étude ont été effectuées sur les fractions saponifiées de nos échantillons cellulaires. Aucune donnée sur les contenus estérifiés n'a pu être obtenue et l'effet des inactivations géniques sur les contenus en cholestérol estérifié reste inconnu. Une analyse plus spécifique en spectrométrie de masse devrait apporter des informations pertinentes sur ce point.

II.3. Métabolisme oxydatif et métabolisme de l'azote dans les cellules déficientes

Concernant les principaux gènes impliqués dans l'activité anti-oxydante (au niveau du peroxysome), la catalase (Cat) et la « glutathione peroxidase 4 » (Gpx4) semblent présenter les dérégulations les plus importantes (Figure 14).

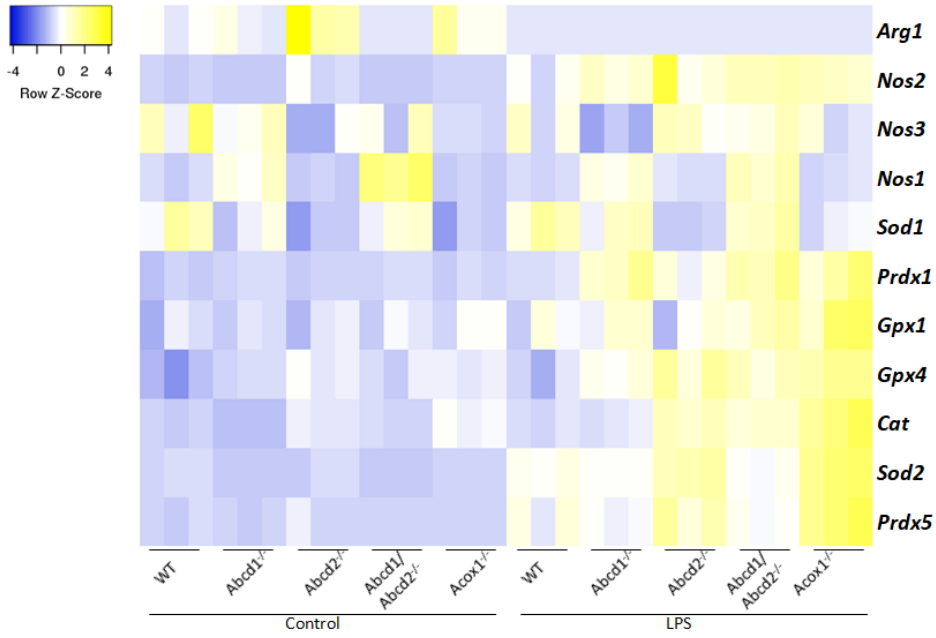


Figure 14 : Gènes différentiellement exprimés associés au métabolisme oxydatif et à la synthèse du NO des cellules BV-2 WT et des cellules déficientes en ABCD1, ABCD2, ABCD1/ABCD2 ou ACOX1 avec ou sans LPS

« Heatmap » présentant le nombre de « reads » normalisés pour chaque gène (z score par ligne) pour chaque génotype en condition standard et en condition LPS. Le seuil de significativité pour les différences d'expression est fixé tel que : p value ajustée <0.05

De très faibles variations sont observées entre les cellules BV-2 WT et les cellules déficientes en ABCD1 et ces variations semblent plus marquées dans les cellules déficientes en ACOX1.

L'expression de la majorité de ces gènes semble être régulée positivement en réponse au LPS. De façon surprenante, la baisse de l'activité catalase mise en évidence dans les cellules BV-2 WT préalablement traitées avec du LPS (Saih, Andreoletti et al. 2017) ne semble pas corrélée au profil transcriptomique de ces cellules. L'augmentation de l'activité catalase observée dans les cellules microgliales *Acox1*$^{-/-}$ et sa surexpression considérable en réponse au LPS ne sont pas encore expliquées mais pourraient traduire un important défaut du métabolisme oxydatif vraisemblablement exacerbé en condition inflammatoire.

Le métabolisme de l'azote et la synthèse du NO semblent légèrement affectés par une faible augmentation de l'expression de l'iNOS (NOS2), induite en réponse au LPS (Figure 14). En l'absence de LPS, l'expression des enzymes concurrente iNOS et Arg1 est étonnamment corrélée, et plus forte dans les cellules déficientes en ABCD2 et ACOX1. Une contribution des NOS constitutives calcium-dépendantes, principalement la NOS neuronale (NOS1), est aujourd'hui suggérée dans la génération d'une réponse inflammatoire dans les macrophages (Baig, Zaichick et al. 2015). Sa surexpression dans les cellules microgliales déficientes en ABCD1 et ABCD1/ABCD2 joue potentiellement un rôle important dans l'initiation d'une réponse délétère qui reste à définir.

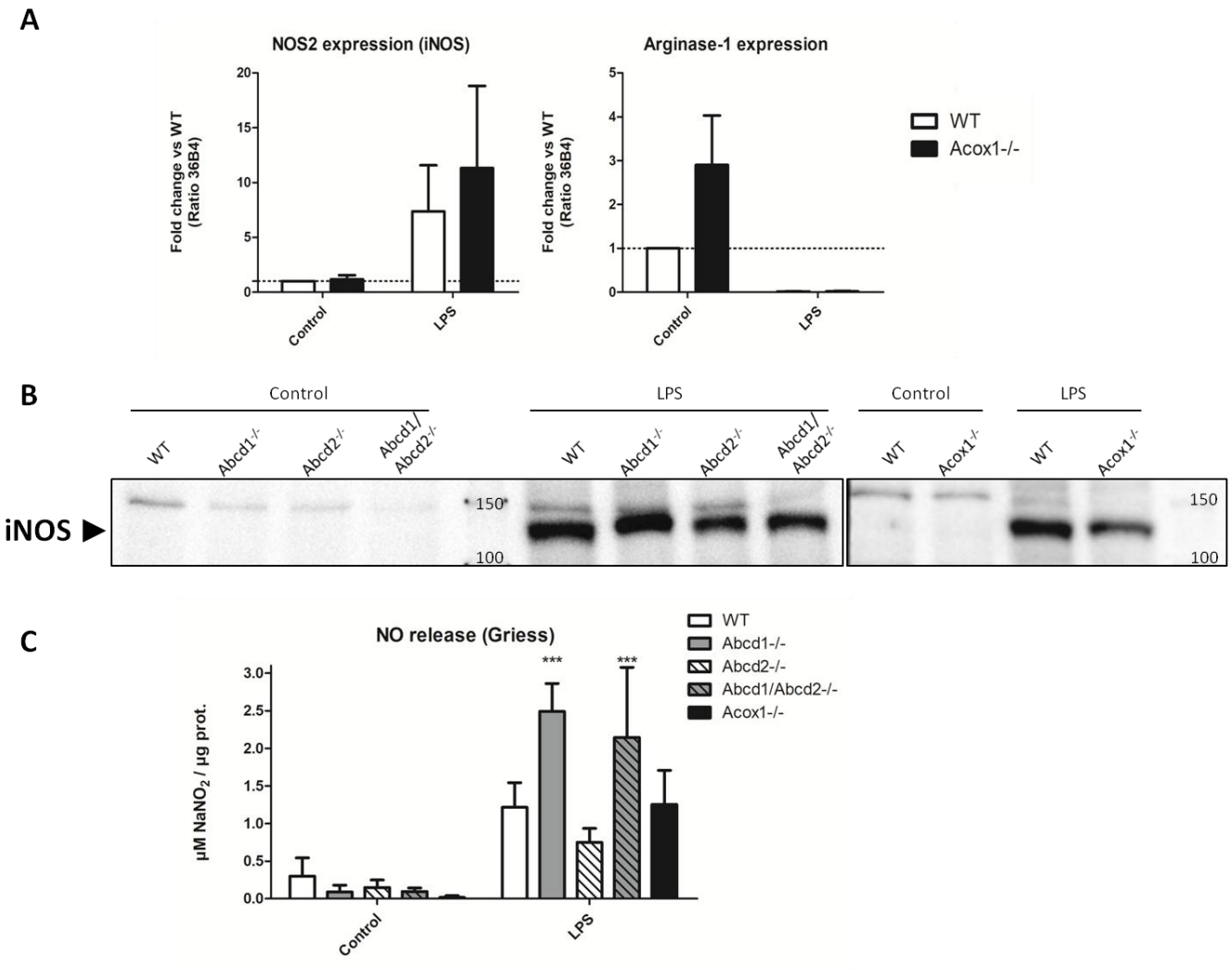


Figure 15 : Métabolisme de la L-arginine et synthèse du NO par les cellules microgliales BV-2 WT et des cellules déficientes en ABCD1, ABCD2, ABCD1/ABCD2 ou ACOX1 avec ou sans LPS.
Les niveaux d'expression des gènes Nos2 et Arg1 sont mesurés par RTqPCR dans les cellules BV-2 WT et Acox1$^{-/-}$, normalisés à l'expression du gène de ménage 36B4 puis rapportés au niveau d'expression dans les cellules BV-2 WT en conditions standard (n=3) (A). L'expression d'iNOS a également été évaluée par Western Blot. Les valeurs obtenues par analyse densitométrique sont rapportées aux valeurs de β-actine (n=1) (B). La production de NO, reflétées par la concentration en NO_2 dans le surnageant de culture sont mesurées à l'aide du réactif de Griess et exprimées en µM rapportées aux contenus protéiques (n=3) (C).

Les résultats d'expression de *Nos2* et *Arg1* ont pu être confirmés dans la microglie *Acox1*$^{-/-}$ par une analyse en RT-qPCR (Figure 15A). Une analyse préliminaire du niveau protéique en iNOS a été réalisée en Western Blot (n=1) (Figure 15B). En l'absence de LPS, la présence de l'iNOS n'est pas détectable. En présence de LPS, le taux d'iNOS semble plus important dans les cellules déficientes en ABCD1 et peu altéré dans les autres cellules déficientes par comparaison aux cellules WT. Ces résultats bien que peu corrélés avec ceux de l'analyse RNAseq ont pu être confortés par des résultats de mesure de NO. Pour cela, la concentration en nitrite dans le surnageant de culture, reflétant fortement la synthèse du NO

par les cellules microgliales dans ces conditions, a pu être dosé à l'aide du réactif de Griess. Très faiblement produit par les cellules en l'absence de LPS, le NO est libéré de façon plus importante par les cellules déficientes en ABCD1 et ABCD1/ABCD2 préalablement activées par le LPS (Figure 15C).

II.4. Réponse inflammatoire et sécrétion cytokinique des cellules déficientes

La réponse immunitaire et la plasticité des cellules déficientes en ABCD1, ABCD2, ABCD1/ABCD2 ou en ACOX1 semblent fortement dérégulées au vu de la première analyse de « Gene Ontology ». L'analyse d'enrichissement effectuée en « KEGG pathway » a également permis d'observer un enrichissement significatif pour le terme « Cytokine-cytokine receptor interaction ». Avant l'obtention de ces résultats, des premières mesures de sécrétion de cytokines des BV-2 WT et *Acox1*$^{-/-}$ ont pu être réalisées par dosage par cytométrie en flux (« cytometric bead array ») dans les surnageants de culture (Figure 16A) et complétées par des analyses d'expression par RTqPCR (Figure 16B). Les observations effectuées concernent des cytokines classiquement associées à une réponse pro-inflammatoire (IL-1β, IL-6, TNFα, IFNγ) ou anti-inflammatoire (IL-10) ainsi que les chimiokines CCL2 et CCL3. Les résultats préliminaires des dosages par cytométrie en flux montrent une absence globale de différence de sécrétion en absence de LPS entre les deux génotypes (Figure 16A). En réponse au LPS, on note une augmentation globale de la sécrétion des cytokines (Figure 16A). L'augmentation de la sécrétion d'IL-1β, IFNγ, IL-10 est légèrement plus forte dans les cellules *Acox1*$^{-/-}$ alors que celle de l'IL-6 est en revanche moins prononcée. Les différences les plus nettes concernent la sécrétion de TNFα et de CXCL2. La sécrétion de CXCL2 n'est que très faiblement induite par le LPS dans les cellules WT alors qu'elle est massivement augmentée dans les cellules *Acox1*$^{-/-}$. L'augmentation de la sécrétion de TNFα en réponse au LPS, retrouvée dans les cellules WT et les cellules *Acox1*$^{-/-}$, est plus marqué dans les cellules déficientes.

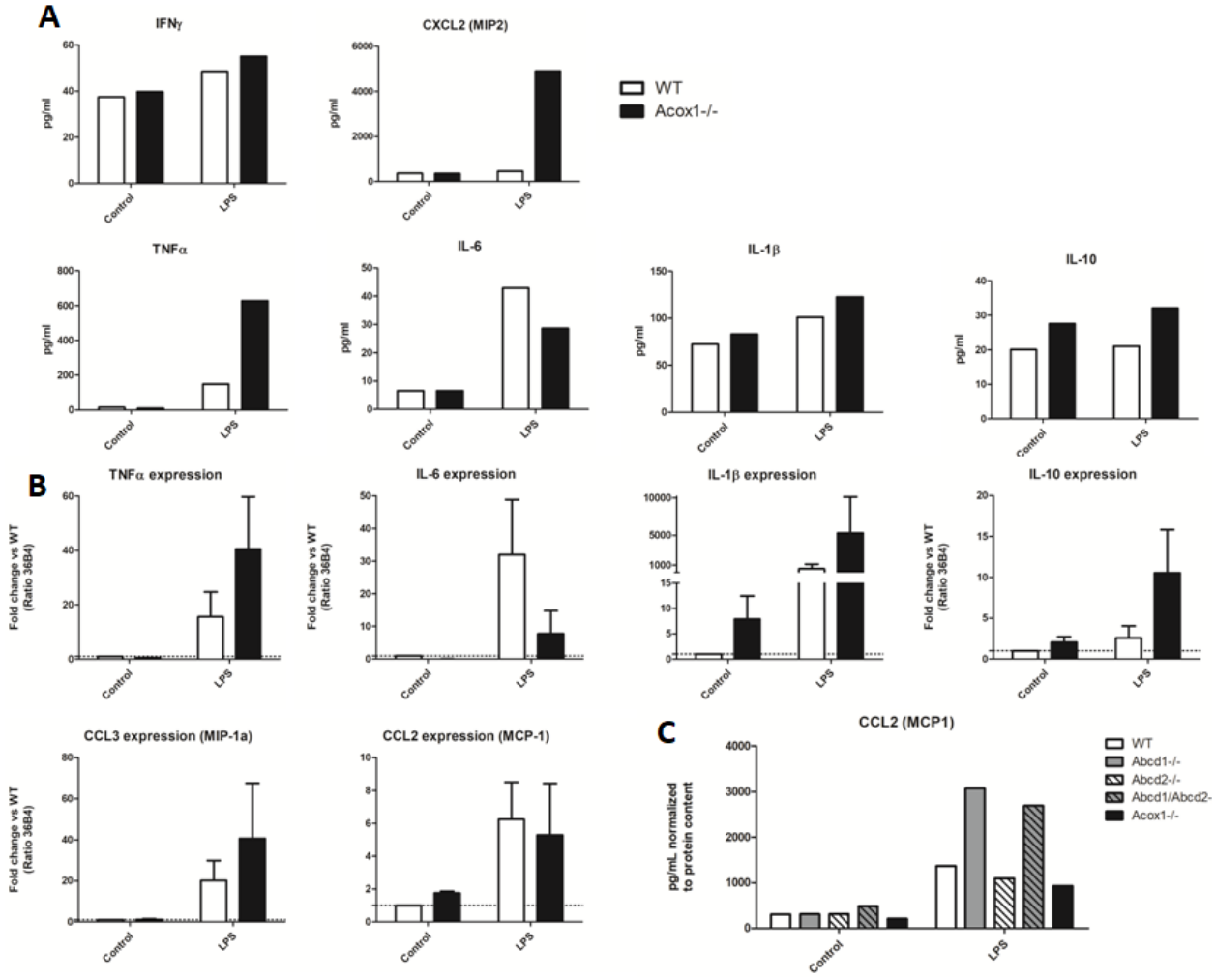


Figure 16 : Analyse des cytokines secrétées par les cellules microgliales BV-2 WT et déficientes en ACOX1.

Les sécrétions d'IFNγ, IL-1β, IL-6, IL-10, TNFα et CXCL2 dans le surnageant des cellules BV-2 WT et Acox1$^{-/-}$ en condition standard et en condition LPS sont mesurées par dosage par cytométrie en flux (« Cytometric Bead Array ») et exprimées en pg/ml de surnageant de culture (A) (n=1). Les niveaux d'expression des gènes Il1b, Il6, Il10, Tnf, Ccl2 et Ccl3 sont mesurés par Reverse Transcriptase PCR quantitative, normalisés à l'expression du gène de ménage 36B4 et rapportés au niveau d'expression dans les cellules BV-2 WT en conditions standard (n=3) (B). Les sécrétions de la chimiokine CCL2 sont mesurées par ELISA et exprimées en pg/ml de surnageant de culture rapportées aux contenus protéiques cellulaires (n=1) (C).

Les mesures d'expression en RTqPCR n'ont pour l'instant été effectuées que dans les cellules *Acox1*$^{-/-}$. Les résultats sont relativement bien corrélés avec les premières observations. Une élévation du taux plasmatique de TNFα chez les patients atteints de CALD a été observée et cette cytokine semble jouer un rôle majeur dans l'inflammation cérébrale chez ces patients. Le TNFα, secrété par la microglie déficiente, est fortement susceptible d'affecter la viabilité des oligodendrocytes au sein de la substance blanche (McGuinness, Griffin et al. 1995).

Une première mesure de la sécrétion de CCL2 a été réalisée par ELISA dans toutes les cellules déficientes. L'augmentation de la sécrétion en réponse au LPS est nettement plus forte dans les cellules déficientes en ABCD1 et en ABCD1/ABCD2 (Figure 16C). Sans contribuer directement à l'inflammation, cette chimiokine est impliquée dans le recrutement des cellules microgliales et des macrophages au niveau central. Une augmentation de son expression a pu être observée dans les plaques inflammatoires de la CALD (Paintlia, Gilg et al. 2003). Son action bénéfique ou délétère dans la pathologie reste à déterminer.

Une analyse de regroupement des principaux gènes de cytokines dérégulés permet d'observer des motifs d'expression différents entre les cellules BV-2 déficientes (Figure 17). Une plus forte expression des gènes *Il-6*, *Il-34*, *Il1rn*, *Ccl2*, *Ccl7*, *Ccl9* est observée dans les cellules déficientes en ABCD1 et en ABCD1/ABCD2. En parallèle, l'expression des gènes *Il-1β*, *Il-1α*, *Tnf*, *Cxcl2*, *Ccl3* et *Il-10* est plus importante dans les cellules déficientes en ACOX1 en réponse au LPS (Figure 17).

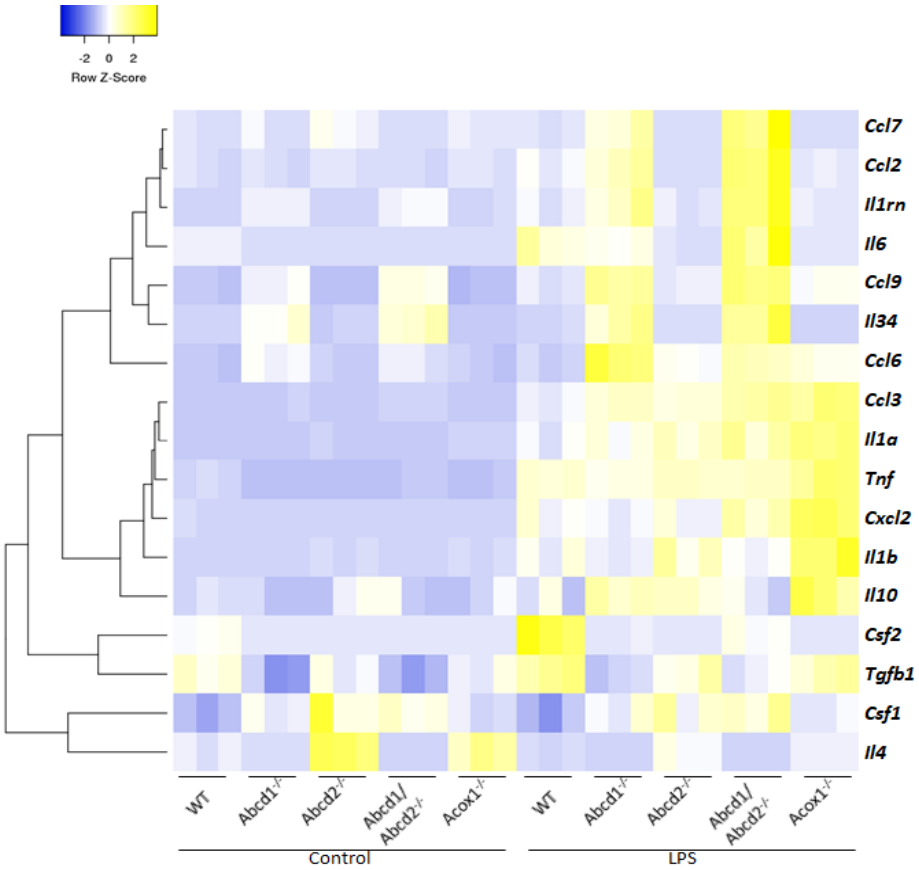


Figure 17 : Gènes de cytokines différentiellement exprimés dans les cellules BV-2 déficientes en ABCD1, ABCD2, ABCD1/ABCD2 ou ACOX1.
« Heatmap » présentant le nombre de « reads » normalisés pour chaque gène (z score par ligne) pour chaque génotype en condition standard et en condition LPS. L'algorithme de regroupement hiérarchique selon une corrélation de Pearson des distances moyennes est représenté par un dendrogramme. Les analyses ont été réalisées à l'aide de la base de données bioinformatique DAVID 6.8. Le seuil de significativité est fixé tel que : p value ajustée <0.05.

II.5. Fonction de phagocytose des cellules déficientes

Les peroxysomes semblent jouer un rôle essentiel au cours des processus de formation des phagosomes par la cellule. Ces processus dynamiques complexes dépendent notamment de la capacité de la membrane à former des invaginations et de sa fluidité. Son enrichissement en AG mono et polyinsaturés ou en cholestérol semble affecter la capacité de phagocytose des cellules (Schroeder and Kier 1983, Williams, Cauvi et al. 2016). Outre la modification des propriétés physicochimiques membranaires par les lipides, la phagocytose peut être modulée par différents mécanismes encore mal connus qui dépendent de changements transcriptionnels. Dans les cellules BV-2, le terme « Phagosome » identifié grâce à l'analyse « KEGG pathway » dans les 4 lignées cellulaires déficientes indique une dérégulation de ces processus.

Parmi les gènes dérégulés associés au terme « Phagosome », plusieurs codent pour des récepteurs « scavenger » (*Cd36, Cd68*), des protéines de la cascade du complément (dont le composant *C3*) et des récepteurs Fc (*Fcgr2b, Fcgr3, Fcgr4*). Les modifications des niveaux d'expression des gènes des différentes sous-unités de la tubuline, *Tubb1, Tubb2a, Tubb2b, Tubb4a et Tuba4a* semblent également indiquer des changements d'organisation du cytosquelette dont la dynamique est indispensable à la formation des phagophores. Enfin, l'expression d'un grand nombre de gènes codant pour des protéines du CMH de classe 1 est dérégulée dans chacun des clones déficients (Figure 18). En effet, les mécanismes de présentation antigénique dépendent fortement des capacités de phagocytose et de protéolyse des macrophages et ces variations d'expression pourraient refléter des anomalies de ces fonctions.

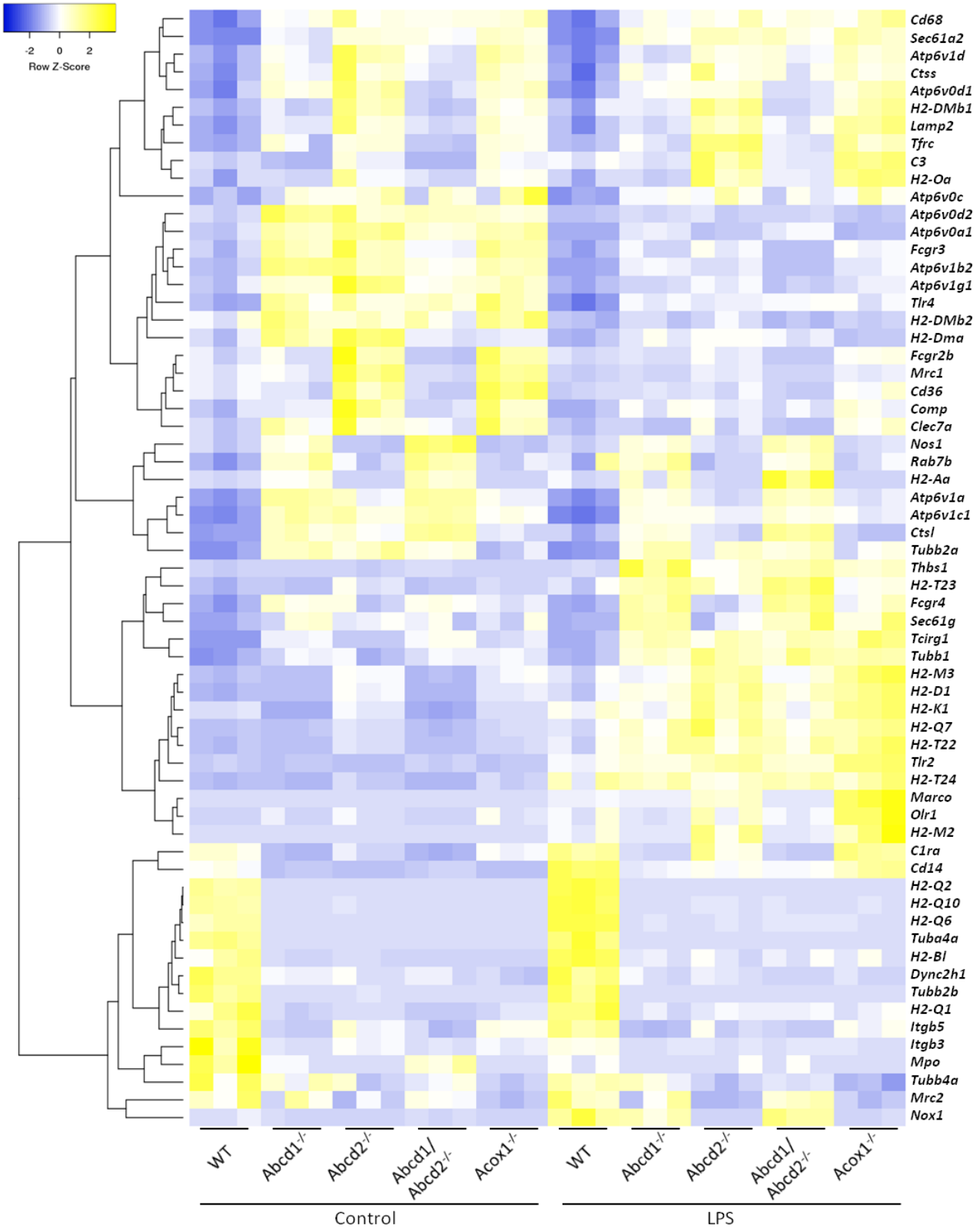


Figure 18 : Gènes différentiellement exprimés dans les cellules BV-2 déficientes en ABCD1, ABCD2, ABCD1/ABCD2 ou ACOX1, associés au terme de « KEGG pathway » « Phagosome » (mmu04145).

« Heatmap » présentant le nombre de « reads » normalisés pour chaque gène (z score par ligne) pour chaque génotype en condition standard et en condition LPS. L'algorithme de regroupement hiérarchique selon une corrélation de Pearson des distances moyennes est représenté par un dendrogramme. Les analyses ont été réalisées à l'aide de la base de données bioinformatique DAVID 6.8. Le seuil de significativité pour les différences d'expression est fixé tel que : p value ajustée <0.05 et |log2(KO/WT)|>1.

Afin de mieux appréhender la fonction de phagocytose de ces cellules, celles-ci ont été mises en présence de billes fluorescentes (FITC) et la phagocytose de ces billes a été évaluée par cytométrie en flux. Les cellules ont préalablement été activées ou non par le LPS et sont incubées en présence de billes de latex de 1 µm de diamètre avec un ratio de 200 billes / cellules pendant 1 heure à 37°C ou 4°C. Une mesure d'adsorption est effectuée sur les cellules incubées à 4°C, température à laquelle la dynamique du cytosquelette est inhibée et la formation des phagosomes impossible. L'adsorption des billes (4°C), très faible sur les cellules non activées, est nettement plus importante sur les cellules déficientes en ABCD2 et en ACOX1 préalablement activées par du LPS (Figure 19).

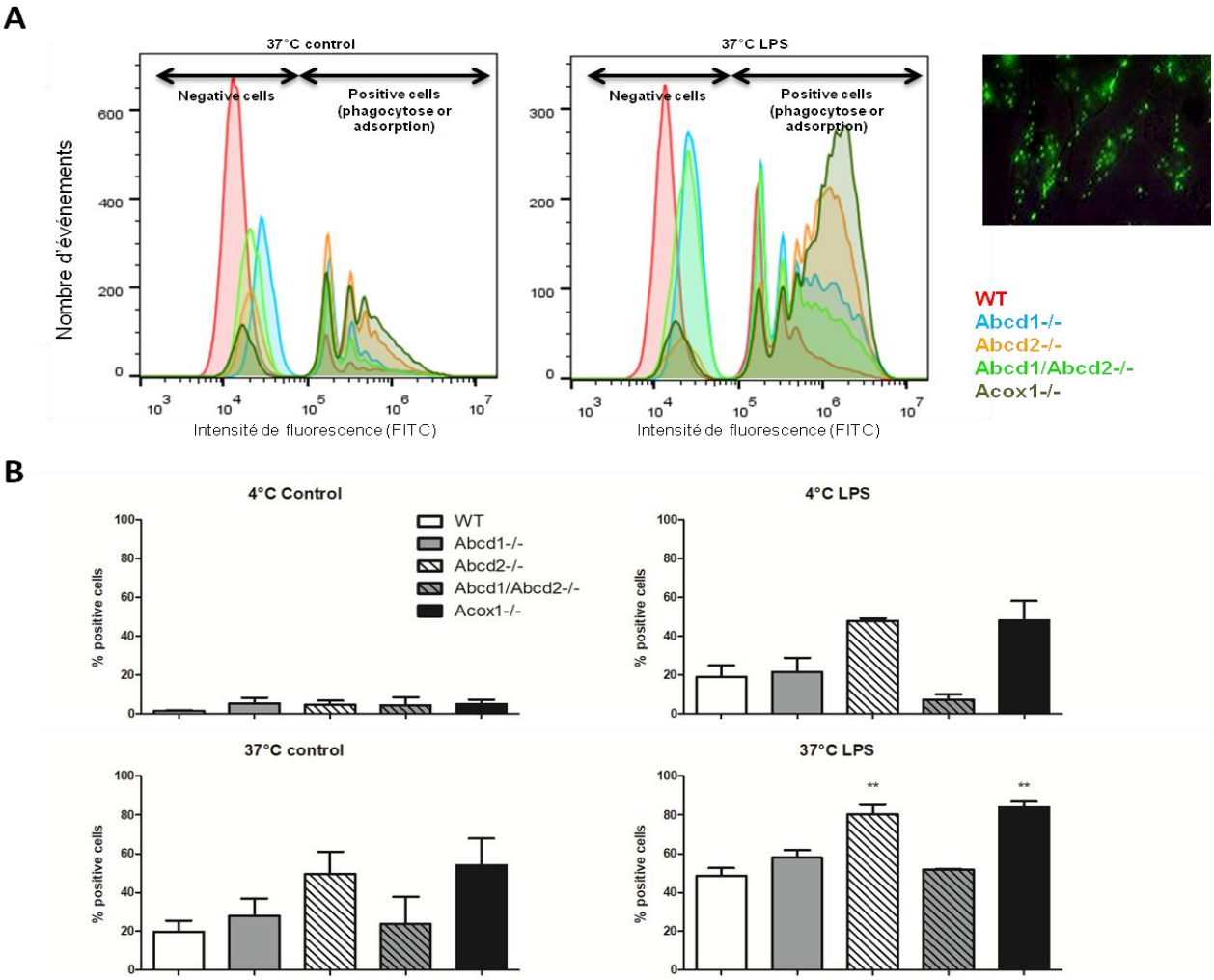


Figure 19 : Etude de la capacité de phagocytose de billes fluorescentes des cellules microgliales WT et déficientes en ABCD1, ABCD2, ABCD1/ABCD2 et ACOX1, préalablement activées par LPS ou non.

*Le nombre de cellules ayant phagocytées ou adsorbées des billes fluorescentes (FITC) avec ou sans LPS est analysé par cytométrie en flux. Histogrammes et image illustrant les variations d'intensité de fluorescence corrélées aux nombres de billes phagocytées ou adsorbées par cellule (une expérience montrée parmi 3 répétitions indépendantes) (A).La moyenne du pourcentage de cellules positives est représentée avec écart-type. Les contrôles d'adsorptions sont effectués à 4°C, température à laquelle la polymérisation de l'actine et la phagocytose sont bloquées. Les différences significatives observées après ANOVA et ajustement de Bonferroni sont indiqués : ** $P < 0.01$ (B).*

Cette plus forte adsorption témoigne vraisemblablement d'une dérégulation d'expression de récepteurs membranaires aussi impliqués dans les processus de phagocytose. Les mesures effectuées à 37°C, sur les cellules préalablement traitées ou non avec du LPS, tendent à confirmer une prédisposition des cellules ABCD2 et ACOX1 déficientes à adsorber et/ou phagocyter ces billes. Cette différence est également corrélée à la surexpression de gènes codant des récepteurs membranaires impliqués dans le contrôle de ces mécanismes de phagocytose tel que CD68, MRC1 ou TREM2 dans ces cellules (Figure 12 et articles). Les surexpressions de TREM2 et CD68 ont déjà été mises en évidence dans la microglie de la moelle épinière de patients AMN et associées à une phagocytose anormale (Gong, Sasidharan et al. 2017). L'analyse transcriptomique montre également que l'expression des gènes *Cx3cr1* et *Cx3cl1* est fortement réprimée dans tous les clones cellulaires déficients et ceci en absence comme en présence de LPS. Le récepteur CX3CR1 joue un rôle central dans la reconnaissance d'une perte d'homéostasie dans le SNC et dans la régulation des événements de phagocytose (Paolicelli, Bolasco et al. 2011). De façon surprenante, le phénotype observé dans les cellules déficientes en ABCD2 n'est pas présent dans les cellules déficientes en ABCD1/ABCD2. Il est probable que la présence d'une accumulation lipidique aberrante dans les cellules double-déficientes mais moins importante dans les cellules *Abcd2*$^{-/-}$ influe sur les niveaux d'expression de ces protéines.

Des travaux récents ont mis en évidence l'importance des fonctions peroxysomales dans les mécanismes de phagocytose des macrophages chez la souris ou la drosophile (Di Cara, Sheshachalam et al. 2017). Le rôle du peroxysome dans la réponse immunitaire innée semble fortement lié à la génération d'ERO et de NO dans la cellule et à l'activation de la voie de stress p38 MAPK. L'expression dérégulée de plusieurs acteurs du métabolisme oxydatif du peroxysome, dont la catalase, ainsi que l'altération de la voie de signalisation MAPK indiquée par l'étude de « KEGG pathway » (Tableau 6) dans les cellules BV-2 déficientes semblent être en accord avec ces résultats.

Des expériences complémentaires ont été initiées pour évaluer la capacité de ces cellules à phagocyter des débris cellulaires, débris provenant de la lignée murine oligodendrocytaire 158N induite en apoptose par un stress UV. Cependant, les résultats obtenus jusque-là sont difficilement interprétables et des travaux de mise au point restent à apporter quant à l'induction de la réponse apoptotique des cellules 158N et l'identification de la réponse microgliale. L'exposition de phosphatidylsérine sur le feuillet externe des membranes plasmiques, conséquence de l'apoptose, reconnue comme « eat-me signal » par la

microglie, est supposée induire une réponse cellulaire plus spécifique probablement altérée dans la microglie déficiente.

II.6. Fonction de présentation antigénique des cellules déficientes

La surexpression du récepteur Mrc1 dans les cellules *Abcd2*$^{-/-}$ et *Acox1*$^{-/-}$ semble confirmée par une analyse par cytométrie en flux (Figure 20). L'expression de ce marqueur de surface est généralement associée à un phénotype alternatif ou anti-inflammatoire M2 des cellules microgliales. Cependant, une surexpression de marqueur associée à un phénotype pro-inflammatoire comme le récepteur à l'interféron IFNAR1 semble également se distinguer et suggère davantage un phénotype d'activation non-classique dans ces mêmes cellules.

Par ailleurs, la surexpression de protéines membranaires responsables de la présentation antigénique (CMH de classe 1/H2-Kb et CMH de classe 2) ou de la co-stimulation lymphocytaire (CD40, CD80) a pu être observée grâce à ces analyses de cytométrie en flux. Les analyses des marqueurs membranaires par cytométrie en flux pour les cellules BV-2 WT indiquent une importante hétérogénéité au sein de cette population cellulaire et requiert donc une interprétation précautionneuse de ces résultats.

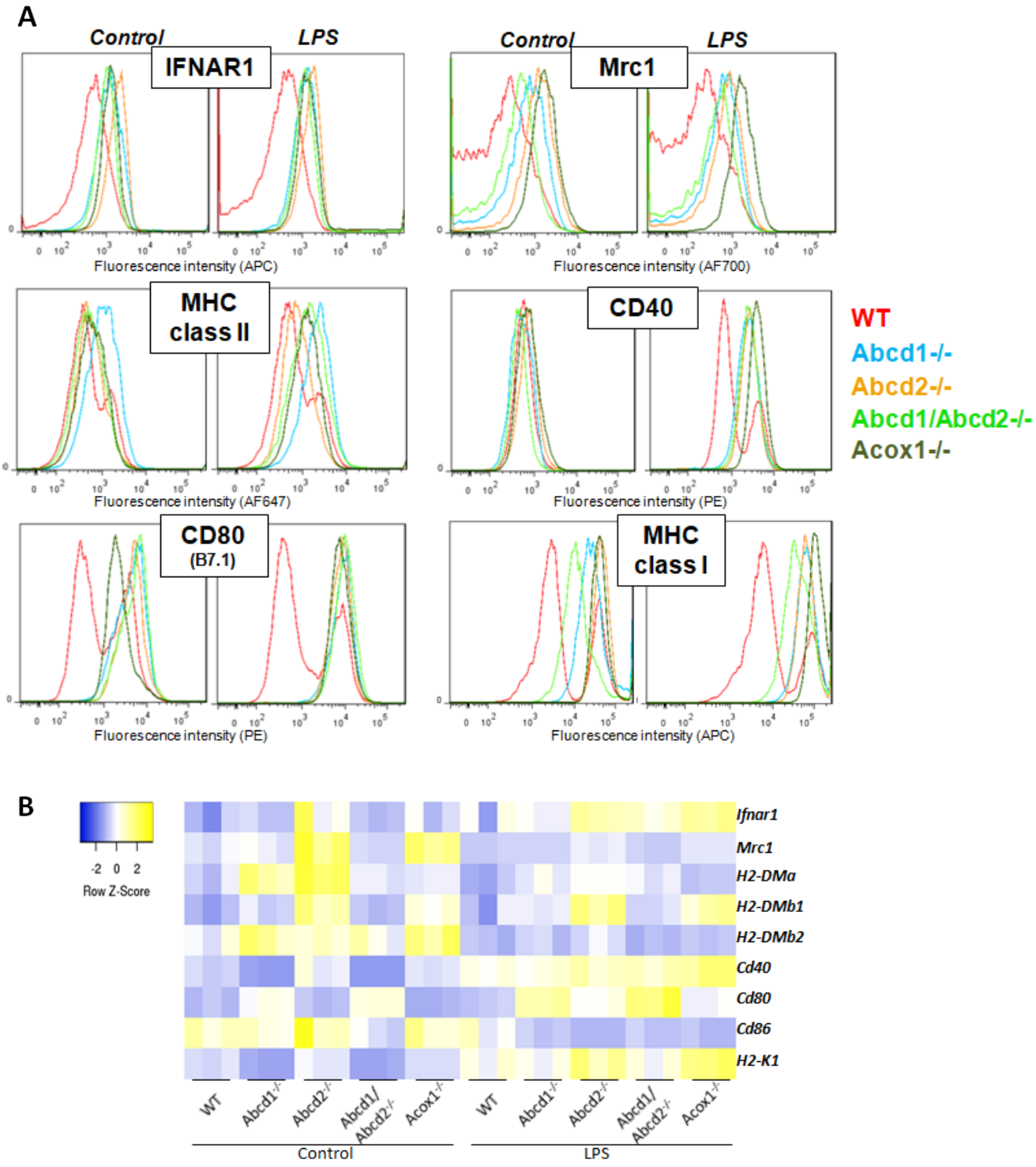


Figure 20 : Analyse d'expression des marqueurs de surface des cellules microgliales BV-2 WT et déficientes en ABCD1, ABCD2, ABCD1/ABCD2 ou ACOX1.

Le niveau d'expression des marqueurs de surface pro-inflammatoire (IFNAR1), anti-inflammatoire (Mrc1) ou de présentation antigénique et co-stimulation lymphocytaire (CMH de classe II, CD40, CD80, CD86, CMH de classe I (H2Kb)) est évalué par cytométrie en flux (A). « Heatmap » présentant le nombre de « reads » normalisés pour chaque gène (z score par ligne) pour chaque génotype en condition standard et en condition LPS (B).

Bien qu'une présentation anormale d'antigènes de nature lipidique aux lymphocytes NKT par le biais du CD1d soit suggérée dans l'X-ALD et par nos résultats (article « CRISPR/Cas9-mediated knockout of Abcd1 and *Abcd2* genes in BV-2 cells: novel microglial models for X-linked Adrenoleukodystrophy »), une potentielle dérégulation de la présentation antigénique par le CMH de classe 1 n'est pas encore connue. Même si aucun élément de sa physiopathogenèse ne permet de comparer l'X-ALD à une maladie auto-immune, la présentation par le CMH de classe 1 est également un moyen de présentation croisée d'antigènes du microenvironnement extracellulaire par les phagocytes aux lymphocytes T CD8+ (Rock and Shen 2005). L'induction d'une réponse immunitaire par la microglie, par ce moyen, en réponse à une mort cellulaire reste donc à explorer. Par ailleurs, la présentation antigénique par le CMH de classe 1 fait intervenir une machinerie importante depuis le RE et un important trafic vésiculaire depuis la formation des endosomes qui semblent perturbés dans les cellules BV-2 déficientes.

L'existence de telles anomalies a ainsi été évaluée plus spécifiquement dans le cadre d'un essai fonctionnel de présentation aux lymphocytes T CD8+. Les lymphocytes T de souris transgéniques OT-1 présentent un récepteur de cellule T (TCR) modifié pour reconnaître spécifiquement l'ovalbumine (OVA). Les lymphocytes T CD8+ des ganglions cervicaux, inguinaux et péritonéaux et des splénocytes de souris femelles OT-1 adultes ont été isolés à l'aide d'un kit de séparation magnétique des cellules CD8+ (MACS). Ces lymphocytes T primaires naïfs ont été incubés et chargés par la sonde calcique PBX préalablement à leur mise en contact avec les cellules présentatrices. En parallèle, les cellules microgliales BV-2 WT ou KO, préalablement stimulées ou non par le LPS pendant 24 h, sont incubées pendant 2 h en présence de l'octapeptide SIINFEKL de l'ovalbumine à la dose de 1 µM pour permettre sa présentation par le CMH de classe 1 H2-Kb. Les lymphocytes sont alors lentement déposés à la surface des cellules BV-2 présentatrices et la surveillance de l'activation lymphocytaire est effectuée par microscopie confocale à 37°C pendant environ 1 h sur un champ couvrant une centaine de cellules (Figure 21A). La réponse calcique des lymphocytes est alors analysée en post-acquisition et filtrée par un programme automatisé (« Methods for Automated and Accurate Analysis of Cell Signals » (MAAACS)), développé par l'équipe d'Hai-Tao He et Didier Marguet au CIML (Salles, Billaudeau et al. 2013). Les résultats des analyses obtenus à l'aide de MAAACS sont présentés sous-forme de code-barres (Figure 21B).

Les expériences contrôles réalisées sur les cellules BV-2 WT ne présentant pas le peptide OVA valident l'absence de signaux calciques dans les cellules lymphocytaires sans reconnaissance spécifique de la présentation par le CMH de classe 1 (Figure 21B). La plus

forte expression du répertoire de molécule permettant la présentation lymphocytaire en réponse au LPS semble suffisante pour induire les réponses calciques d'un plus grand nombre de lymphocytes et de plus fortes amplitudes des réponses calciques. Cette condition a ainsi été reproduite pour l'ensemble des génotypes pour permettre leurs comparaisons.

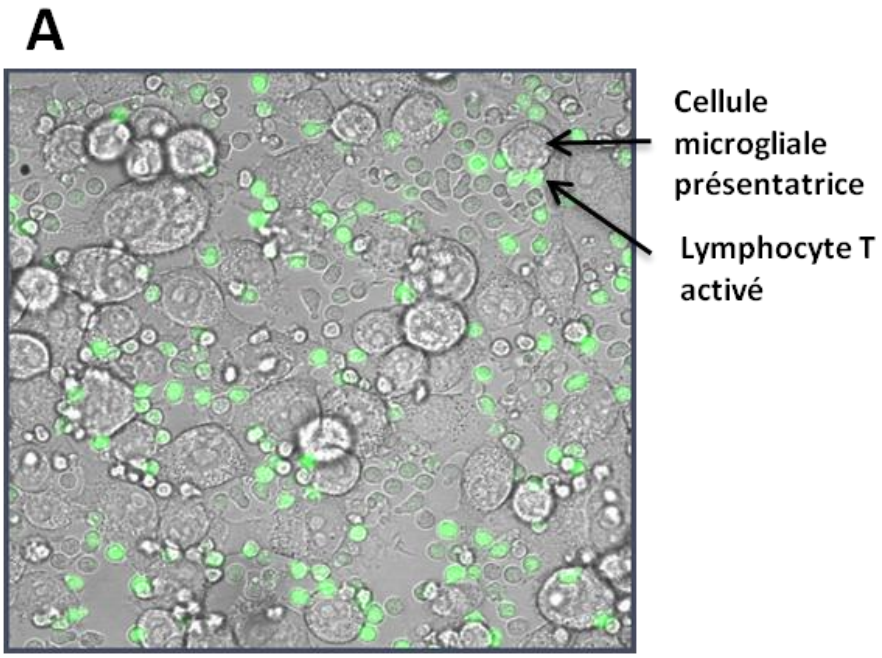
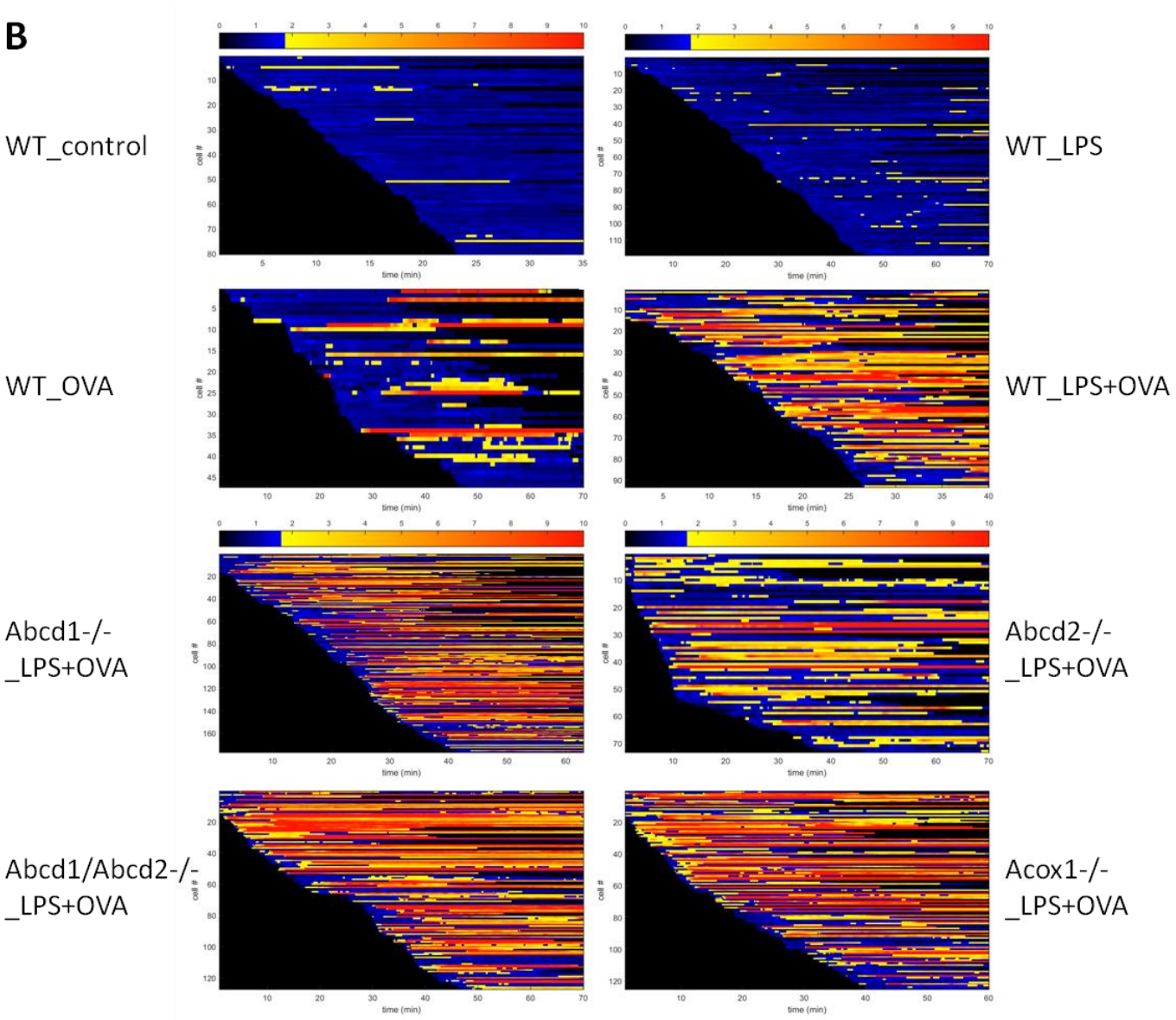
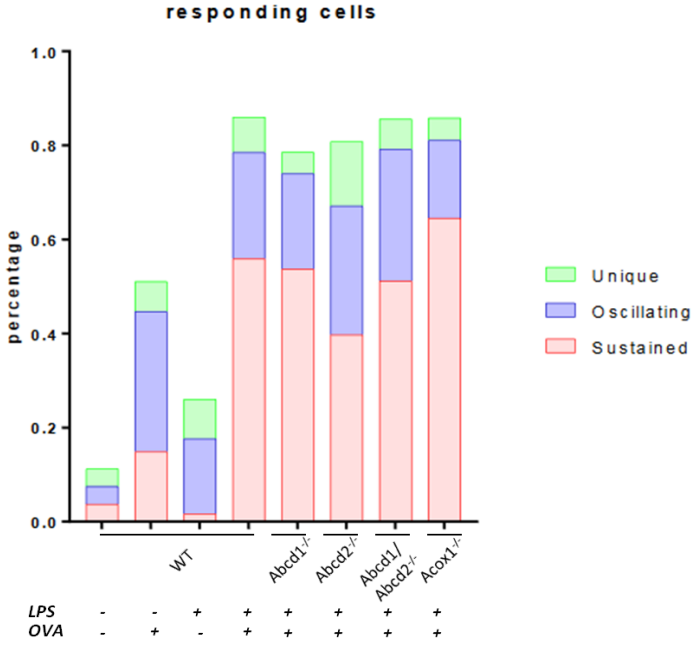
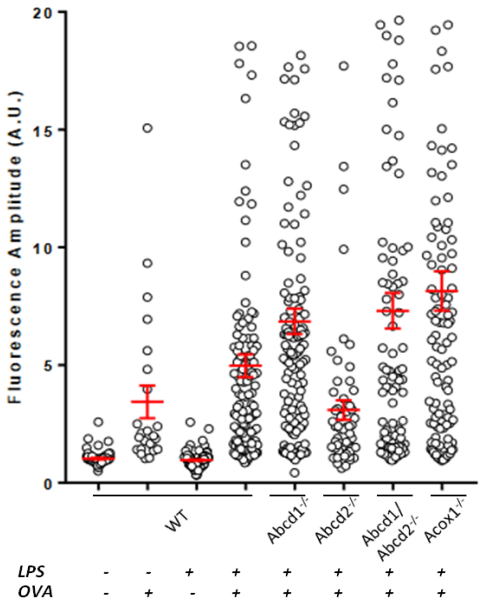


Figure 21 : Analyse de la présentation antigénique des cellules microgliales WT et déficientes en ABCD1, ABCD2, ABCD1/ABCD2 ou ACOX1.
Présentation du peptide OVA par le CMH de classe I des cellules microgliales et mesure du flux calcique de lymphocytes T CD8+ naïfs. Les cellules microgliales BV-2 WT ou KO sont préalablement activées par du LPS (22 h) puis chargées avec le peptide OVA pendant 2h. Des lymphocytes T CD8+ isolés de souris OT-1 sont chargés avec une sonde calcique et mis au contact des cellules microgliales présentatrices. Le flux calcique mesuré (fluorescence verte) en microscopie confocale est associé à la reconnaissance du peptide OVA présenté par le CMH de classe I des cellules BV-2 (A). Une analyse automatisée des signaux calciques enregistrés au cours du temps "Methods for Automated and Accurate Analysis of Cell Signals" (MAAACS) permet ensuite de quantifier l'activation lymphocytaire (B). Les « bar codes » représentent l'intensité de la réponse calcique lymphocytaire au cours du temps (nombre de lymphocytes suivis en ordonnée et temps en min en abscisse). La dynamique de la réponse calcique (unique, oscillante ou maintenue) et les amplitudes des réponses calciques sont représentées sous forme d'histogramme et de nuage de point respectivement.


B
WT_control
WT_LPS
WT_OVA
WT_LPS+OVA
Abcd1-/-
_LPS+OVA
Abcd2-/-
_LPS+OVA
Abcd1/Abcd2-/-
_LPS+OVA
Acox1-/-
_LPS+OVA
cell #
time (min)


responding cells
percentage
Unique
Oscillating
Sustained
WT
Abcd1-/-
Abcd2-/-
Abcd1/
Abcd2-/-
Acox1-/-
LPS
OVA


Fluorescence Amplitude (A.U.)
WT
Abcd1-/-
Abcd2-/-
Abcd1/
Abcd2-/-
Acox1-/-
LPS
OVA

La capacité des cellules BV-2 WT et KO à induire une transduction du signal dans les cellules T par ce type de présentation et dans ces conditions semble effective à l'exception des cellules déficientes en ABCD2. Il sera nécessaire de répéter cette expérience afin de confirmer ces résultats préliminaires. Il faudra notamment contrôler l'absence d'un artefact expérimental responsable de ce résultat surprenant. En effet, les cellules BV-2 semi-adhérentes ne forment pas de tapis cellulaire uniforme et il est possible qu'un problème lié au suivi en vidéo-microscopie pour l'acquisition sur cette condition ne reflète pas la capacité des cellules *Abcd2*$^{-/-}$ à induire une réponse spécifique des cellules T.

Outre l'importante variation observée avec les cellules *Abcd2*$^{-/-}$, la dynamique des fluctuations calciques des cellules lymphocytaires semble peu influencée par le génotype des cellules présentatrices. Toutefois l'intensité de cette réponse est légèrement augmentée en réponse à la stimulation des cellules BV-2 déficientes en ABCD1, ABCD1/ABCD2 ou ACOX1.

Ces résultats, s'ils sont confirmés, pourraient aboutir à une relecture de la présence d'infiltrats de lymphocytes T CD8+ régulièrement mis en évidence dans la CALD (Ito, Blumberg et al. 2001). Supposés être la conséquence d'une présentation lipidique anormale par le biais du CD1d, la présence de ces infiltrats pourrait être en lien avec une présentation anormale par les cellules microgliales via le CMH de classe 1 et mériterait donc une investigation plus poussée.

II.7. Propriétés de diffusion latérale des membranes des cellules déficientes

Outre ces dérégulations d'expression, les défauts lipidiques observés dans les cellules déficientes sont également suspectés d'altérer les propriétés physico-chimiques des membranes cellulaires. Les teneurs en cholestérol des membranes et la présence de domaines riches en sphingolipides apportent une certaine hétérogénéité membranaire favorisant ou régulant les interactions des protéines membranaires. L'organisation latérale des membranes et la capacité de diffusion des molécules qui la composent régulent de nombreuses fonctions biologiques et la transduction du signal dans la cellule (Lasserre, Guo et al. 2008).

Afin de mesurer les changements d'organisation membranaire des cellules microgliales déficientes, des mesures de diffusion latérale ont été effectuées par une approche non-invasive de spectroscopie de corrélation de fluorescence à variation de spot (« spot variation fluorescence correlation spectroscopy » ou svFCS). Le principe général de la FCS

repose sur l'enregistrement des fluctuations de fluorescence pour un temps défini et pour une surface confocale d'illumination donnée (défini en tant que « Waist » en µm²). L'interprétation de ces fluctuations de fluorescence apporte des informations sur la dynamique des molécules observées selon leurs diffusions, leurs interactions ou leurs réactions chimiques. En faisant varier les surfaces confocales (svFCS), il est possible d'analyser les temps de diffusion en fonction de l'aire observée. Ces analyses permettent alors le tracé d'une loi de diffusion et l'obtention de deux paramètres pertinents que sont le t_0 (temps calculé à l'ordonnée à l'origine) et le coefficient de diffusion effectif D_{eff} (Figure 22B). Plusieurs modèles prédictifs des caractéristiques de diffusion des molécules à la membrane plasmique ont été déterminés et permettent d'interpréter ces deux paramètres (Figure 22B). Le matériel nécessaire à ces analyses et la méthodologie employée pour l'obtention de ces paramètres ont été décrits en détail par Mailfert et ses collaborateurs (Mailfert, Hamon et al. 2017).

Les cellules BV-2 WT ou KO ont été transfectées et sélectionnées pour exprimer stablement une protéine chimérique composée des 12 premiers acides aminés de la protéine Lck fusionnée à une EGFP (Figure 22A). La protéine Lck présente des sites de palmitoylation et de myristoylation et est ainsi connue pour interagir avec les domaines lipidiques membranaires ou « radeaux lipidiques » (« lipid raft ») (Stenberg, Pestina et al. 1997). Cette protéine est donc principalement localisée au feuillet interne de la membrane plasmique (Figure 22A).

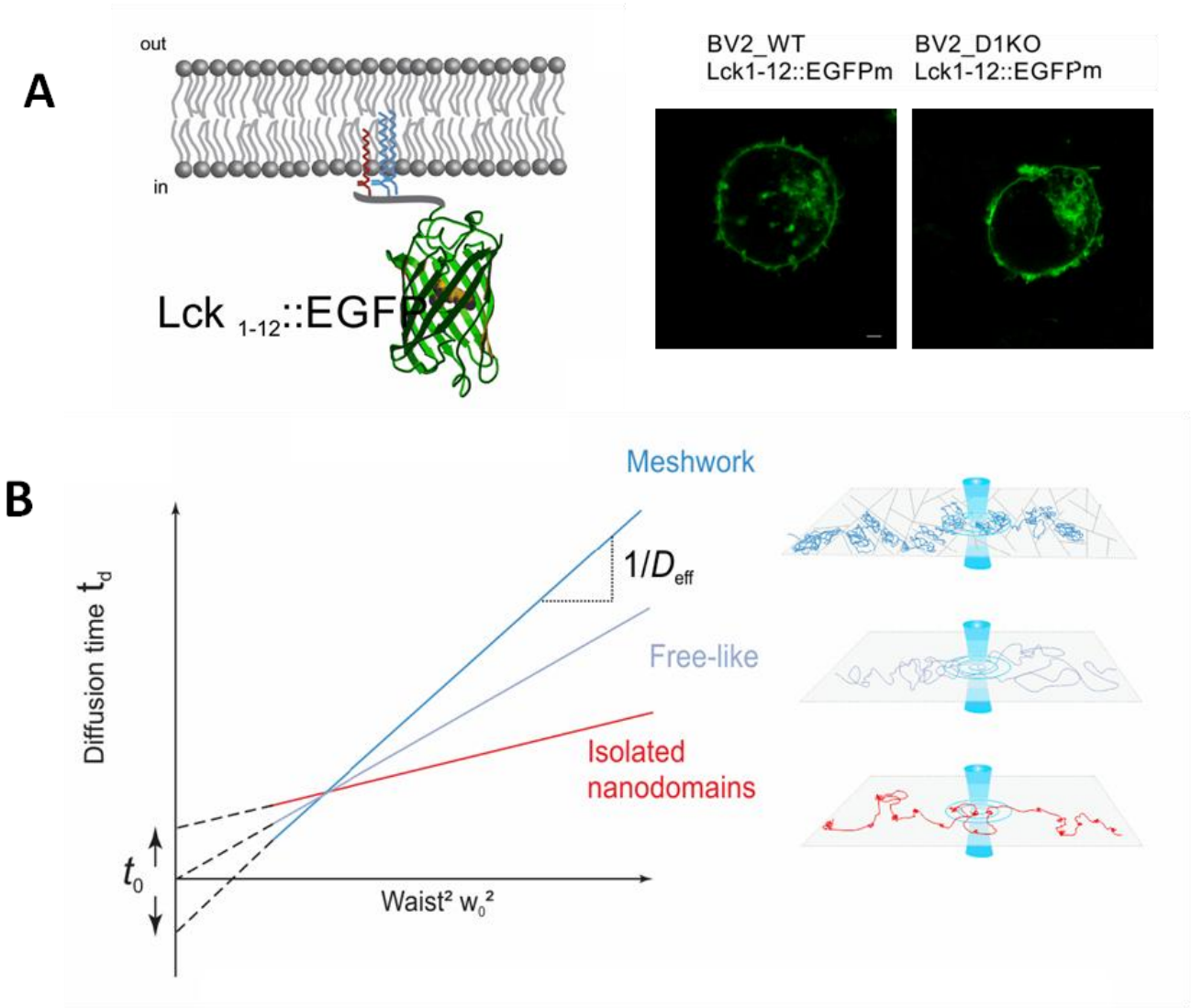
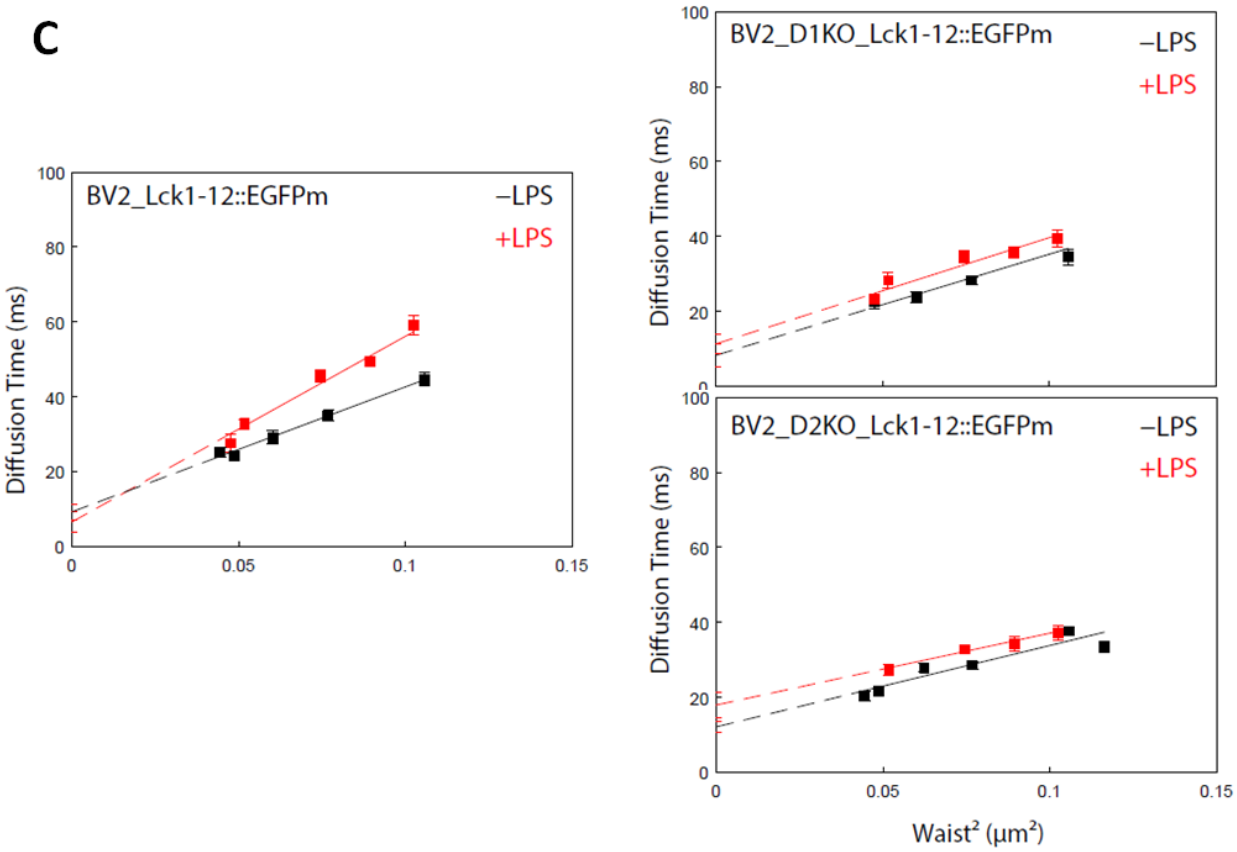


Figure 22 : Analyse de l'organisation latérale membranaire des cellules BV-2 WT et déficientes en ABCD1 ou en ABCD2 par spectroscopie à corrélation de fluorescence et variation de spot (svFCS).
Les cellules BV-2 WT ou déficientes en ABCD1 ou en ABCD2 (cellules non montrées) sont transfectées puis sélectionnées pour exprimer stablement la protéine chimérique préférentiellement localisée dans les radeaux lipidiques membranaires Lck_{1-12}::EGFP (A). La diffusion latérale de la sonde rafteuse membranaire fluorescente est mesurée par FCS et les temps de diffusion calculés pour chaque taille de spot permettent ainsi de tracer une loi de diffusion. Des modèles théoriques sont utilisés pour prédire l'organisation latérale membranaire et les contraintes rencontrées (diffusion libre de la sonde, présence de nanodomaines isolés, ou d'un maillage membranaire)(B). Ces lois de diffusion ont pu être calculées pour les cellules BV-2 WT ou déficientes en ABCD1 (D1KO) ou ABCD2 (D2KO) préalablement traitées ou non avec du LPS (C).



Les cellules sont cultivées en milieu délipidé (OptiMEM, Nutridoma 1%) et traitées avec ou sans LPS pendant 24 h avant d'effectuer les mesures de svFCS. Les temps de diffusion de la protéine chimérique EGFP ont alors été mesurés pour 4 à 6 « Waist » par condition et sont représentés sous la forme d'une loi de diffusion tracée pour chaque condition (Figure 22C). L'obtention d'un t_0 positif pour chaque condition semble indiquer une organisation membranaire de type nanodomaines isolés ou radeaux lipidiques. Le coefficient de diffusion mesuré pour la sonde « rafteuse » dans les cellules BV-2 WT est affecté par l'activation de ces cellules en présence de LPS et indique un changement d'organisation latérale de la membrane plasmique dans ces conditions. De façon intéressante, bien que des paramètres comparables aient pu être calculés dans les cellules BV-2 déficientes en ABCD1 ou ABCD2, ces changements d'organisation membranaire en réponse au LPS ne sont pas observés. Il semble très probable qu'une réorganisation des membranes en réponse à un stimulus inflammatoire permette aux cellules microgliales de répondre efficacement à ce stress notamment par le biais de voie de signalisation dépendant de cette organisation membranaire. Le défaut observé dans les cellules *Abcd1*$^{-/-}$ et *Abcd2*$^{-/-}$ en réponse au LPS apparaîtrait alors comme un effet majeur du défaut métabolique peroxysomal avec des répercussions considérables sur leur capacité à transduire des signaux essentiels pour la physiologie cellulaire ou une réponse immunitaire adaptée.

Ces mêmes mesures n'ont pas encore pu être réalisées dans les cellules *Acox1*$^{-/-}$ et *Abcd1*$^{-/-}$*/Abcd2*$^{-/-}$ mais seraient d'un grand intérêt afin d'évaluer un effet plus direct de l'accumulation d'AGTLC sur l'organisation latérale des membranes et dans le contexte physiopathologoqique des leucodystrophies peroxysomales. Enfin, une évaluation du comportement de protéines membranaires par le biais de fragment de liaison antigénique (Fab) ou d'autres sondes présentant une affinité différente pour les radeaux lipidiques permettrait de mieux appréhender les réorganisations membranaires auxquelles les cellules BV-2 WT ou déficientes sont soumises, notamment en réponse au LPS.

DISCUSSION GENERALE

Limitations des modèles cellulaires

L'une des principales limitations des observations présentées dans ces travaux est liée à l'utilisation d'un seul clone déficient pour chaque génotype. Une confirmation des résultats dans des clones présentant des mutations distinctes aurait permis de consolider nos conclusions et d'écarter le risque d'interprétations erronées en lien avec un « effet clone ». C'est dans ce but que l'on pourrait envisager de réexprimer les protéines manquantes dans chacune des lignées déficientes afin de vérifier si l'on récupère le phénotype WT dans ces cellules. Ces expériences de « rescuing » par transfection permettant une expression transitoire de la protéine déficiente dans les cellules mutées font partie des contrôles prévus lors de futures expériences. Une validation des effets attribués aux déficiences peroxysomales sera dans tous les cas nécessaire sur un autre modèle expérimental, *in vitro* ou *in vivo*. Des collaborations avec les équipes possédant des souris déficientes en MFP2 (lab. M. Baes Leuven) ou en ABCD1/ABCD2 (lab. A. Pujol Idibel) sont envisagées pour valider certains résultats dans la microglie primaire de ces souris. Une stratégie d'inactivation génétique similaire dans des cellules humaines (lignée monocytaire THP-1 par exemple) pourrait également être envisagée. Ces modèles représentent toutefois un moyen simple d'utilisation, rapide et efficace d'observer les effets des défauts métaboliques peroxysomaux dans la microglie.

Dans les perspectives envisagées, il est aussi prévu de tester l'influence des cellules microgliales déficientes, en co-culture ou en utilisant des milieux conditionnés, sur des oligodendrocytes 158N. La stratégie CRISPR/Cas9, les outils et les protocoles mis en place, ayant démontré leur efficacité sur cellule murine, il sera tentant d'obtenir des oligodendrocytes 158N mutés sur les gènes *Abcd1*, *Abcd2* et *Acox1* de façon à réaliser des expériences « en miroir » (cellule microgliale WT et oligodendrocyte muté) ou des expériences mimant une situation de déficience peroxysomale multiple pour étudier l'incidence de ces dysfonctionnement sur les aspects de communication cellulaire. Les mutations des gènes *Abcd1*, *Abcd2* et *Acox1*, dans une lignée lymphocytaire murine a également été initié au CIML.

Conséquences métaboliques des inactivations peroxysomales dans les cellules microgliales

L'inactivation des transporteurs ABCD1 et ABCD2 ou de l'enzyme ACOX1 dans les cellules microgliales a, comme attendu, eu pour conséquence métabolique une accumulation d'AGTLC (C26:0, C24:0, C26:1 et C24:1). Cette accumulation d'AGTLC est la caractéristique biochimique principale des leucodystrophies peroxysomales et confirme donc le déficit de β-oxydation peroxysomale dans ces cellules microgliales. Les modèles cellulaires simple-déficients en ABCD1 ou ABCD2 ne présentent pas d'accumulation d'AGTLC. L'absence d'accumulation d'AGTLC très probablement attribuable à la redondance fonctionnelle de ces deux transporteurs confirme donc l'importance d'une expression compensatrice d'ABCD2 dans l'X-ALD. Les cellules déficientes pour les deux transporteurs ABCD1 et ABCD2 semblent donc être un modèle pertinent au vu de l'absence d'expression d'ABCD2 dans les cellules myéloïdes chez l'Homme. Ces différences d'expression d'ABCD2 entre l'Homme et la souris pourraient contribuer en partie à expliquer le phénotype moins sévère présent chez la souris déficiente en ABCD1, comme cela a déjà été suggéré (Muneer, Wiesinger et al. 2014). Cependant, une altération du métabolisme lipidique est remarquée dans toutes les cellules déficientes indépendamment de l'accumulation d'AGTLC. La baisse notable du contenu en EPA dans toutes ces cellules et le déséquilibre plus important du contenu en AG polyinsaturés n-3 et n-6 dans les cellules déficientes en ABCD1, certainement en conséquence de réponses transcriptionnelles spécifiques, n'ont pas encore été explorés. Une analyse des docosanoïdes et eicosanoïdes libérés par ces cellules serait d'un grand intérêt au vu de ces changements. Une implication de tels médiateurs lipidiques a déjà été suggérée dans l'AMN mais leur rôle dans la réponse neuro-inflammatoire de la CALD n'a jamais été observé (Ruiz, Jove et al. 2015).

Une accumulation lipidique importante semble résulter de la déficience en ABCD1 et est également mise en évidence par une élévation considérable du niveau de cholestérol total dans la cellule. Sa très forte accumulation sous forme estérifiée aux AGTLC semble jouer un rôle important dans les lésions démyélinisantes de la CALD et il est tout à fait possible que les mesures effectuées après saponification reflètent essentiellement son accumulation sous forme estérifiée (Paintlia, Gilg et al. 2003). La présence d'esters de cholestérol semble confirmée par l'analyse ultra-structurale et par une plus forte intensité du marquage Oil Red O dans les cellules *Abcd1*$^{-/-}$ et *Abcd1*$^{-/-}$/*Abcd2*$^{-/-}$, colorant présentant une plus forte affinité pour les lipides neutres et le cholestérol sous sa forme estérifiée. De façon surprenante, cette accumulation de

cholestérol est observée également en l'absence d'accumulation d'AGTLC et suggère donc un rôle plus spécifique du transporteur ABCD1 dans ces régulations. Par ailleurs, ce marquage réalisé dans un second clone déficient en ABCD1 semble démontrer le même phénotype d'accumulation lipidique écartant l'hypothèse d'un effet clone-dépendant. L'utilisation d'un marqueur du cholestérol tel que la filipine serait nécessaire afin d'avoir davantage d'informations sur ces anomalies et sa répartition dans la cellule.

Ces résultats questionnent ainsi les conséquences de l'accumulation d'AGTLC dans les pathologies peroxysomales. De façon intéressante, l'absence de PEX19 chez la drosophile, entraînant l'absence de peroxysome, est responsable d'un déficit en AG à chaîne moyenne et d'une élévation de la lipolyse. Le phénotype sévère alors observé dans ce modèle ne dépend pas de l'accumulation d'AGTLC (Sellin, Wingen et al. 2018).

Encore aujourd'hui, l'hypothèse expliquant les processus pathogéniques observés dans l'X-ALD (CALD, AMN et insuffisance surrénale) repose sur la toxicité attribuée à l'accumulation d'AGTLC. Cependant, le transporteur ABCD1 semble en mesure de transporter une importante variété d'AG activés et sa fonction associée à la seule importation d'AGTLC au sein du peroxysome telle qu'elle a été définie repose essentiellement sur des observations indirectes (Aubourg 2015). Son implication dans d'autres mécanismes de transport dans la cellule ou d'autres processus métaboliques, a déjà été suggérée mais reste à explorer (Chu, Liao et al. 2015). Une caractérisation plus spécifique des métabolites lipidiques ou intermédiaires de voie de biosynthèse affectés par le défaut en ABCD1 dans ces cellules devrait être envisagée. Si l'expression d'ABCD2 permet de compenser l'accumulation d'AGTLC dans ces cellules, son expression ne permet peut-être pas de compenser le défaut lipidique majeur qui semble être engendré par la déficience en ABCD1. Si cela s'avère être le cas, les stratégies thérapeutiques dans le contexte de l'X-ALD visant à une induction pharmacologique de l'expression d'ABCD2 pourraient être remises en cause.

De façon notable, la croissance des cellules BV-2 déficientes en ABCD1 ou ABCD1/ABCD2 est impactée dès 48 h de culture, temps auquel la plupart des analyses, dont les analyses lipidiques, ont été effectuées. Si cet effet est probablement une conséquence du défaut métabolique, il est possible que la différence de densité cellulaire affecte également l'état métabolique des cellules ou leur contenu lipidique et soit responsable de certaines des différences observées.

De façon plutôt inattendue, le phénotype résultant du défaut de l'enzyme ACOX1, que l'on présumait plus sévère que celui de cellules déficientes en transporteurs ABCD1 et ABCD2, ne semble pas l'être. En effet, aussi bien l'accumulation d'AGTLC que les

anomalies ultra-structurales observées dans les cellules *Acox1*$^{-/-}$ semblent moins sévères que celles des cellules *Abcd1*$^{-/-}$/*Abcd2*$^{-/-}$. Ces résultats posent donc la question de savoir si la β-oxydation des AGTLC au sein du peroxysome ne dépend que de l'activité de l'ACOX1 dans les cellules BV-2. Afin de compléter cette étude, la génération de modèles BV-2 combinant des délétions complémentaires (une lignée triple-déficiente pour ABCD1, ABCD2 et ACOX1 par exemple) pourrait être envisagée. D'autre part, le transporteur ABCD3, s'il présente une plus forte affinité envers les AG à chaîne branché, AG dicarboxyliques et précurseurs d'acides biliaires, est également compétent pour le transport d'AGTLC et pourrait permettre une compensation non-négligeable des défauts en ABCD1/ABCD2. L'inactivation combinée des 3 transporteurs ABCD1, ABCD2 et ABCD3 dans ces cellules pourrait aussi être d'un grand intérêt.

Une perturbation de l'homéostasie redox est très fortement suggérée par une expression et une activité élevée d'enzymes telle que la catalase dans ces cellules. Bien qu'il soit tentant de l'associer à une activité de β-oxydation peroxysomale déficiente, son origine n'est pas encore expliquée. Les tentatives de dosage des anions superoxydes dans ces cellules n'ont pas permis d'obtenir de résultats interprétables. Si cette perturbation venait à être confirmée, il serait intéressant d'évaluer son impact sur l'intégrité mitochondriale dans les cellules.

Conséquences des inactivations peroxysomales sur la plasticité des cellules microgliales

Les défauts métaboliques observés sont également associés à des anomalies de la prolifération mitochondriale et peroxysomale. Une analyse du nombre et de la répartition des peroxysomes effectuée par microscopie confocale semble confirmer une importante prolifération peroxysomale dans les cellules BV-2 déficientes en ABCD1, ABCD2 ou ACOX1 (entre x1,7 et x2,2) par comparaison aux cellules WT. Ces dérégulations sont souvent décrites comme dépendantes de PPARα mais son expression très faible voire nulle dans les cellules microgliales BV-2 présuppose un autre mode de régulation. L'activation et la réponse inflammatoire de la microglie, comme dans les macrophages, passe par une importante reprogrammation métabolique et une régulation d'OXPHOS. En effet, dans ces cellules la génération d'ATP et de NADPH est essentielle pour permettre la génération d'une réponse immunitaire pro-oxydante (Kelly and O'Neill 2015). La prolifération mitochondriale et peroxysomale dans ces cellules pourrait traduire une altération de la capacité de ces cellules

à produire la réponse métabolique nécessaire. La faible accumulation de lactate et la baisse du taux de pyruvate dans les cellules déficientes en ABCD1, ABCD2 et ABCD1/ABCD2 semblent confirmer une glycolyse dérégulée. Des analyses complémentaires dans ces cellules en présence de LPS seront nécessaires pour élucider ce point. Ces mécanismes sont régulés de façon bidirectionnelle avec la production de NO et sont couplés aux variations d'expression de nombreux marqueurs et cytokines inflammatoires (Orihuela, McPherson et al. 2016).

Les baisses d'expression des récepteurs P2RY12 et CX3CR1 dans toutes les cellules microgliales déficientes semblent être un bon indicateur de la perte de l'état homéostatique associée à la voie de signalisation TGFβ (Butovsky, Jedrychowski et al. 2014). Il est intéressant de noter que l'expression des gènes *Apoe* et *Trem2* est négativement corrélée à cette signature homéostatique et associée à une réponse microgliale anormale dans plusieurs maladies neurodégénératives (Krasemann, Madore et al. 2017). La surexpression de *Trem2* dans ces cellules serait donc le signe d'une réponse microgliale pathologique. D'autre part, la surexpression des gènes *Mrc1, Il4, Pparγ* et *Pgc1β* semble traduire une polarisation altérée, davantage vers un phénotype M2, et est fortement susceptible d'expliquer les différences de phagocytose observées dans les cellules déficientes en ABCD2 ou ACOX1. Ce phénotype dans la microglie paraît davantage dépendant d'une plus forte activité de β-oxydation des AG. En parallèle, en réponse au LPS, un profil très particulier d'expression de cytokines est observé dans les cellules BV-2 déficientes en ABCD1 et ABCD1/ABCD2. Il semble dépendre d'une plus forte sécrétion de NO, d'IL-6 et de chimiokines (CCL2, CCL7, CCL9). Ce phénotype serait probablement davantage dépendant de la glycolyse (Byles, Covarrubias et al. 2013).

Un rôle pour mTORC1 dans l'apparition de ces phénotypes ?

Une implication du complexe mTORC1 apparaît alors comme une hypothèse attrayante pour expliquer un grand nombre des dérégulations observées dans les cellules microgliales déficientes. En effet, ce complexe joue un rôle central dans le contrôle de la polarisation des macrophages, de la respiration et du métabolisme cellulaire à travers plusieurs voies de signalisation dont la voie Akt (Byles, Covarrubias et al. 2013). Plusieurs hypothèses peuvent alors être proposées pour expliquer les événements observés dans ces cellules microgliales. Une signalisation entre le peroxysome et le complexe mTORC1 a été identifiée par l'intermédiaire du complexe « Tuberous Sclerosis Complex » (TSC). Une translocation du complexe TSC à la membrane peroxysomale par l'intermédiaire des

protéines PEX5 et PEX19 se produirait en réponse au stress oxydant généré par le peroxysome régulant alors l'activité de mTORC1 (Zhang, Kim et al. 2013). La perte d'homéostasie redox, qui semble résulter des déficiences en ABCD1, ABCD2 ou ACOX1, pourrait ainsi affecter l'activité de ce complexe. En parallèle, ce senseur de l'état métabolique de la cellule est activé de façon anormale en conséquence d'une accumulation lysosomale du cholestérol (Castellano, Thelen et al. 2017). Enfin, chez la souris, l'augmentation du contenu cellulaire en AG polyinsaturés n-3 induit une répression de l'activité de mTORC1 (Chen, Zhang et al. 2013). Les importantes dérégulations des contenus en AG polyinsaturés et cholestérol mesurées dans nos cellules semblent également en mesure d'affecter l'activité de ce complexe. Aucune régulation transcriptionnelle de cette voie n'a encore pu être identifiée mais des analyses biochimiques complémentaires seraient nécessaires pour étudier son implication potentielle, conduisant aux phénotypes observés dans les cellules BV-2 déficientes. Une réponse autophagique délétère dans ces modèles n'a pas encore été évaluée dans nos modèles. L'expression dérégulée d'*Atg13* observée dans les cellules microgliales déficientes pourrait potentiellement entraîner une pexophagie anormale et la prolifération peroxysomale observée en microscopie électronique. Une activité anormale de mTOR a récemment été proposée pour expliquer les anomalies métaboliques de l'X-ALD (Pujol 2016). Il serait alors intéressant d'évaluer les effets de modulateurs de l'activité de ce complexe, notamment certains inhibiteurs dérivés de la rapamycine, sur le phénotype des cellules déficientes. Le lien entre le défaut métabolique peroxysomal et une activité anormale du complexe mTORC1 dans les cellules microgliales, est proposé de façon synthétique dans la figure ci-dessous (Figure 23).

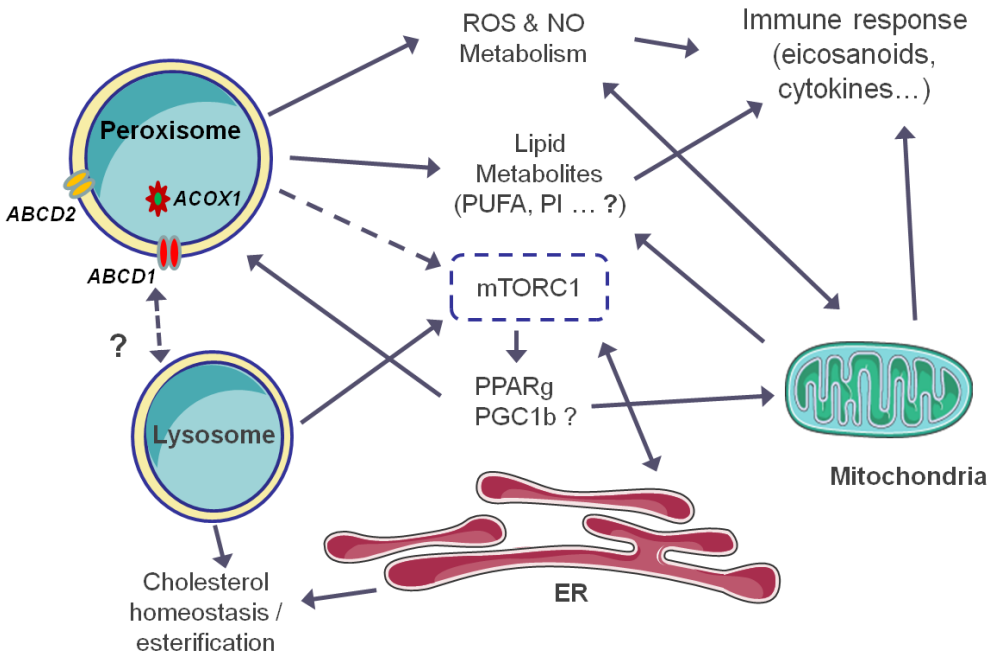


Figure 23 : Le complexe mTORC1 pourrait jouer un rôle central dans le défaut métabolique observé dans les cellules microgliales déficientes en ABCD1, ABCD2 ou ACOX1.
Le défaut de métabolisme lipidique ou oxydatif peroxysomal dans la microglie pourrait modifier l'activation du complexe, en impliquant par exemple une interaction direct avec le peroxysome (Zhang, Kim et al. 2013) ou indirect avec d'autres organites cellulaires comme le RE ou le lysosome (Castellano, Thelen et al. 2017).

Conséquences des inactivations peroxysomales sur l'organisation membranaire des cellules microgliales

De façon intéressante, la réponse inflammatoire et la réponse au LPS des macrophages semblent très fortement dépendante de la biosynthèse des AG et du cholestérol. En effet, l'acétoacétyl-CoA produit par la « fatty acid synthase » (FASN) dans ces cellules est nécessaire à la synthèse du cholestérol et à la formation des radeaux lipidiques membranaires. L'organisation des radeaux lipidiques semble alors essentielle à la réponse au LPS par le TLR4 (Carroll, Zaslona et al. 2018). Les résultats obtenus dans les cellules microgliales déficientes en ABCD1 ou ABCD2 suggèrent justement une incapacité de ces cellules à réorganiser leurs membranes en réponse au LPS. Les changements d'organisation latérale de la membrane plasmique de ces cellules sont probablement en mesure d'altérer la transduction d'un grand nombre de signaux dans la microglie, dont ceux entraînant une réponse immunitaire adaptée.

La réponse antivirale semble également affectée dans les cellules microgliales déficientes en ABCD1 ou ABCD2 (Tableau 5) et celle-ci est fortement liée à la biosynthèse des AG et du cholestérol dans les macrophages à travers des mécanismes impliquant notamment SREBP2 (York, Williams et al. 2015). La réponse transcriptionnelle anti-virale, indépendante de la production d'IFN, fait notamment intervenir les protéines peroxysomales MAVS (Dixit, Boulant et al. 2010). Cette réponse anti-virale semble aussi associée à la synthèse enzymatique de 25HC dans les macrophages et probablement aussi à une réorganisation des membranes cellulaires. Il paraît alors intéressant de mettre en parallèle une réponse anti-virale altérée dans la microglie présentant un défaut du métabolisme peroxysomal et le rôle suggéré du 25-HC dans l'induction d'une réponse pro-inflammatoire dans l'X-ALD (Jang, Park et al. 2016). Une analyse plus approfondie de la réponse transcriptomique de la microglie déficiente en présence de 25HC permettra peut-être d'apporter une réponse pertinente à ce sujet.

CONCLUSION

En résumé, ces travaux mettent en évidence l'intérêt de techniques d'édition génique récentes comme CRISPR-Cas9 pour établir des modèles cellulaires expérimentaux et permettre d'explorer la fonction de gènes impliqués dans des maladies telles que l'X-ALD. L'inactivation des gènes *Abcd1, Abcd2* ou *Acox1* dans les cellules microgliales BV-2 est responsable d'un dérèglement métabolique important et caractérisé, de façon non-exhaustive, par une accumulation lipidique (d'AGTLC dans les cellules déficientes en ACOX1 et ABCD1/ABCD2 mais aussi de cholestérol et d'AG poly-insaturés dans les cellules déficientes en ABCD1 et ABCD1/ABCD2) par une perte de l'homéostasie redox, ainsi qu'une anomalie de prolifération mitochondriale et peroxysomale. Les résultats obtenus valident aussi l'intérêt de tels modèles cellulaires pour étudier les conséquences d'un dérèglement métabolique sur la réponse immunitaire des cellules microgliales et l'atteinte de leur plasticité. La perte de l'état homéostatique et l'expression de marqueurs caractéristiques d'un état activé dans ces cellules semblent être associées à une réponse au LPS, une activité de phagocytose et une présentation antigénique anormale.

Ces résultats suggèrent notamment une implication des gènes peroxysomaux *Abcd1, Abcd2* et *Acox1* dans la réponse métabolique des cellules microgliales à travers ; i) la reprogrammation métabolique qui permet à ces cellules de répondre de façon adaptée à un stimulus inflammatoire ou non, ii) la régulation et la biosynthèse de métabolites lipidiques indispensables à l'organisation de la membrane plasmique et à la transduction d'une signalisation appropriée. Enfin, ces résultats semblent démontrer une implication du transporteur ABCD1 dans d'autres fonctions que la simple régulation du taux d'AGTLC dans les cellules microgliales.

Ces travaux soulèvent ainsi de nombreuses questions auxquelles la plupart des études exploratoires présentées ici n'ont pas encore permis de répondre. Une analyse plus aboutie du profil transcriptomique de ces cellules et les travaux complémentaires envisagés (analyses des lipides complexes, analyses biochimiques des voies de signalisation affectées…) devraient néanmoins permettre d'apporter des explications substantielles aux mécanismes physiopathologiques de l'X-ALD. Les défauts identifiés dans ces modèles cellulaires seront également d'un grand intérêt dans l'optique de criblages pharmacologiques et dans le but de faire émerger des molécules à potentiel thérapeutique.

BIBLIOGRAPHIE

Abud, E. M., R. N. Ramirez, E. S. Martinez, L. M. Healy, C. H. H. Nguyen, S. A. Newman, A. V. Yeromin, V. M. Scarfone, S. E. Marsh, C. Fimbres, C. A. Caraway, G. M. Fote, A. M. Madany, A. Agrawal, R. Kayed, K. H. Gylys, M. D. Cahalan, B. J. Cummings, J. P. Antel, A. Mortazavi, M. J. Carson, W. W. Poon and M. Blurton-Jones (2017). "iPSC-Derived Human Microglia-like Cells to Study Neurological Diseases." Neuron **94**(2): 278-293.e279.

Albet, S., C. Causeret, M. Bentejac, J. L. Mandel, P. Aubourg and B. Maurice (1997). "Fenofibrate differently alters expression of genes encoding ATP-binding transporter proteins of the peroxisomal membrane." FEBS Lett **405**(3): 394-397.

Andreoletti, P., Q. Raas, C. Gondcaille, M. Cherkaoui-Malki, D. Trompier and S. Savary (2017). "Predictive Structure and Topology of Peroxisomal ATP-Binding Cassette (ABC) Transporters." Int J Mol Sci **18**(7).

Asheuer, M., F. Pflumio, S. Benhamida, A. Dubart-Kupperschmitt, F. Fouquet, Y. Imai, P. Aubourg and N. Cartier (2004). "Human CD34+ cells differentiate into microglia and express recombinant therapeutic protein." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(10): 3557-3562.

Atagi, Y., C. C. Liu, M. M. Painter, X. F. Chen, C. Verbeeck, H. Zheng, X. Li, R. Rademakers, S. S. Kang, H. Xu, S. Younkin, P. Das, J. D. Fryer and G. Bu (2015). "Apolipoprotein E Is a Ligand for Triggering Receptor Expressed on Myeloid Cells 2 (TREM2)." J Biol Chem **290**(43): 26043-26050.

Aubourg, P. (2015). "Cerebral adrenoleukodystrophy: a demyelinating disease that leaves the door wide open." Brain **138**(Pt 11): 3133-3136.

Aubourg, P., C. Adamsbaum, M. C. Lavallard-Rousseau, F. Rocchiccioli, N. Cartier, I. Jambaque, C. Jakobezak, A. Lemaitre, F. Boureau, C. Wolf and e. al (1993). "A two-year trial of oleic and erucic acids (\"Lorenzo's oil) as treatment for adrenomyeloneuropathy." new england journal of medicine **329**(11): 745-752.

Aubourg, P., S. Blanche, I. Jambaque, F. Rocchiccioli, G. Kalifa, C. Naud-Saudreau, M. O. Rolland, M. Debre, J. L. Chaussain, C. Griscelli and 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., M. Khan, A. Singh and I. Singh (2015). "Functional Characterization of IPSC-Derived Brain Cells as a Model for X-Linked Adrenoleukodystrophy." PLoS One **10**(11): e0143238.

Baes, M., M. Dewerchin, A. Janssen, D. Collen and P. Carmeliet (2002). "Generation of Pex5-loxP mice allowing the conditional elimination of peroxisomes." Genesis **32**(2): 177-178.

Baig, M. S., S. V. Zaichick, M. Mao, A. L. de Abreu, F. R. Bakhshi, P. C. Hart, U. Saqib, J. Deng, S. Chatterjee, M. L. Block, S. M. Vogel, A. B. Malik, M. E. L. Consolaro, J. W. Christman, R. D. Minshall, B. N. Gantner and M. G. Bonini (2015). "NOS1-derived nitric oxide promotes NF-κB transcriptional activity through inhibition of suppressor of cytokine signaling-1." The Journal of Experimental Medicine **212**(10): 1725-1738.

Baker, A., D. J. Carrier, T. Schaedler, H. R. Waterham, C. W. van Roermund and F. L. Theodoulou (2015). "Peroxisomal ABC transporters: functions and mechanism." Biochem Soc Trans **43**(5): 959-965.

Barbier, M., A. Sabbagh, E. Kasper, M. Asheuer, O. Ahouansou, I. Pribill, S. Forss-Petter, M. Vidaud, J. Berger and P. Aubourg (2012). "CD1 gene polymorphisms and phenotypic variability in X-linked adrenoleukodystrophy." PLoS One **7**(1): e29872.

Beers, D. R., J. S. Henkel, Q. Xiao, W. Zhao, J. Wang, A. A. Yen, L. Siklos, S. R. McKercher and S. H. Appel (2006). "Wild-type microglia extend survival in PU.1 knockout mice with familial amyotrophic lateral sclerosis." Proc Natl Acad Sci U S A **103**(43): 16021-16026.

Berger, J., S. Albet, M. Bentejac, A. Netik, A. Holzinger, A. A. Roscher, M. Bugaut and S. Forss-Petter (1999). "The four murine peroxisomal ABC-transporter genes differ in constitutive, inducible and developmental expression." Eur J Biochem **265**(2): 719-727.

Berger, J., F. Dorninger, S. Forss-Petter and M. Kunze (2016). "Peroxisomes in brain development and function." Biochim Biophys Acta **1863**(5): 934-955.

Berger, J., S. Forss-Petter and F. S. Eichler (2014). "Pathophysiology of X-linked adrenoleukodystrophy." Biochimie **98**: 135-142.

Berger, J., B. Molzer, I. Fae and H. Bernheimer (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.

Bezman, L. and H. W. Moser (1998). "Incidence of X-linked adrenoleukodystrophy and the relative frequency of its phenotypes." Am J Med Genet **76**(5): 415-419.

Blasi, E., R. Barluzzi, V. Bocchini, R. Mazzolla and F. Bistoni (1990). "Immortalization of murine microglial cells by a v-raf/v-myc carrying retrovirus." J Neuroimmunol **27**(2-3): 229-237.

Bouquet, F., C. Dehais, M. Sanson, C. Lubetzki and C. Louapre (2015). "Dramatic worsening of adult-onset X-linked adrenoleukodystrophy after head trauma." Neurology **85**(22): 1991-1993.

Brennemann, W., W. Kohler, S. Zierz and D. Klingmuller (1997). "Testicular dysfunction in adrenomyeloneuropathy." Eur J Endocrinol **137**(1): 34-39.

Brites, P., P. A. Mooyer, L. El Mrabet, H. R. Waterham and R. J. Wanders (2009). "Plasmalogens participate in very-long-chain fatty acid-induced pathology." Brain **132**(Pt 2): 482-492.

Brose, R. D., D. Avramopoulos and K. D. Smith (2012). "SOD2 as a potential modifier of X-linked adrenoleukodystrophy clinical phenotypes." J Neurol **259**(7): 1440-1447.

Brown, G. C. (2001). "Regulation of mitochondrial respiration by nitric oxide inhibition of cytochrome c oxidase." Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics **1504**(1): 46-57.

Burtman, E. and M. O. Regelmann (2016). "Endocrine Dysfunction in X-Linked Adrenoleukodystrophy." Endocrinol Metab Clin North Am **45**(2): 295-309.

Butovsky, O., M. P. Jedrychowski, C. S. Moore, R. Cialic, A. J. Lanser, G. Gabriely, T. Koeglsperger, B. Dake, P. M. Wu, C. E. Doykan, Z. Fanek, L. Liu, Z. Chen, J. D. Rothstein, R. M. Ransohoff, S. P. Gygi, J. P. Antel and H. L. Weiner (2014). "Identification of a unique TGF-beta-dependent molecular and functional signature in microglia." Nat Neurosci **17**(1): 131-143.

Byles, V., A. J. Covarrubias, I. Ben-Sahra, D. W. Lamming, D. M. Sabatini, B. D. Manning and T. Horng (2013). "The TSC-mTOR pathway regulates macrophage polarization." Nature Communications **4**: 2834.

Cappa, M., E. Bertini, P. del Balzo, P. Cambiaso, A. Di Biase and S. Salvati (1994). "High dose immunoglobulin IV treatment in adrenoleukodystrophy." J Neurol Neurosurg Psychiatry **57 Suppl**: 69-70; discussion 71.

Carroll, R. G., Z. Zaslona, S. Galvan-Pena, E. L. Koppe, D. C. Sevin, S. Angiari, M. Triantafilou, K. Triantafilou, L. K. Modis and L. A. O'Neill (2018). "An unexpected link between fatty acid synthase and cholesterol synthesis in proinflammatory macrophage activation." J Biol Chem **293**(15): 5509-5521.

Cartier, N., S. Guidoux, F. Rocchiccioli and P. Aubourg (2000). "Simvastatin does not normalize very long chain fatty acids in adrenoleukodystrophy mice." FEBS Letters **478**(3): 205-208.

Cartier, N., S. Hacein-Bey-Abina, C. C. Bartholomae, G. Veres, M. Schmidt, I. Kutschera, M. Vidaud, U. Abel, L. Dal-Cortivo, L. Caccavelli, N. Mahlaoui, V. Kiermer, D. Mittelstaedt, C. Bellesme, N. Lahlou, F. Lefrere, S. Blanche, M. Audit, E. Payen, P. Leboulch, B. l'Homme, P. Bougneres, C. Von Kalle, A. Fischer, M. Cavazzana-Calvo and P. Aubourg (2009). "Hematopoietic stem cell gene therapy with a lentiviral vector in X-linked adrenoleukodystrophy." Science **326**(5954): 818-823.

Castellano, B. M., A. M. Thelen, O. Moldavski, M. Feltes, R. E. N. van der Welle, L. Mydock-McGrane, X. Jiang, R. J. van Eijkeren, O. B. Davis, S. M. Louie, R. M. Perera, D. F. Covey, D. K. Nomura, D. S. Ory and R. Zoncu (2017). "Lysosomal cholesterol activates mTORC1 via an SLC38A9–Niemann-Pick C1 signaling complex." Science **355**(6331): 1306-1311.

Chang, T. K. H. and F. S. Abbott (2006). "Oxidative Stress as a Mechanism of Valproic Acid-Associated Hepatotoxicity." Drug Metabolism Reviews **38**(4): 627-639.

Chen, Z., Y. Zhang, C. Jia, Y. Wang, P. Lai, X. Zhou, Y. Wang, Q. Song, J. Lin, Z. Ren, Q. Gao, Z. Zhao, H. Zheng, Z. Wan, T. Gao, A. Zhao, Y. Dai and X. Bai (2013). "mTORC1/2 targeted by n-3 polyunsaturated fatty acids in the prevention of mammary tumorigenesis and tumor progression." Oncogene **33**: 4548.

Chevillard, G., M. C. Clemencet, P. Etienne, P. Martin, T. Pineau, N. Latruffe and V. Nicolas-Frances (2004). "Molecular cloning, gene structure and expression profile of two mouse peroxisomal 3-ketoacyl-CoA thiolase genes." BMC Biochem **5**: 3.

Cho, D.-H., Y. S. Kim, D. S. Jo, S.-K. Choe and E.-K. Jo (2018). "Pexophagy: Molecular Mechanisms and Implications for Health and Diseases." Molecules and Cells **41**(1): 55-64.

Chu, B. B., Y. C. Liao, W. Qi, C. Xie, X. Du, J. Wang, H. Yang, H. H. Miao, B. L. Li and B. L. Song (2015). "Cholesterol transport through lysosome-peroxisome membrane contacts." Cell **161**(2): 291-306.

Coelho, D., J. C. Kim, I. R. Miousse, S. Fung, M. du Moulin, I. Buers, T. Suormala, P. Burda, M. Frapolli, M. Stucki, P. Nurnberg, H. Thiele, H. Robenek, W. Hohne, N. Longo, M. Pasquali, E. Mengel, D. Watkins, E. A. Shoubridge, J. Majewski, D. S. Rosenblatt, B. Fowler, F. Rutsch and M. R. Baumgartner (2012). "Mutations in ABCD4 cause a new inborn error of vitamin B12 metabolism." Nat Genet **44**(10): 1152-1155.

Colonna, M. and O. Butovsky (2017). "Microglia Function in the Central Nervous System During Health and Neurodegeneration." Annu Rev Immunol **35**: 441-468.

Curiel, J., S. J. Steinberg, S. Bright, A. Snowden, A. B. Moser, F. Eichler, H. A. Dubbs, J. G. Hacia, J. J. Ely, J. Bezner, A. Gean and A. Vanderver (2017). "X-linked adrenoleukodystrophy in a chimpanzee due to an ABCD1 mutation reported in multiple unrelated humans." Mol Genet Metab **122**(3): 130-133.

Davalos, D., J. Grutzendler, G. Yang, J. V. Kim, Y. Zuo, S. Jung, D. R. Littman, M. L. Dustin and W. B. Gan (2005). "ATP mediates rapid microglial response to local brain injury in vivo." Nat Neurosci **8**(6): 752-758.

De Marcos Lousa, C., C. W. van Roermund, V. L. Postis, D. Dietrich, I. D. Kerr, R. J. Wanders, S. A. Baldwin, A. Baker and F. L. Theodoulou (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.

Debbabi, M., T. Nury, I. Helali, E. M. Karym, F. Geillon, C. Gondcaille, D. Trompier, A. Najid, S. Terreau, M. Bezine, A. Zarrouk, A. Vejux, P. Andreoletti, M. Cherkaoui-Malki, S. Savary and G. Lizard (2017). "Flow Cytometric Analysis of the Expression Pattern of Peroxisomal Proteins, Abcd1, Abcd2, and Abcd3 in BV-2 Murine Microglial Cells." Methods Mol Biol **1595**: 257-265.

Di Cara, F., A. Sheshachalam, N. E. Braverman, R. A. Rachubinski and A. J. Simmonds (2017). "Peroxisome-Mediated Metabolism Is Required for Immune Response to Microbial Infection." Immunity **47**(1): 93-106 e107.

Di Rocco, M., L. Doria-Lamba and U. Caruso (2001). "Monozygotic twins with X-linked adrenoleukodystrophy and different phenotypes." Ann Neurol **50**(3): 424.

Diczfalusy, U., O. Vesterqvist, B. F. Kase, E. Lund and S. E. Alexson (1993). "Peroxisomal chain-shortening of thromboxane B2: evidence for impaired degradation of thromboxane B2 in Zellweger syndrome." J Lipid Res **34**(7): 1107-1113.

Dixit, E., S. Boulant, Y. Zhang, A. S. Y. Lee, C. Odendall, B. Shum, N. Hacohen, Z. J. Chen, S. P. Whelan, M. Fransen, M. L. Nibert, G. Superti-Furga and J. C. Kagan (2010). "Peroxisomes Are Signaling Platforms for Antiviral Innate Immunity." Cell **141**(4): 668-681.

Dubey, P., G. V. Raymond, A. B. Moser, S. Kharkar, L. Bezman and H. W. Moser (2005). "Adrenal insufficiency in asymptomatic adrenoleukodystrophy patients identified by very long-chain fatty acid screening." J Pediatr **146**(4): 528-532.

Eichler, F., C. Duncan, P. L. Musolino, P. J. Orchard, S. De Oliveira, A. J. Thrasher, M. Armant, C. Dansereau, T. C. Lund, W. P. Miller, G. V. Raymond, R. Sankar, A. J. Shah, C. Sevin, H. B. Gaspar, P. Gissen, H. Amartino, D. Bratkovic, N. J. C. Smith, A. M. Paker, E. Shamir, T. O'Meara, D. Davidson,

P. Aubourg and D. A. Williams (2017). "Hematopoietic Stem-Cell Gene Therapy for Cerebral Adrenoleukodystrophy." N Engl J Med **377**(17): 1630-1638.

Eichler, F. S., J. Q. Ren, M. Cossoy, A. M. Rietsch, S. Nagpal, A. B. Moser, M. P. Frosch and R. M. Ransohoff (2008). "Is microglial apoptosis an early pathogenic change in cerebral X-linked adrenoleukodystrophy?" Ann Neurol **63**(6): 729-742.

Engelen, M., M. Barbier, I. M. Dijkstra, R. Schur, R. M. de Bie, C. Verhamme, M. G. Dijkgraaf, P. A. Aubourg, R. J. Wanders, B. M. van Geel, M. de Visser, B. T. Poll-The and S. Kemp (2014). "X-linked adrenoleukodystrophy in women: a cross-sectional cohort study." Brain **137**(Pt 3): 693-706.

Engelen, M., S. Kemp, M. de Visser, B. M. van Geel, R. J. Wanders, P. Aubourg and B. T. Poll-The (2012). "X-linked adrenoleukodystrophy (X-ALD): clinical presentation and guidelines for diagnosis, follow-up and management." Orphanet J Rare Dis **7**(1): 51.

Engelen, M., R. Ofman, M. G. Dijkgraaf, M. Hijzen, L. A. van der Wardt, B. M. van Geel, M. de Visser, R. J. Wanders, B. T. Poll-The and S. Kemp (2010). "Lovastatin in X-linked adrenoleukodystrophy." N Engl J Med **362**(3): 276-277.

Engelen, M., R. Ofman, P. A. Mooijer, B. T. Poll-The, R. J. Wanders and S. Kemp (2008). "Cholesterol-deprivation increases mono-unsaturated very long-chain fatty acids in skin fibroblasts from patients with X-linked adrenoleukodystrophy." Biochim Biophys Acta **1781**(3): 105-111.

Engelen, M., M. J. Schackmann, R. Ofman, R. J. Sanders, I. M. Dijkstra, S. M. Houten, S. Fourcade, A. Pujol, B. T. Poll-The, R. J. Wanders and S. Kemp (2012). "Bezafibrate lowers very long-chain fatty acids in X-linked adrenoleukodystrophy fibroblasts by inhibiting fatty acid elongation." J Inherit Metab Dis **35**(6): 1137-1145.

Engelen, M., L. Tran, R. Ofman, J. Brennecke, A. B. Moser, I. M. Dijkstra, R. J. Wanders, B. T. Poll-The and S. Kemp (2012). "Bezafibrate for X-linked adrenoleukodystrophy." PLoS One **7**(7): e41013.

Fagarasanu, A., M. Fagarasanu, G. A. Eitzen, J. D. Aitchison and R. A. Rachubinski (2006). "The Peroxisomal Membrane Protein Inp2p Is the Peroxisome-Specific Receptor for the Myosin V Motor Myo2p of Saccharomyces cerevisiae." Developmental Cell **10**(5): 587-600.

Fan, C. Y., J. Pan, R. Chu, D. Lee, K. D. Kluckman, N. Usuda, I. Singh, A. V. Yeldandi, M. S. Rao, N. Maeda and J. K. Reddy (1996). "Hepatocellular and hepatic peroxisomal alterations in mice with a disrupted peroxisomal fatty acyl-coenzyme A oxidase gene." J Biol Chem **271**(40): 24698-24710.

Feigenbaum, V., A. Gelot, P. Casanova, C. Daumas-Duport, P. Aubourg and M. Dubois-Dalcq (2000). "Apoptosis in the central nervous system of cerebral adrenoleukodystrophy patients." Neurobiol Dis **7**(6 Pt B): 600-612.

Fellner, A., F. Benninger and R. Djaldetti (2016). "Synthetic cannabinoids revealing adrenoleukodystrophy." J Clin Neurosci **24**: 155-156.

Ferdinandusse, S., S. Denis, E. M. Hogenhout, J. Koster, C. W. van Roermund, I. J. L, A. B. Moser, R. J. Wanders and H. R. Waterham (2007). "Clinical, biochemical, and mutational spectrum of peroxisomal acyl-coenzyme A oxidase deficiency." Hum Mutat **28**(9): 904-912.

Ferdinandusse, S., S. Denis, C. W. T. van Roermund, M. A. Preece, J. Koster, M. S. Ebberink, H. R. Waterham and R. J. A. Wanders (2018). "A novel case of ACOX2 deficiency leads to recognition of a third human peroxisomal acyl-CoA oxidase." Biochim Biophys Acta **1864**(3): 952-958.

Ferdinandusse, S., G. Jimenez-Sanchez, J. Koster, S. Denis, C. W. Van Roermund, I. Silva-Zolezzi, A. B. Moser, W. F. Visser, M. Gulluoglu, O. Durmaz, M. Demirkol, H. R. Waterham, G. Gokcay, R. J. Wanders and D. Valle (2015). "A novel bile acid biosynthesis defect due to a deficiency of peroxisomal ABCD3." Hum Mol Genet **24**(2): 361-370.

Forss-Petter, S., H. Werner, J. Berger, H. Lassmann, B. Molzer, M. H. Schwab, H. Bernheimer, F. Zimmermann and K. A. Nave (1997). "Targeted inactivation of the X-linked adrenoleukodystrophy gene in mice." J Neurosci Res **50**(5): 829-843.

Fourcade, S., I. Ferrer and A. Pujol (2015). "Oxidative stress, mitochondrial and proteostasis malfunction in adrenoleukodystrophy: A paradigm for axonal degeneration." Free Radic Biol Med **88**(Pt A): 18-29.

Fourcade, S., J. Lopez-Erauskin, J. Galino, C. Duval, A. Naudi, M. Jove, S. Kemp, F. Villarroya, I. Ferrer, R. Pamplona, M. Portero-Otin and A. Pujol (2008). "Early oxidative damage underlying neurodegeneration in X-adrenoleukodystrophy." Hum Mol Genet **17**(12): 1762-1773.

Fourcade, S., J. Lopez-Erauskin, M. Ruiz, I. Ferrer and A. Pujol (2014). "Mitochondrial dysfunction and oxidative damage cooperatively fuel axonal degeneration in X-linked adrenoleukodystrophy." Biochimie **98**: 143-149.

Fourcade, S., M. Ruiz, C. Guilera, E. Hahnen, L. Brichta, A. Naudi, M. Portero-Otin, G. Dacremont, N. Cartier, R. Wanders, S. Kemp, J. L. Mandel, B. Wirth, R. Pamplona, P. Aubourg and A. Pujol (2010). "Valproic acid induces antioxidant effects in X-linked adrenoleukodystrophy." Hum Mol Genet **19**(10): 2005-2014.

Fourcade, S., S. Savary, S. Albet, D. Gauthe, C. Gondcaille, T. Pineau, J. Bellenger, M. Bentejac, A. Holzinger, J. Berger and M. Bugaut (2001). "Fibrate induction of the adrenoleukodystrophy-related gene (ABCD2) - Promoter analysis and role of the peroxisome proliferator-activated receptor PPAR alpha." European Journal of Biochemistry **268**(12): 3490-3500.

Fourcade, S., S. Savary, C. Gondcaille, J. Berger, A. Netik, F. Cadepond, M. El Etr, B. Molzer and M. Bugaut (2003). "Thyroid hormone induction of the adrenoleukodystrophy-related gene (ABCD2)." Molecular Pharmacology **63**(6): 1296-1303.

Fransen, M., M. Nordgren, B. Wang and O. Apanasets (2012). "Role of peroxisomes in ROS/RNS-metabolism: implications for human disease." Biochim Biophys Acta **1822**(9): 1363-1373.

Fu, X., J. G. Menke, Y. Chen, G. Zhou, K. L. MacNaul, S. D. Wright, C. P. Sparrow and E. G. Lund (2001). "27-hydroxycholesterol is an endogenous ligand for liver X receptor in cholesterol-loaded cells." J Biol Chem **276**(42): 38378-38387.

Fujiki, Y., Y. Matsuzono, T. Matsuzaki and M. Fransen (2006). "Import of peroxisomal membrane proteins: the interplay of Pex3p- and Pex19p-mediated interactions." Biochim Biophys Acta **1763**(12): 1639-1646.

Gartner, J., H. Moser and D. Valle (1992). "Mutations in the 70K peroxisomal membrane protein gene in Zellweger syndrome." Nat Genet **1**(1): 16-23.

Gautron, A. S., B. Giquel, L. Beaudoin, E. Autrusseau, A. Speak, F. Platt, S. Kemp, A. Pujol, P. Aubourg and A. Lehuen (2010). "Invariant NKT cells in adrenoleukodystrophy patients and mice." J Neuroimmunol **229**(1-2): 204-211.

Geillon, F., C. Gondcaille, Q. Raas, A. M. M. Dias, D. Pecqueur, C. Truntzer, G. Lucchi, P. Ducoroy, P. Falson, S. Savary and D. Trompier (2017). "Peroxisomal ATP-binding cassette transporters form mainly tetramers." J Biol Chem **292**(17): 6965-6977.

Geillon, F., D. Trompier, C. Gondcaille, G. Lizard and S. Savary (2012). "[Peroxisomal ABC transporters and X-linked adrenoleukodystrophy]." Med Sci (Paris) **28**(12): 1087-1094.

Genin, E., 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)." Journal of Biological Chemistry **286**(10): 8075-8084.

Genin, E., C. Gondcaille, D. Trompier and S. Savary (2009). "Induction of the adrenoleukodystrophy-related gene (ABCD2) by thyromimetics." Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology **116**(1-2): 37-43.

Ginhoux, F., M. Greter, M. Leboeuf, S. Nandi, P. See, S. Gokhan, M. F. Mehler, S. J. Conway, L. G. Ng, E. R. Stanley, I. M. Samokhvalov and M. Merad (2010). "Fate mapping analysis reveals that adult microglia derive from primitive macrophages." Science **330**(6005): 841-845.

Ginhoux, F., S. Lim, G. Hoeffel, D. Low and T. Huber (2013). "Origin and differentiation of microglia." Front Cell Neurosci **7**: 45.

Goldfischer, S., C. L. Moore, A. B. Johnson, A. J. Spiro, M. P. Valsamis, H. K. Wisniewski, R. H. Ritch, W. T. Norton, I. Rapin and L. M. Gartner (1973). "Peroxisomal and mitochondrial defects in the cerebro-hepato-renal syndrome." Science **182**(4107): 62-64.

Goldmann, T., P. Wieghofer, M. J. Jordao, F. Prutek, N. Hagemeyer, K. Frenzel, L. Amann, O. Staszewski, K. Kierdorf, M. Krueger, G. Locatelli, H. Hochgerner, R. Zeiser, S. Epelman, F.

Geissmann, J. Priller, F. M. Rossi, I. Bechmann, M. Kerschensteiner, S. Linnarsson, S. Jung and M. Prinz (2016). "Origin, fate and dynamics of macrophages at central nervous system interfaces." Nat Immunol **17**(7): 797-805.

Gondcaille, C., M. Depreter, S. Fourcade, M. Lecca, S. Leclercq, P. Martin, T. Pineau, F. Cadepond, M. ElEtr, N. Bertrand, A. Beley, S. Duclos, D. De Craemer, F. Roels, S. Savary and M. Bugaut (2005). "Phenylbutyrate up-regulates the adrenoleukodystrophy-related gene as a nonclassical peroxisome proliferator." Journal of Cell Biology **169**(1): 93-104.

Gondcaille, C., E. C. Genin, T. E. Lopez, A. M. Dias, F. Geillon, P. Andreoletti, M. Cherkaoui-Malki, T. Nury, G. Lizard, I. Weinhofer, J. Berger, E. T. Kase, D. Trompier and S. Savary (2014). "LXR antagonists induce ABCD2 expression." Biochim Biophys Acta **1841**(2): 259-266.

Gong, Y., N. Sasidharan, F. Laheji, M. Frosch, P. Musolino, R. Tanzi, D. Y. Kim, A. Biffi, J. El Khoury and F. Eichler (2017). "Microglial dysfunction as a key pathological change in adrenomyeloneuropathy." Ann Neurol **82**(5): 813-827.

Gordon, H. B., L. Valdez and A. Letsou (2018). "Etiology and treatment of adrenoleukodystrophy: new insights from Drosophila." Dis Model Mech **11**(6).

Gueugnon, F., C. Gondcaille, S. Leclercq, J. Bellenger, S. Bellenger, M. Narce, T. Pineau, F. Bonnetain and S. Savary (2007). "Dehydroepiandrosterone up-regulates the Adrenoleukodystrophy-related gene (ABCD2) independently of PPARalpha in rodents." Biochimie **89**(11): 1312-1321.

Gueugnon, F., F. Lambert, C. Gondcaille, S. Fourcade, J. Bellenger, F. Cadepond, M. El Etr, S. Savary and M. Bugaut (2003). "Dehydroepiandrosterone induction of the Abcd2 and Abcd3 genes encoding peroxisomal ABC transporters: implications for X-linked adrenoleukodystrophy." Adv Exp Med Biol **544**: 245.

Guimaraes, C. P., P. Domingues, P. Aubourg, F. Fouquet, A. Pujol, G. Jimenez-Sanchez, C. Sa-Miranda and J. E. Azevedo (2004). "Mouse liver PMP70 and ALDP: homomeric interactions prevail in vivo." Biochim Biophys Acta **1689**(3): 235-243.

Guimaraes, C. P., C. Sa-Miranda and J. E. Azevedo (2005). "Probing substrate-induced conformational alterations in adrenoleukodystrophy protein by proteolysis." J Hum Genet **50**(2): 99-105.

Hama, K., Y. Fujiwara, M. Morita, F. Yamazaki, Y. Nakashima, S. Takei, S. Takashima, M. Setou, N. Shimozawa, T. Imanaka and K. Yokoyama (2018). "Profiling and Imaging of Phospholipids in Brains of Abcd1-Deficient Mice." Lipids **53**(1): 85-102.

Hartley, M. D., L. L. Kirkemo, T. Banerji and T. S. Scanlan (2017). "A Thyroid Hormone-Based Strategy for Correcting the Biochemical Abnormality in X-Linked Adrenoleukodystrophy." Endocrinology **158**(5): 1328-1338.

Hein, S., P. Schonfeld, S. Kahlert and G. Reiser (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.

Henn, A., S. Lund, M. Hedtjarn, A. Schrattenholz, P. Porzgen and M. Leist (2009). "The suitability of BV2 cells as alternative model system for primary microglia cultures or for animal experiments examining brain inflammation." ALTEX **26**(2): 83-94.

Hillebrand, M., S. W. Gersting, A. S. Lotz-Havla, A. Schafer, H. Rosewich, O. Valerius, A. C. Muntau and J. Gartner (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, A. Ohlenbusch, A. Schafer, H. D. Soling, F. S. Wouters and J. Gartner (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.

Hinojosa, A. E., B. Garcia-Bueno, J. C. Leza and J. L. Madrigal (2011). "CCL2/MCP-1 modulation of microglial activation and proliferation." J Neuroinflammation **8**: 77.

Ho, J. K., H. Moser, Y. Kishimoto and J. A. Hamilton (1995). "Interactions of a Very Long-Chain Fatty-Acid with Model Membranes and Serum-Albumin - Implications for the Pathogenesis of Adrenoleukodystrophy." Journal of Clinical Investigation **96**(3): 1455-1463.

Horn, M. A., L. Retterstol, M. Abdelnoor, O. H. Skjeldal and C. M. Tallaksen (2015). "Age-dependent penetrance among females with X-linked adrenoleukodystrophy." Brain **138**(Pt 2): e325.

Hulshagen, L., O. Krysko, A. Bottelbergs, S. Huyghe, R. Klein, P. P. Van Veldhoven, P. P. De Deyn, R. D'Hooge, D. Hartmann and M. Baes (2008). "Absence of functional peroxisomes from mouse CNS causes dysmyelination and axon degeneration." J Neurosci **28**(15): 4015-4027.

Hunt, M. C., V. Tillander and S. E. Alexson (2014). "Regulation of peroxisomal lipid metabolism: the role of acyl-CoA and coenzyme A metabolizing enzymes." Biochimie **98**: 45-55.

Igarashi, M., H. H. Schaumburg, J. Powers, Y. Kishmoto, E. Kolodny and K. Suzuki (1976). "Fatty acid abnormality in adrenoleukodystrophy." J Neurochem **26**(4): 851-860.

Infante, J. P., C. L. Tschanz, N. Shaw, A. L. Michaud, P. Lawrence and J. T. Brenna (2002). "Straight-chain acyl-CoA oxidase knockout mouse accumulates extremely long chain fatty acids from alpha-linolenic acid: evidence for runaway carousel-type enzyme kinetics in peroxisomal beta-oxidation diseases." Mol Genet Metab **75**(2): 108-119.

Islinger, M., A. Voelkl, H. D. Fahimi and M. Schrader (2018). "The peroxisome: an update on mysteries 2.0." Histochemistry and cell biology **150**(5): 443-471.

Ito, M., B. M. Blumberg, D. J. Mock, A. D. Goodman, A. B. Moser, H. W. Moser, K. D. Smith and J. M. Powers (2001). "Potential environmental and host participants in the early white matter lesion of adreno-leukodystrophy: morphologic evidence for CD8 cytotoxic T cells, cytolysis of oligodendrocytes, and CD1-mediated lipid antigen presentation." J Neuropathol Exp Neurol **60**(10): 1004-1019.

Jang, J., H. C. Kang, H. S. Kim, J. Y. Kim, Y. J. Huh, D. S. Kim, J. E. Yoo, J. A. Lee, B. Lim, J. Lee, T. M. Yoon, I. H. Park, D. Y. Hwang, G. Q. Daley and D. W. Kim (2011). "Induced pluripotent stem cell models from X-linked adrenoleukodystrophy patients." Ann Neurol **70**(3): 402-409.

Jang, J., S. Park, H. Jin Hur, H. J. Cho, I. Hwang, Y. Pyo Kang, I. Im, H. Lee, E. Lee, W. Yang, H. C. Kang, S. Won Kwon, J. W. Yu and D. W. Kim (2016). "25-hydroxycholesterol contributes to cerebral inflammation of X-linked adrenoleukodystrophy through activation of the NLRP3 inflammasome." Nat Commun **7**: 13129.

Jun, B., P. K. Mukherjee, A. Asatryan, M. A. Kautzmann, J. Heap, W. C. Gordon, S. Bhattacharjee, R. Yang and N. A. Petasis (2017). "Elovanoids are novel cell-specific lipid mediators necessary for neuroprotective signaling for photoreceptor cell integrity." **7**(1): 5279.

Kamijo, K., S. Taketani, S. Yokota, T. Osumi and T. Hashimoto (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., M. Seki, A. Yasui, Y. Murasaki, M. Morita, Y. Yamashita, M. Sakaguchi, Y. Tanaka and T. Imanaka (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, M. Baes, B. Brugger, A. Mildner, H. B. Werner, O. Natt, T. Michaelis, M. Prinz, J. Frahm and K. A. Nave (2007). "Axonal loss and neuroinflammation caused by peroxisome-deficient oligodendrocytes." Nat Genet **39**(8): 969-976.

Katoh, M., B. Wu, H. B. Nguyen, T. Q. Thai, R. Yamasaki, H. Lu, A. M. Rietsch, M. M. Zorlu, Y. Shinozaki, Y. Saitoh, S. Saitoh, T. Sakoh, K. Ikenaka, S. Koizumi, R. M. Ransohoff and N. Ohno (2017). "Polymorphic regulation of mitochondrial fission and fusion modifies phenotypes of microglia in neuroinflammation." Sci Rep **7**(1): 4942.

Kelly, B. and L. A. J. O'Neill (2015). "Metabolic reprogramming in macrophages and dendritic cells in innate immunity." Cell Research **25**: 771.

Kemp, S., I. C. Huffnagel, G. E. Linthorst, R. J. Wanders and M. Engelen (2016). "Adrenoleukodystrophy - neuroendocrine pathogenesis and redefinition of natural history." Nat Rev Endocrinol **12**(10): 606-615.

Kemp, S., A. Pujol, H. R. Waterham, B. M. van Geel, C. D. Boehm, G. V. Raymond, G. R. Cutting, R. J. Wanders and H. W. Moser (2001). "ABCD1 mutations and the X-linked adrenoleukodystrophy mutation database: role in diagnosis and clinical correlations." Hum Mutat **18**(6): 499-515.

Kemp, S., F. Valianpour, S. Denis, R. Ofman, R. J. Sanders, P. Mooyer, P. G. Barth and R. J. Wanders (2005). "Elongation of very long-chain fatty acids is enhanced in X-linked adrenoleukodystrophy." Mol Genet Metab **84**(2): 144-151.

Kemp, S. and R. Wanders (2010). "Biochemical aspects of X-linked adrenoleukodystrophy." Brain Pathol. **20**(4): 831-837.

Kemp, S., H. M. Wei, J. F. Lu, L. T. Braiterman, M. C. McGuinness, A. B. Moser, P. A. Watkins and K. D. Smith (1998). "Gene redundancy and pharmacological gene therapy: implications for X-linked adrenoleukodystrophy." Nature Medicine **4**(11): 1261-1268.

Kemper, A. R., J. Brosco, A. M. Comeau, N. S. Green, S. D. Grosse, E. Jones, J. M. Kwon, W. K. Lam, J. Ojodu, L. A. Prosser and S. Tanksley (2017). "Newborn screening for X-linked adrenoleukodystrophy: evidence summary and advisory committee recommendation." Genet Med. **19**(1): 121-126.

Kettenmann, H., U.-K. Hanisch, M. Noda and A. Verkhratsky (2011). "Physiology of Microglia." Physiological Reviews **91**(2): 461-553.

Khan, M., J. Singh and I. Singh (2008). "Plasmalogen deficiency in cerebral adrenoleukodystrophy and its modulation by lovastatin." J Neurochem **106**(4): 1766-1779.

Klunemann, H. H., B. H. Ridha, L. Magy, J. R. Wherrett, D. M. Hemelsoet, R. W. Keen, J. L. De Bleecker, M. N. Rossor, J. Marienhagen, H. E. Klein, L. Peltonen and J. Paloneva (2005). "The genetic causes of basal ganglia calcification, dementia, and bone cysts: DAP12 and TREM2." Neurology **64**(9): 1502-1507.

Kobayashi, T., N. Shinnoh, A. Kondo and T. Yamada (1997). "Adrenoleukodystrophy protein-deficient mice represent abnormality of very long chain fatty acid metabolism." biochemical and biophysical research communications **232**(3): 631-636.

Korenke, G. C., H. J. Christen, B. Kruse, D. H. Hunneman and F. Hanefeld (1997). "Progression of X-linked adrenoleukodystrophy under interferon-beta therapy." J Inherit Metab Dis **20**(1): 59-66.

Korenke, G. C., S. Fuchs, E. Krasemann, H. G. Doerr, E. Wilichowski, D. H. Hunneman and F. Hanefeld (1996). "Cerebral adrenoleukodystrophy (ALD) in only one of monozygotic twins with an identical ALD genotype." annals of neurology **40**(2): 254-257.

Krasemann, S., C. Madore, R. Cialic, C. Baufeld, N. Calcagno, R. El Fatimy, L. Beckers, E. O'Loughlin, Y. Xu, Z. Fanek, D. J. Greco, S. T. Smith, G. Tweet, Z. Humulock, T. Zrzavy, P. Conde-Sanroman, M. Gacias, Z. Weng, H. Chen, E. Tjon, F. Mazaheri, K. Hartmann, A. Madi, J. D. Ulrich, M. Glatzel, A. Worthmann, J. Heeren, B. Budnik, C. Lemere, T. Ikezu, F. L. Heppner, V. Litvak, D. M. Holtzman, H. Lassmann, H. L. Weiner, J. Ochando, C. Haass and O. Butovsky (2017). "The TREM2-APOE Pathway Drives the Transcriptional Phenotype of Dysfunctional Microglia in Neurodegenerative Diseases." Immunity **47**(3): 566-581.e569.

Kurochkin, I. V., Y. Mizuno, A. Konagaya, Y. Sakaki, C. Schonbach and Y. Okazaki (2007). "Novel peroxisomal protease Tysnd1 processes PTS1- and PTS2-containing enzymes involved in beta-oxidation of fatty acids." Embo j **26**(3): 835-845.

Lagace, T. A. (2015). "Phosphatidylcholine: Greasing the Cholesterol Transport Machinery." Lipid insights **8**(Suppl 1): 65-73.

Lampron, A., A. Larochelle, N. Laflamme, P. Prefontaine, M. M. Plante, M. G. Sanchez, V. W. Yong, P. K. Stys, M. E. Tremblay and S. Rivest (2015). "Inefficient clearance of myelin debris by microglia impairs remyelinating processes." J Exp Med **212**(4): 481-495.

Langmann, T., R. Mauerer, A. Zahn, C. Moehle, M. Probst, W. Stremmel and G. Schmitz (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.

Lasserre, R., X. J. Guo, F. Conchonaud, Y. Hamon, O. Hawchar, A. M. Bernard, S. M. Soudja, P. F. Lenne, H. Rigneault, D. Olive, G. Bismuth, J. A. Nunes, B. Payrastre, D. Marguet and H. T. He (2008). "Raft nanodomains contribute to Akt/PKB plasma membrane recruitment and activation." Nat Chem Biol **4**(9): 538-547.

Lauer, A., X. Da, M. B. Hansen, G. Boulouis, Y. Ou, X. Cai, A. Liberato Celso Pedrotti, J. Kalpathy-Cramer, P. Caruso, D. L. Hayden, N. Rost, K. Mouridsen, F. S. Eichler, B. Rosen and P. L. Musolino

(2017). "ABCD1 dysfunction alters white matter microvascular perfusion." Brain **140**(12): 3139-3152.

Launay, N., C. Aguado, S. Fourcade, M. Ruiz, L. Grau, J. Riera, C. Guilera, M. Giros, I. Ferrer, E. Knecht and A. Pujol (2015). "Autophagy induction halts axonal degeneration in a mouse model of X-adrenoleukodystrophy." Acta Neuropathol **129**(3): 399-415.

Launay, N., M. Ruiz, S. Fourcade, A. Schluter, C. Guilera, I. Ferrer, E. Knecht and A. Pujol (2013). "Oxidative stress regulates the ubiquitin-proteasome system and immunoproteasome functioning in a mouse model of X-adrenoleukodystrophy." Brain **136**(Pt 3): 891-904.

Lee, P., J. Lee, S. Kim, M. S. Lee, H. Yagita, S. Y. Kim, H. Kim and K. Suk (2001). "NO as an autocrine mediator in the apoptosis of activated microglial cells: correlation between activation and apoptosis of microglial cells." Brain Res **892**(2): 380-385.

Legakis, J. E. and S. R. Terlecky (2001). "PTS2 protein import into mammalian peroxisomes." Traffic **2**(4): 252-260.

Lin, C., M. Schuster, S. C. Guimaraes, P. Ashwin, M. Schrader, J. Metz, C. Hacker, S. J. Gurr and G. Steinberg (2016). "Active diffusion and microtubule-based transport oppose myosin forces to position organelles in cells." Nat Commun **7**: 11814.

Lismont, C., M. Nordgren, P. P. Van Veldhoven and M. Fransen (2015). "Redox interplay between mitochondria and peroxisomes." Front Cell Dev Biol **3**: 35.

Liu, Y., W. Hao, M. Letiembre, S. Walter, M. Kulanga, H. Neumann and K. Fassbender (2006). "Suppression of microglial inflammatory activity by myelin phagocytosis: role of p47-PHOX-mediated generation of reactive oxygen species." J Neurosci **26**(50): 12904-12913.

Lombard-Platet, G., S. Savary, C. O. Sarde, J. L. Mandel and G. Chimini (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.

Lopez-Erauskin, J., S. Fourcade, J. Galino, M. Ruiz, A. Schluter, A. Naudi, M. Jove, M. Portero-Otin, R. Pamplona, I. Ferrer and A. Pujol (2011). "Antioxidants halt axonal degeneration in a mouse model of X-adrenoleukodystrophy." Ann Neurol **70**(1): 84-92.

Loughran, P. A., D. B. Stolz, S. R. Barrick, D. S. Wheeler, P. A. Friedman, R. A. Rachubinski, S. C. Watkins and T. R. Billiar (2013). "PEX7 and EBP50 target iNOS to the peroxisome in hepatocytes." Nitric Oxide **31**: 9-19.

Louveau, A., T. H. Harris and J. Kipnis (2015). "Revisiting the Mechanisms of CNS Immune Privilege." Trends Immunol **36**(10): 569-577.

Lu, J. F., A. M. Lawler, P. A. Watkins, J. M. Powers, A. B. Moser, H. W. Moser and K. D. Smith (1997). "A mouse model for X-linked adrenoleukodystrophy." Proc Natl Acad Sci U S A **94**(17): 9366-9371.

Luquet, S., C. Gaudel, D. Holst, J. Lopez-Soriano, C. Jehl-Pietri, A. Fredenrich and P. A. Grimaldi (2005). "Roles of PPAR delta in lipid absorption and metabolism: a new target for the treatment of type 2 diabetes." Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease **1740**(2): 313-317.

Maier, E. M., P. U. Mayerhofer, M. Asheuer, W. Kohler, M. Rothe, A. C. Muntau, A. A. Roscher, A. Holzinger, P. Aubourg and J. Berger (2008). "X-linked adrenoleukodystrophy phenotype is independent of ABCD2 genotype." Biochem Biophys Res Commun **377**(1): 176-180.

Mailfert, S., Y. Hamon, N. Bertaux, H. T. He and D. Marguet (2017). "A user's guide for characterizing plasma membrane subdomains in living cells by spot variation fluorescence correlation spectroscopy." Methods Cell Biol **139**: 1-22.

Marchetti, D. P., B. Donida, C. E. Jacques, M. Deon, T. C. Hauschild, P. Koehler-Santos, D. de Moura Coelho, A. S. Coitinho, L. B. Jardim and C. R. Vargas (2018). "Inflammatory profile in X-linked adrenoleukodystrophy patients: Understanding disease progression." J Cell Biochem **119**(1): 1223-1233.

Maruyama, T., S. K. Dougan, M. C. Truttmann, A. M. Bilate, J. R. Ingram and H. L. Ploegh (2015). "Increasing the efficiency of precise genome editing with CRISPR-Cas9 by inhibition of nonhomologous end joining." Nat Biotechnol **33**(5): 538-542.

Matsukawa, T., M. Asheuer, Y. Takahashi, J. Goto, Y. Suzuki, N. Shimozawa, H. Takano, O. Onodera, M. Nishizawa, P. Aubourg and S. Tsuji (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.

Mayatepek, E., S. Ferdinandusse, T. Meissner and R. J. Wanders (2004). "Analysis of cysteinyl leukotrienes and their metabolites in bile of patients with peroxisomal or mitochondrial beta-oxidation defects." Clin Chim Acta **345**(1-2): 89-92.

Mayerhofer, P. U. (2016). "Targeting and insertion of peroxisomal membrane proteins: ER trafficking versus direct delivery to peroxisomes." Biochim Biophys Acta **1863**(5): 870-880.

McGuinness, M. C., D. E. Griffin, G. V. Raymond, C. A. Washington, H. W. Moser and K. D. Smith (1995). "Tumor necrosis factor-alpha and X-linked adrenoleukodystrophy." J. Neuroimmunol. **61**(2): 161-169.

Monier, A., P. Evrard, P. Gressens and C. Verney (2006). "Distribution and differentiation of microglia in the human encephalon during the first two trimesters of gestation." J Comp Neurol **499**(4): 565-582.

Morato, L., J. Galino, M. Ruiz, N. Y. Calingasan, A. A. Starkov, M. Dumont, A. Naudi, J. J. Martinez, P. Aubourg, M. Portero-Otin, R. Pamplona, E. Galea, M. F. Beal, I. Ferrer, S. Fourcade and A. Pujol (2013). "Pioglitazone halts axonal degeneration in a mouse model of X-linked adrenoleukodystrophy." Brain **136**(Pt 8): 2432-2443.

Morita, M., M. Kawamichi, Y. Shimura, K. Kawaguchi, S. Watanabe and T. Imanaka (2015). "Brain microsomal fatty acid elongation is increased in abcd1-deficient mouse during active myelination phase." Metabolic Brain Disease **30**(6): 1359-1367.

Moser, A. B., J. Borel, A. Odone, S. Naidu, D. Cornblath, D. B. Sanders and H. W. Moser (1987). "A new dietary therapy for adrenoleukodystrophy: biochemical and preliminary clinical results in 36 patients." annals of neurology **21**(3): 240-249.

Moser, A. B., N. Kreiter, L. Bezman, S. Lu, G. V. Raymond, S. Naidu and H. W. Moser (1999). "Plasma very long chain fatty acids in 3,000 peroxisome disease patients and 29,000 controls." annals of neurology **45**(1): 100-110.

Moser, H. W., G. V. Raymond, S. E. Lu, L. R. Muenz, A. B. Moser, J. Xu, R. O. Jones, D. J. Loes, E. R. Melhem, P. Dubey, L. Bezman, N. H. Brereton and A. Odone (2005). "Follow-up of 89 asymptomatic patients with adrenoleukodystrophy treated with Lorenzo's oil." Arch Neurol **62**(7): 1073-1080.

Moser, H. W., P. J. Tutschka, F. R. Brown, 3rd, A. E. Moser, A. M. Yeager, I. Singh, S. A. Mark, A. A. Kumar, J. M. McDonnell, C. L. White, 3rd and et al. (1984). "Bone marrow transplant in adrenoleukodystrophy." Neurology **34**(11): 1410-1417.

Mosser, J., A. M. Douar, C. O. Sarde, P. Kioschis, R. Feil, H. Moser, A. M. Poustka, J. L. Mandel and P. Aubourg (1993). "Putative X-linked adrenoleukodystrophy gene shares unexpected homology with ABC transporters." Nature **361**(6414): 726-730.

Muffat, J., Y. Li, B. Yuan, M. Mitalipova, A. Omer, S. Corcoran, G. Bakiasi, L. H. Tsai, P. Aubourg, R. M. Ransohoff and R. Jaenisch (2016). "Efficient derivation of microglia-like cells from human pluripotent stem cells." Nat Med **22**(11): 1358-1367.

Muneer, Z., C. Wiesinger, T. Voigtlander, H. B. Werner, J. Berger and S. Forss-Petter (2014). "Abcd2 is a strong modifier of the metabolic impairments in peritoneal macrophages of abcd1-deficient mice." PLoS ONE **9**(9): e108655.

Musolino, P. L., Y. Gong, J. M. Snyder, S. Jimenez, J. Lok, E. H. Lo, A. B. Moser, E. F. Grabowski, M. P. Frosch and F. S. Eichler (2015). "Brain endothelial dysfunction in cerebral adrenoleukodystrophy." Brain **138**(Pt 11): 3206-3220.

Naganuma, T., Y. Sato, T. Sassa, Y. Ohno and A. Kihara (2011). "Biochemical characterization of the very long-chain fatty acid elongase ELOVL7." FEBS Lett **585**(20): 3337-3341.

Nazarko, T. Y. (2017). "Pexophagy is responsible for 65% of cases of peroxisome biogenesis disorders." Autophagy **13**(5): 991-994.

Nelson, J. W., W. Zhang, N. J. Alkayed and I. P. Koerner (2015). "Peroxisomal translocation of soluble epoxide hydrolase protects against ischemic stroke injury." J Cereb Blood Flow Metab **35**(9): 1416-1420.

Neuhaus, A., C. Eggeling, R. Erdmann and W. Schliebs (2016). "Why do peroxisomes associate with the cytoskeleton?" Biochim Biophys Acta **1863**(5): 1019-1026.

Neumann, H., M. R. Kotter and R. J. Franklin (2009). "Debris clearance by microglia: an essential link between degeneration and regeneration." Brain **132**(Pt 2): 288-295.

Nicaise, A. M., E. R. Bongarzone and S. J. Crocker (2016). "A microglial hypothesis of globoid cell leukodystrophy pathology." J Neurosci Res **94**(11): 1049-1061.

Nimmerjahn, A., F. Kirchhoff and F. Helmchen (2005). "Resting microglial cells are highly dynamic surveillants of brain parenchyma in vivo." Science **308**(5726): 1314-1318.

Oaxaca-Castillo, D., P. Andreoletti, A. Vluggens, S. Yu, P. P. van Veldhoven, J. K. Reddy and M. Cherkaoui-Malki (2007). "Biochemical characterization of two functional human liver acyl-CoA oxidase isoforms 1a and 1b encoded by a single gene." Biochem Biophys Res Commun **360**(2): 314-319.

Oezen, I., W. Rossmanith, S. Forss-Petter, S. Kemp, T. Voigtlander, K. Moser-Thier, R. J. Wanders, R. E. Bittner and J. Berger (2005). "Accumulation of very long-chain fatty acids does not affect mitochondrial function in adrenoleukodystrophy protein deficiency." Hum Mol Genet **14**(9): 1127-1137.

Ofman, R., I. M. Dijkstra, C. W. van Roermund, N. Burger, M. Turkenburg, A. van Cruchten, C. E. van Engen, R. J. Wanders and S. Kemp (2010). "The role of ELOVL1 in very long-chain fatty acid homeostasis and X-linked adrenoleukodystrophy." EMBO Mol Med **2**(3): 90-97.

Okamoto, T., K. Kawaguchi, S. Watanabe, R. Agustina, T. Ikejima, K. Ikeda, M. Nakano, M. Morita and T. Imanaka (2018). "Characterization of human ATP-binding cassette protein subfamily D reconstituted into proteoliposomes." Biochem Biophys Res Commun **496**(4): 1122-1127.

Oosterhof, N., L. E. Kuil, H. C. van der Linde, S. M. Burm, W. Berdowski, W. F. J. van Ijcken, J. C. van Swieten, E. M. Hol, M. H. G. Verheijen and T. J. van Ham (2018). "Colony-Stimulating Factor 1 Receptor (CSF1R) Regulates Microglia Density and Distribution, but Not Microglia Differentiation In Vivo." Cell Rep **24**(5): 1203-1217 e1206.

Orihuela, R., C. A. McPherson and G. J. Harry (2016). "Microglial M1/M2 polarization and metabolic states." Br J Pharmacol **173**(4): 649-665.

Otera, H., K. Okumoto, K. Tateishi, Y. Ikoma, E. Matsuda, M. Nishimura, T. Tsukamoto, T. Osumi, K. Ohashi, O. Higuchi and Y. Fujiki (1998). "Peroxisome targeting signal type 1 (PTS1) receptor is involved in import of both PTS1 and PTS2: studies with PEX5-defective CHO cell mutants." molecular and cellular biology **18**(1): 388-399.

Paintlia, A. S., A. G. Gilg, M. Khan, A. K. Singh, E. Barbosa and I. Singh (2003). "Correlation of very long chain fatty acid accumulation and inflammatory disease progression in childhood X-ALD: implications for potential therapies." Neurobiology of Disease **14**(3): 425-439.

Paolicelli, R. C., G. Bolasco, F. Pagani, L. Maggi, M. Scianni, P. Panzanelli, M. Giustetto, T. A. Ferreira, E. Guiducci, L. Dumas, D. Ragozzino and C. T. Gross (2011). "Synaptic Pruning by Microglia Is Necessary for Normal Brain Development." Science **333**(6048): 1456-1458.

Perry, V. H., D. A. Hume and S. Gordon (1985). "Immunohistochemical localization of macrophages and microglia in the adult and developing mouse brain." Neuroscience **15**(2): 313-326.

Petrillo, S., F. Piemonte, A. Pastore, G. Tozzi, C. Aiello, A. Pujol, M. Cappa and E. Bertini (2013). "Glutathione imbalance in patients with X-linked adrenoleukodystrophy." Mol Genet Metab **109**(4): 366-370.

Poll-The, B. T., F. Roels, H. Ogier, J. Scotto, J. Vamecq, R. B. Schutgens, R. J. Wanders, C. W. van Roermund, M. J. van Wijland, A. W. Schram and e. al (1988). "A new peroxisomal disorder with enlarged peroxisomes and a specific deficiency of acyl-CoA oxidase (pseudo-neonatal adrenoleukodystrophy)." american journal of human genetics **42**(3): 422-434.

Powers, J. M., D. P. DeCiero, M. Ito, A. B. Moser and H. W. Moser (2000). "Adrenomyeloneuropathy: a neuropathologic review featuring its noninflammatory myelopathy." j neuropathol exp neurol **59**(2): 89-102.

Powers, J. M., Y. Liu, A. B. Moser and H. W. Moser (1992). "The inflammatory myelinopathy of adreno-leukodystrophy: cells, effector molecules, and pathogenetic implications." J Neuropathol Exp Neurol **51**(6): 630-643.

Powers, J. M., Z. Pei, A. K. Heinzer, R. Deering, A. B. Moser, H. W. Moser, P. A. Watkins and K. D. Smith (2005). "Adreno-leukodystrophy: oxidative stress of mice and men." Journal of Neuropathology and Experimental Neurology **64**(12): 1067-1079.

Powers, J. M. and H. H. Schaumburg (1974). "Adreno-leukodystrophy (sex-linked Schilder's disease). A pathogenetic hypothesis based on ultrastructural lesions in adrenal cortex, peripheral nerve and testis." American journal of pathology **76**(3): 481-491.

Priller, J., A. Flügel, T. Wehner, M. Boentert, C. A. Haas, M. Prinz, F. Fernández-Klett, K. Prass, I. Bechmann, B. A. de Boer, M. Frotscher, G. W. Kreutzberg, D. A. Persons and U. Dirnagl (2001). "Targeting gene-modified hematopoietic cells to the central nervous system: Use of green fluorescent protein uncovers microglial engraftment." Nature Medicine **7**: 1356.

Prinz, M. and J. Priller (2014). "Microglia and brain macrophages in the molecular age: from origin to neuropsychiatric disease." Nat Rev Neurosci **15**(5): 300-312.

Pujol, A. (2016). "Novel Therapeutic Targets and Drug Candidates for Modifying Disease Progression in Adrenoleukodystrophy." Endocrine development **30**: 147-160.

Pujol, A., I. Ferrer, C. Camps, E. Metzger, C. Hindelang, N. Callizot, M. Ruiz, T. Pampols, M. Giros and J. L. Mandel (2004). "Functional overlap between ABCD1 (ALD) and ABCD2 (ALDR) transporters: a therapeutic target for X-adrenoleukodystrophy." Human Molecular Genetics **13**(23): 2997-3006.

Pujol, A., C. Hindelang, N. Callizot, U. Bartsch, M. Schachner and J. L. Mandel (2002). "Late onset neurological phenotype of the X-ALD gene inactivation in mice: a mouse model for adrenomyeloneuropathy." Human Molecular Genetics **11**(5): 499-505.

Raas, Q., F. E. Saih, C. Gondcaille, D. Trompier, Y. Hamon, V. Leoni, C. Caccia, B. Nasser, M. Jadot, F. Menetrier, G. Lizard, M. Cherkaoui-Malki, P. Andreoletti and S. Savary (2018). "A microglial cell model for acyl-CoA oxidase 1 deficiency." Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids.

Rampler, H., I. Weinhofer, A. Netik, S. Forss-Petter, P. J. Brown, J. A. Oplinger, M. Bugaut and J. Berger (2003). "Evaluation of the therapeutic potential of PPARalpha agonists for X-linked adrenoleukodystrophy." Mol Genet Metab **80**(4): 398-407.

Ranea-Robles, P., N. Launay, M. Ruiz, N. Y. Calingasan, M. Dumont, A. Naudi, M. Portero-Otin, R. Pamplona, I. Ferrer, M. F. Beal, S. Fourcade and A. Pujol (2018). "Aberrant regulation of the GSK-3beta/NRF2 axis unveils a novel therapy for adrenoleukodystrophy." EMBO Mol Med.

Ransohoff, R. M. (2016). "A polarizing question: do M1 and M2 microglia exist?" Nat Neurosci **19**(8): 987-991.

Ransohoff, R. M. and B. Engelhardt (2012). "The anatomical and cellular basis of immune surveillance in the central nervous system." Nat Rev Immunol **12**(9): 623-635.

Ransohoff, R. M. and V. H. Perry (2009). "Microglial physiology: unique stimuli, specialized responses." Annu Rev Immunol **27**: 119-145.

Raymond, G. V., R. Seidman, T. S. Monteith, E. Kolodny, S. Sathe, A. Mahmood and J. M. Powers (2010). "Head trauma can initiate the onset of adreno-leukodystrophy." J. Neurol. Sci. **290**(1-2): 70-74.

Réu, P., A. Khosravi, S. Bernard, J. E. Mold, M. Salehpour, K. Alkass, S. Perl, J. Tisdale, G. Possnert, H. Druid and J. Frisén (2017). "The Lifespan and Turnover of Microglia in the Human Brain." Cell Reports **20**(4): 779-784.

Rock, K. L. and L. Shen (2005). "Cross-presentation: underlying mechanisms and role in immune surveillance." Immunol Rev **207**: 166-183.

Ruiz, M., M. Jove, A. Schluter, C. Casasnovas, F. Villarroya, C. Guilera, F. J. Ortega, A. Naudi, R. Pamplona, R. Gimeno, S. Fourcade, M. Portero-Otin and A. Pujol (2015). "Altered glycolipid and

glycerophospholipid signaling drive inflammatory cascades in adrenomyeloneuropathy." hum mol genet **24**(24): 6861-6876.

Saih, F. E., P. Andreoletti, S. Mandard, N. Latruffe, M. S. El Kebbaj, G. Lizard, B. Nasser and M. Cherkaoui-Malki (2017). "Protective Effect of Cactus Cladode Extracts on Peroxisomal Functions in Microglial BV-2 Cells Activated by Different Lipopolysaccharides." Molecules **22**(1).

Salles, A., C. Billaudeau, A. Serge, A. M. Bernard, M. C. Phelipot, N. Bertaux, M. Fallet, P. Grenot, D. Marguet, H. T. He and Y. Hamon (2013). "Barcoding T cell calcium response diversity with methods for automated and accurate analysis of cell signals (MAAACS)." PLoS Comput Biol **9**(9): e1003245.

Salsano, E., S. Tabano, S. M. Sirchia, P. Colapietro, B. Castellotti, C. Gellera, M. Rimoldi, V. Pensato, C. Mariotti, D. Pareyson, M. Miozzo and G. Uziel (2012). "Preferential expression of mutant ABCD1 allele is common in adrenoleukodystrophy female carriers but unrelated to clinical symptoms." Orphanet J Rare Dis **7**: 10.

Sargent, G., T. van Zutphen, T. Shatseva, L. Zhang, V. Di Giovanni, R. Bandsma and P. K. Kim (2016). "PEX2 is the E3 ubiquitin ligase required for pexophagy during starvation." The Journal of Cell Biology **214**(6): 677-690.

Sassa, T., T. Wakashima, Y. Ohno and A. Kihara (2014). "Lorenzo's oil inhibits ELOVL1 and lowers the level of sphingomyelin with a saturated very long-chain fatty acid." J Lipid Res.

Savary, S., D. Trompier, P. Andreoletti, F. Le Borgne, J. Demarquoy and G. Lizard (2012). "Fatty acids - induced lipotoxicity and inflammation." Curr Drug Metab **13**(10): 1358-1370.

Schaumburg, H. H., J. M. Powers, K. Suzuki and C. S. Raine (1974). "Adreno-leukodystrophy (sex-linked Schilder disease). Ultrastructural demonstration of specific cytoplasmic inclusions in the central nervous system." Arch Neurol **31**(3): 210-213.

Schluter, A., L. Espinosa, S. Fourcade, J. Galino, E. Lopez, E. Ilieva, L. Morato, M. Asheuer, T. Cook, A. McLaren, J. Reid, F. Kelly, S. Bates, P. Aubourg, E. Galea and A. Pujol (2012). "Functional genomic analysis unravels a metabolic-inflammatory interplay in adrenoleukodystrophy." Hum Mol Genet **21**(5): 1062-1077.

Schrader, M., J. L. Costello, L. F. Godinho, A. S. Azadi and M. Islinger (2016). "Proliferation and fission of peroxisomes - An update." Biochim Biophys Acta **1863**(5): 971-983.

Schrader, M. and H. D. Fahimi (2006). "Peroxisomes and oxidative stress." Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research **1763**(12): 1755-1766.

Schroeder, F. and A. B. Kier (1983). "Lipid composition alters phagocytosis of fluorescent latex beads." J Immunol Methods **57**(1-3): 363-371.

Sellin, J., C. Wingen, D. Gosejacob, D. Senyilmaz, L. Hänschke, S. Büttner, K. Meyer, D. Bano, P. Nicotera, A. A. Teleman and M. H. Bülow (2018). "Dietary rescue of lipotoxicity-induced mitochondrial damage in Peroxin19 mutants." PLOS Biology **16**(6): e2004893.

Shai, N., E. Yifrach, C. W. T. van Roermund and N. Cohen (2018). "Systematic mapping of contact sites reveals tethers and a function for the peroxisome-mitochondria contact." **9**(1): 1761.

Singh, I., M. Khan, L. Key and S. Pai (1998). "Lovastatin for X-linked adrenoleukodystrophy." new england journal of medicine **339**(10): 702-703.

Singh, I., A. E. Moser, S. Goldfischer and H. W. Moser (1984). "Lignoceric acid is oxidized in the peroxisome: implications for the Zellweger cerebro-hepato-renal syndrome and adrenoleukodystrophy." Proc Natl Acad Sci U S A **81**(13): 4203-4207.

Singh, I., A. E. Moser, H. W. Moser and Y. Kishimoto (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, J. and S. Giri (2014). "Loss of AMP-activated protein kinase in X-linked adrenoleukodystrophy patient-derived fibroblasts and lymphocytes." Biochem Biophys Res Commun **445**(1): 126-131.

Singh, J., M. Khan and I. Singh (2009). "Silencing of Abcd1 and Abcd2 genes sensitizes astrocytes for inflammation: implication for X-adrenoleukodystrophy." J. Lipid Res. **50**(1): 135-147.

Singh, J., B. Olle, H. Suhail, M. M. Felicella and S. Giri (2016). "Metformin-induced mitochondrial function and ABCD2 up-regulation in X-linked adrenoleukodystrophy involves AMP-activated protein kinase." J Neurochem **138**(1): 86-100.

Singh, J., H. Suhail and S. Giri (2015). "Loss of AMP-activated protein kinase induces mitochondrial dysfunction and proinflammatory response in unstimulated Abcd1-knockout mice mixed glial cells." Mediators Inflamm **2015**: 176983.

Smith, J. J. and J. D. Aitchison (2013). "Peroxisomes take shape." Nat Rev Mol Cell Biol **14**(12): 803-817.

Smith, P. C., N. Karpowich, L. Millen, J. E. Moody, J. Rosen, P. J. Thomas and J. F. Hunt (2002). "ATP binding to the motor domain from an ABC transporter drives formation of a nucleotide sandwich dimer." Mol Cell **10**(1): 139-149.

Sobue, G., I. Ueno-Natsukari, H. Okamoto, T. A. Connell, I. Aizawa, K. Mizoguchi, M. Honma, G. Ishikawa, T. Mitsuma and N. Natsukari (1994). "Phenotypic heterogeneity of an adult form of adrenoleukodystrophy in monozygotic twins." Ann Neurol **36**(6): 912-915.

Squarzoni, P., G. Oller, G. Hoeffel, L. Pont-Lezica, P. Rostaing, D. Low, A. Bessis, F. Ginhoux and S. Garel (2014). "Microglia modulate wiring of the embryonic forebrain." Cell Rep **8**(5): 1271-1279.

Stenberg, P. E., T. I. Pestina, R. J. Barrie and C. W. Jackson (1997). "The Src Family Kinases, Fgr, Fyn, Lck, and Lyn, Colocalize With Coated Membranes in Platelets." Blood **89**(7): 2384-2393.

Stevens, B., N. J. Allen, L. E. Vazquez, G. R. Howell, K. S. Christopherson, N. Nouri, K. D. Micheva, A. K. Mehalow, A. D. Huberman, B. Stafford, A. Sher, A. M. Litke, J. D. Lambris, S. J. Smith, S. W. John and B. A. Barres (2007). "The classical complement cascade mediates CNS synapse elimination." Cell **131**(6): 1164-1178.

Strachan, L. R., T. J. Stevenson, B. Freshner, M. D. Keefe, D. Miranda Bowles and J. L. Bonkowsky (2017). "A zebrafish model of X-linked adrenoleukodystrophy recapitulates key disease features and demonstrates a developmental requirement for abcd1 in oligodendrocyte patterning and myelination." Hum Mol Genet **26**(18): 3600-3614.

Sugiura, A., S. Mattie, J. Prudent and H. M. McBride (2017). "Newly born peroxisomes are a hybrid of mitochondrial and ER-derived pre-peroxisomes." Nature **542**: 251.

Takahashi, K., M. Prinz, M. Stagi, O. Chechneva and H. Neumann (2007). "TREM2-Transduced Myeloid Precursors Mediate Nervous Tissue Debris Clearance and Facilitate Recovery in an Animal Model of Multiple Sclerosis." PLOS Medicine **4**(4): e124.

Tangirala, R. K., W. G. Jerome, N. L. Jones, D. M. Small, W. J. Johnson, J. M. Glick, F. H. Mahlberg and G. H. Rothblat (1994). "Formation of cholesterol monohydrate crystals in macrophage-derived foam cells." J Lipid Res **35**(1): 93-104.

Theda, C., A. B. Moser, J. M. Powers and H. W. Moser (1992). "Phospholipids in X-linked adrenoleukodystrophy white matter: fatty acid abnormalities before the onset of demyelination." J Neurol Sci **110**(1-2): 195-204.

Tremblay, M.-È., R. L. Lowery and A. K. Majewska (2010). "Microglial Interactions with Synapses Are Modulated by Visual Experience." PLOS Biology **8**(11): e1000527.

Tremblay, M. E., C. Lecours, L. Samson, V. Sanchez-Zafra and A. Sierra (2015). "From the Cajal alumni Achucarro and Rio-Hortega to the rediscovery of never-resting microglia." Front Neuroanat **9**: 45.

Troffer-Charlier, N., N. Doerflinger, E. Metzger, F. Fouquet, J.-L. Mandel and P. Aubourg (1998). "Mirror expression of adrenoleukodystrophy and adrenoleukodystrophy related genes in mouse tissues and human cell lines." European Journal of Cell Biology **75**(3): 254-264.

Troffer-Charlier, N., N. Doerflinger, E. Metzger, F. Fouquet, J. L. Mandel and P. Aubourg (1998). "Mirror expression of adrenoleukodystrophy and adrenoleukodystrophy related genes in mouse tissues and human cell lines." Eur. J. Cell. Biol. **75**(3): 254-264.

Turk, B. R., B. E. Theisen, C. L. Nemeth, J. S. Marx, X. Shi, M. Rosen, R. O. Jones, A. B. Moser, P. A. Watkins, G. V. Raymond, C. Tiffany and A. Fatemi (2017). "Antioxidant Capacity and Superoxide Dismutase Activity in Adrenoleukodystrophy." JAMA Neurol **74**(5): 519-524.

Ulland, T. K., W. M. Song, S. C. Huang, J. D. Ulrich, A. Sergushichev, W. L. Beatty, A. A. Loboda, Y. Zhou, N. J. Cairns, A. Kambal, E. Loginicheva, S. Gilfillan, M. Cella, H. W. Virgin, E. R. Unanue, Y.

Wang, M. N. Artyomov, D. M. Holtzman and M. Colonna (2017). "TREM2 Maintains Microglial Metabolic Fitness in Alzheimer's Disease." Cell **170**(4): 649-663 e613.

van de Beek, M. C., I. M. Dijkstra, H. van Lenthe, R. Ofman, D. Goldhaber-Pasillas, N. Schauer, M. Schackmann, J. Y. Engelen-Lee, F. M. Vaz, W. Kulik, R. J. Wanders, M. Engelen and S. Kemp (2016). "C26:0-Carnitine Is a New Biomarker for X-Linked Adrenoleukodystrophy in Mice and Man." PLoS ONE **11**(4): e0154597.

van de Beek, M. C., R. Ofman, I. Dijkstra, F. Wijburg, M. Engelen, R. Wanders and S. Kemp (2017). "Lipid-induced endoplasmic reticulum stress in X-linked adrenoleukodystrophy." Biochim Biophys Acta **1863**(9): 2255-2265.

van Engen, C. E., R. Ofman, I. M. Dijkstra, T. J. van Goethem, E. Verheij, J. Varin, M. Vidaud, R. J. Wanders, P. Aubourg, S. Kemp and M. Barbier (2016). "CYP4F2 affects phenotypic outcome in adrenoleukodystrophy by modulating the clearance of very long-chain fatty acids." Biochimica et Biophysica Acta **1862**(10): 1861-1870.

van Geel, B. M., L. Bezman, D. J. Loes, H. W. Moser and G. V. Raymond (2001). "Evolution of phenotypes in adult male patients with X-linked adrenoleukodystrophy." Annals of Neurology **49**(2): 186-194.

van Geel, B. M., B. T. Poll-The, A. Verrips, J. J. Boelens, S. Kemp and M. Engelen (2015). "Hematopoietic cell transplantation does not prevent myelopathy in X-linked adrenoleukodystrophy: a retrospective study." J Inherit Metab Dis **38**(2): 359-361.

van Roermund, C. W., L. Ijlst, W. Majczak, H. R. Waterham, H. Folkerts, R. J. Wanders and K. J. Hellingwerf (2012). "Peroxisomal fatty acid uptake mechanism in Saccharomyces cerevisiae." The Journal of Biological Chemistry **287**(24): 20144-20153.

van Roermund, C. W., L. Ijlst, T. Wagemans, R. J. Wanders and H. R. Waterham (2013). "A role for the human peroxisomal half-transporter ABCD3 in the oxidation of dicarboxylic acids." Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids **1841**(4): 563-568.

van Roermund, C. W., W. F. Visser, L. Ijlst, A. van Cruchten, M. Boek, W. Kulik, H. R. Waterham and R. J. Wanders (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, L. Ijlst, H. R. Waterham and R. J. Wanders (2010). "Differential substrate specificities of human ABCD1 and ABCD2 in peroxisomal fatty acid beta-oxidation." Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids **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.

Vanderver, A., M. Prust, D. Tonduti, F. Mochel, H. M. Hussey, G. Helman, J. Garbern, F. Eichler, P. Labauge, P. Aubourg, D. Rodriguez, M. C. Patterson, J. L. Van Hove, J. Schmidt, N. I. Wolf, O. Boespflug-Tanguy, R. Schiffmann, M. S. van der Knaap and G. Consortium (2015). "Case definition and classification of leukodystrophies and leukoencephalopathies." Mol Genet Metab **114**(4): 494-500.

Vargas, C. R., M. Wajner, L. R. Sirtori, L. Goulart, M. Chiochetta, D. Coelho, A. Latini, S. Llesuy, A. Bello Klein, R. Giugliani, M. Deon and C. F. Mello (2004). "Evidence that oxidative stress is increased in patients with X-linked adrenoleukodystrophy." Biochimica Et Biophysica Acta **1688**(1): 26-32.

Vilalta, A. and G. C. Brown (2017). "Neurophagy, the phagocytosis of live neurons and synapses by glia, contributes to brain development and disease." FEBS J.

Walton, N. M., B. M. Sutter, E. D. Laywell, L. H. Levkoff, S. M. Kearns, G. P. Marshall, 2nd, B. Scheffler and D. A. Steindler (2006). "Microglia instruct subventricular zone neurogenesis." Glia **54**(8): 815-825.

Wanders, R. J. and B. T. Poll-The (2017). ""Role of peroxisomes in human lipid metabolism and its importance for neurological development"." Neurosci Lett **637**: 11-17.

Wanders, R. J. and H. R. Waterham (2006). "Biochemistry of mammalian peroxisomes revisited." Annu Rev Biochem **75**: 295-332.

Wanders, R. J., H. R. Waterham and S. Ferdinandusse (2015). "Metabolic Interplay between Peroxisomes and Other Subcellular Organelles Including Mitochondria and the Endoplasmic Reticulum." Front Cell Dev Biol **3**: 83.

Wang, X. M., W. Y. Yik, P. Zhang, W. Lu, P. K. Dranchak, D. Shibata, S. J. Steinberg and J. G. Hacia (2012). "The gene expression profiles of induced pluripotent stem cells from individuals with childhood cerebral adrenoleukodystrophy are consistent with proposed mechanisms of pathogenesis." Stem Cell Res Ther **3**(5): 39.

Wang, Y., R. Busin, C. Reeves, L. Bezman, G. Raymond, C. J. Toomer, P. A. Watkins, A. Snowden, A. Moser, S. Naidu, G. Bibat, S. Hewson, K. Tam, J. T. Clarke, L. Charnas, G. Stetten, B. Karczeski, G. Cutting and S. Steinberg (2011). "X-linked adrenoleukodystrophy: ABCD1 de novo mutations and mosaicism." Molecular Genetics and Metabolism **104**(1-2): 160-166.

Waterham, H. R. and M. S. Ebberink (2012). "Genetics and molecular basis of human peroxisome biogenesis disorders." Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease **1822**(9): 1430-1441.

Watkins, P. A. and J. M. Ellis (2012). "Peroxisomal acyl-CoA synthetases." Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease **1822**(9): 1411-1420.

Weber, F. D., C. Wiesinger, S. Forss-Petter, G. Regelsberger, A. Einwich, W. H. Weber, W. Kohler, H. Stockinger and J. Berger (2014). "X-linked adrenoleukodystrophy: very long-chain fatty acid metabolism is severely impaired in monocytes but not in lymphocytes." hum mol genet **23**(10): 2542-2550.

Weinhofer, I., S. Forss-Petter, M. Kunze, M. Zigman and J. Berger (2005). "X-linked adrenoleukodystrophy mice demonstrate abnormalities in cholesterol metabolism." FEBS Letters **579**(25): 5512-5516.

Weinhofer, I., S. Forss-Petter, M. Zigman and J. Berger (2002). "Cholesterol regulates ABCD2 expression: implications for the therapy of X-linked adrenoleukodystrophy." Human Molecular Genetics **11**(22): 2701-2708.

Weinhofer, I., M. Kunze, H. Rampler, A. L. Bookout, S. Forss-Petter and J. Berger (2005). "Liver X receptor alpha interferes with SREBP1c-mediated Abcd2 expression. Novel cross-talk in gene regulation." Journal of Biological Chemistry **280**(50): 41243-41251.

Weinhofer, I., B. Zierfuss, S. Hametner, M. Wagner, N. Popitsch, C. Machacek, B. Bartolini, G. Zlabinger, A. Ohradanova-Repic, H. Stockinger, W. Kohler, R. Hoftberger, G. Regelsberger, S. Forss-Petter, H. Lassmann and J. Berger (2018). "Impaired plasticity of macrophages in X-linked adrenoleukodystrophy." Brain.

Wendeln, A. C., K. Degenhardt, L. Kaurani, M. Gertig, T. Ulas, G. Jain, J. Wagner, L. M. Hasler, K. Wild, A. Skodras, T. Blank, O. Staszewski, M. Datta, T. P. Centeno, V. Capece, M. R. Islam, C. Kerimoglu, M. Staufenbiel, J. L. Schultze, M. Beyer, M. Prinz, M. Jucker, A. Fischer and J. J. Neher (2018). "Innate immune memory in the brain shapes neurological disease hallmarks." Nature **556**(7701): 332-338.

White, C. A., P. A. McCombe and M. P. Pender (1998). "Microglia are more susceptible than macrophages to apoptosis in the central nervous system in experimental autoimmune encephalomyelitis through a mechanism not involving Fas (CD95)." Int Immunol **10**(7): 935-941.

Wilichowski, E., A. Ohlenbusch, G. C. Korenke, D. H. Hunneman and F. Hanefeld (1998). "Identical mitochondrial DNA in monozygotic twins with discordant adrenoleukodystrophy phenotype." Annals of Neurology **43**(6): 835-836.

Williams, M. R., D. M. Cauvi, I. Rivera, D. Hawisher and A. De Maio (2016). "Changes in macrophage function modulated by the lipid environment." Innate Immun **22**(3): 141-151.

Yamada, T., N. Shinnoh, T. Taniwaki, Y. Ohyagi, H. Asahara, Horiuchi and J. Kira (2000). "Lovastatin does not correct the accumulation of very long-chain fatty acids in tissues of adrenoleukodystrophy protein-deficient mice." Journal of Inherited Metabolic Disease **23**(6): 607-614.

York, A. G., K. J. Williams, J. P. Argus, Q. D. Zhou, G. Brar, L. Vergnes, E. E. Gray, A. Zhen, N. C. Wu, D. H. Yamada, C. R. Cunningham, E. J. Tarling, M. Q. Wilks, D. Casero, D. H. Gray, A. K. Yu, E. S. Wang,

D. G. Brooks, R. Sun, S. G. Kitchen, T. T. Wu, K. Reue, D. B. Stetson and S. J. Bensinger (2015). "Limiting Cholesterol Biosynthetic Flux Spontaneously Engages Type I IFN Signaling." Cell **163**(7): 1716-1729.

Zarrouk, A., A. Vejux, T. Nury, H. I. El Hajj, M. Haddad, M. Cherkaoui-Malki, J. M. Riedinger, M. Hammami and G. Lizard (2012). "Induction of mitochondrial changes associated with oxidative stress on very long chain fatty acids (C22:0, C24:0, or C26:0)-treated human neuronal cells (SK-NB-E)." Oxid Med Cell Longev **2012**: 623257.

Zhang, J., J. Kim, A. Alexander, S. Cai, D. N. Tripathi, R. Dere, A. R. Tee, J. Tait-Mulder, A. Di Nardo, J. M. Han, E. Kwiatkowski, E. A. Dunlop, K. M. Dodd, R. D. Folkerth, P. L. Faust, M. B. Kastan, M. Sahin and C. L. Walker (2013). "A tuberous sclerosis complex signalling node at the peroxisome regulates mTORC1 and autophagy in response to ROS." Nat Cell Biol **15**(10): 1186-1196.

Zhang, J., D. N. Tripathi, J. Jing, A. Alexander, J. Kim, R. T. Powell, R. Dere, J. Tait-Mulder, J. H. Lee, T. T. Paull, R. K. Pandita, V. K. Charaka, T. K. Pandita, M. B. Kastan and C. L. Walker (2015). "ATM functions at the peroxisome to induce pexophagy in response to ROS." Nat Cell Biol **17**(10): 1259-1269.

Zhang, X., K. Li, R. A. Jones, S. D. Bruner and R. A. Butcher (2016). "Structural characterization of acyl-CoA oxidases reveals a direct link between pheromone biosynthesis and metabolic state in Caenorhabditis elegans." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **113**(36): 10055-10060.

Zheng, H., L. Jia, C. C. Liu, Z. Rong, L. Zhong, L. Yang, X. F. Chen, J. D. Fryer, X. Wang, Y. W. Zhang, H. Xu and G. Bu (2017). "TREM2 Promotes Microglial Survival by Activating Wnt/beta-Catenin Pathway." J Neurosci **37**(7): 1772-1784.

ANNEXES

Liste des publications

Raas Q., Gondcaille C., Hamon Y., Leoni V., Caccia C., Ménétrier F., Lizard G., Trompier D., Savary S. (2018) CRISPR/Cas9-mediated knockout of *Abcd1* and *Abcd2* genes in BV-2 cells: novel microglial models for X-linked Adrenoleukodystrophy. Submitted to BBA -Molecular and Cell Biology of Lipids (manuscript # BBALIP-18-280)

Raas Q., Saih F-E., Gondcaille C., Trompier D., Hamon Y., Leoni V., Caccia C., Nasser B., Jadot M., Ménétrier F., Lizard G., Cherkaoui-Malki M., Andreoletti P., Savary S. (2018) A microglial cell model for acyl-CoA oxidase 1 deficiency. (Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids. 1863 2018 Oct 10.

Andreoletti, P., **Raas, Q**., Gondcaille, C., Cherkaoui-Malki, M., Trompier, D., & Savary, S. (2017). Predictive Structure and Topology of Peroxisomal ATP-Binding Cassette (ABC) Transporters. International journal of molecular sciences, 18(7), 1593

Bezine, M., Debbabi, M., Nury, T., Ben-Khalifa, R., Samadi, M., Cherkaoui-Malki, M., Vejux, A., **Raas, Q**., de Sèze, J., Moreau, T., El-Ayeb, M., Lizard, G. (2017). Evidence of K+ homeostasis disruption in cellular dysfunction triggered by 7-ketocholesterol, 24S-hydroxycholesterol, and tetracosanoic acid (C24: 0) in 158N murine oligodendrocytes. Chemistry and physics of lipids, 207, 135-150.

Geillon, F., Gondcaille, C., **Raas, Q**., Dias, A.M.M., Pecqueur, D., Truntzer, C., Lucchi, G., Ducoroy, P., Falson, P., Savary, S., Trompier, D. (2017). Peroxisomal ATP-binding cassette transporters form mainly tetramers. Journal of Biological Chemistry, 292(17): 6965-6977.

Liste des communications académiques

Raas, Q., Gondcaille, C., Trompier, D., Hamon, Y., Saih, F., Leoni, V., Caccia, C., Nury, T., Vejux, A., Andreoletti, P., Nasser B., Lizard, G., Cherkaoui-Malki, M., Savary, S. ABCD1 and ABCD2 deficiency in microglia: Towards a better understanding of the physiopathogenesis of X-ALD. 7th FEBS Special Meeting on ABC Proteins: From Multidrug Resistance to Genetic Diseases, Innsbruck, Austria, March 6-12, 2018, Short talk, 6th Open European Peroxisome Meeting (OEPM) *Supported with a grant from the Doctoral school-ES-University of Burgundy*.

Raas, Q., Gondcaille, C., Trompier, D., Hamon, Y., Saih, F., Leoni, V., Caccia, C., Nury, T., Vejux, A., Andreoletti, P., Nasser B., Lizard, G., Cherkaoui-Malki, M., Savary, S. ABCD1 and ABCD2 deficiency in microglia: Towards a better understanding of the physiopathogenesis of X-ALD. 7th FEBS Special Meeting on ABC Proteins: From Multidrug Resistance to Genetic Diseases, Innsbruck, Austria, March 6-12, 2018, Poster. *Supported with a FEBS Youth Travel Fellowship grant*

Awarded communication: ABC2018 Young Investigator Award.

Raas, Q., Gondcaille, C., Trompier, D., Savary, S. Peroxisomal genes knockout in microglial cells; towards a better understanding of X-ALD physiopathogenesis. Young researchers' forum, 2017, Dijon, France, June 15-16, 2017, Short talk.

Raas, Q., Gondcaille, C., Trompier, D., Savary, S. CRISPR/Cas9 induced *Abcd1* and/or *Abcd2* gene knockout in microglial cells; towards a better understanding of X-ALD physiopathogenesis. Annual French-Belgian ABC Meeting, Paris, France, November 4, 2016, Short talk.

Raas, Q., Gondcaille, C., Saih, F.E., Trompier, D., Andreoletti, P., Vejux, A., Nury, T., Lizard, G., Cherkaoui Malki, M., Savary, S. Understanding the physiopathogenesis of peroxisomal leukodystrophies by generating novel microglial cell models with CRISPR/Cas9-mediated genome editing. 2nd International Conference « Peroxisome Formation, Function and Metabolism », EMBL Hamburg (DESY site), Germany, June 20-22, 2016, Poster. (presented by Cherkaoui Malki, M).

Raas, Q., Gondcaille, C., Saih, F.-E., Trompier, D., Andreoletti, P., Vejux, A., Nury, T., Lizard, G., Cherkaoui-Malki, M., Savary, S. Understanding the physiopathogenesis of peroxisomal leukodystrophies by generating novel microglial cell models with CRISPR/Cas9-mediated genome editing. 5th Open European Peroxisome Meeting (OEPM), Vienna, Austria, September 14-16, 2016, Poster. (presented by Cherkaoui Malki, M)

Peroxisomal ATP-binding cassette transporters form mainly tetramers

Flore Geillon, Catherine Gondcaille, Quentin Raas, Alexandre M. M. Dias, Delphine Pecqueur, Caroline Truntzer, Géraldine Lucchi, Patrick Ducoroy, Pierre Falson, Stéphane Savary and Doriane Trompier

J. Biol. Chem. 2017, 292:6965-6977.
doi: 10.1074/jbc.M116.772806 originally published online March 3, 2017

Access the most updated version of this article at doi: 10.1074/jbc.M116.772806

Alerts:
- When this article is cited
- When a correction for this article is posted

Click here to choose from all of JBC's e-mail alerts

This article cites 61 references, 24 of which can be accessed free at
http://www.jbc.org/content/292/17/6965.full.html#ref-list-1

Downloaded from http://www.jbc.org/ at INSERM on August 2, 2017

Peroxisomal ATP-binding cassette transporters form mainly tetramers

Received for publication, December 16, 2016, and in revised form, March 3, 2017 Published, Papers in Press, March 3, 2017, DOI 10.1074/jbc.M116.772806

Flore Geillon[‡], Catherine Gondcaille[‡], Quentin Raas[‡], Alexandre M. M. Dias[‡], Delphine Pecqueur[§], Caroline Truntzer[§], Géraldine Lucchi[§], Patrick Ducoroy[§], Pierre Falson[¶], Stéphane Savary[‡], and Doriane Trompier[‡1]

From the [‡]Laboratoire Bio-PeroxIL EA7270 and [§]CLIPP-ICMUB, Université Bourgogne-Franche-Comté, 6 Bd Gabriel, 21000 Dijon, France and the [¶]Drug Resistance and Membrane Proteins Team, Molecular Microbiology and Structural Biochemistry Laboratory, Institut de Biologie et Chimie des Protéines (IBCP), UMR5086 CNRS/Université Lyon 1, 7 Passage du Vercors, 69367 Lyon, France

Edited by George M. Carman

ABCD1 and its homolog ABCD2 are peroxisomal ATP-binding cassette (ABC) half-transporters of fatty acyl-CoAs with both distinct and overlapping substrate specificities. Although it is established that ABC half-transporters have at least to dimerize to generate a functional unit, functional equivalents of tetramers (*i.e.* dimers of full-length transporters) have also been reported. However, oligomerization of peroxisomal ABCD transporters is incompletely understood but is of potential significance because more complex oligomerization might lead to differences in substrate specificity. In this work, we have characterized the quaternary structure of the ABCD1 and ABCD2 proteins in the peroxisomal membrane. Using various biochemical approaches, we clearly demonstrate that both transporters exist as both homo- and heterotetramers, with a predominance of homotetramers. In addition to tetramers, some larger molecular ABCD assemblies were also found but represented only a minor fraction. By using quantitative co-immunoprecipitation assays coupled with tandem mass spectrometry, we identified potential binding partners of ABCD2 involved in polyunsaturated fatty-acid metabolism. Interestingly, we identified calcium ATPases as ABCD2-binding partners, suggesting a role of ABCD2 in calcium signaling. In conclusion, we have shown here that ABCD1 and its homolog ABCD2 exist mainly as homotetramers in the peroxisomal membrane.

The ABCD1 transporter belongs to the D subfamily of the ATP-binding cassette (ABC)[2] transporter family and is encoded by the *ABCD1* gene (1). A large number of mutations in *ABCD1* are responsible for the most common peroxisomal disorder, which is called X-linked adrenoleukodystrophy (X-ALD) (2). Expressed at the peroxisomal membrane, ABCD1 mediates the import of saturated and monounsaturated very long-chain fatty acids (VLCFA) as CoA esters into the peroxisome for their further degradation by β-oxidation (3–5). A defect in ABCD1 results in increased levels of VLCFA in tissues and plasma (4).

Two homologs of ABCD1 that belong to the same D subfamily are expressed in the peroxisome: ABCD2 (6) and ABCD3, also called PMP70 (7). ABCD2, the closest homolog, shares the same substrate preference with ABCD1 for saturated fatty acids (FA) and monounsaturated FA (MUFA) but has a distinct substrate preference for shorter VLCFA and polyunsaturated FA (PUFA) (5, 8, 9). ABCD3 has the broadest substrate specificity because it is involved in the transport of saturated FA, unsaturated FA, branched-chain FA, dicarboxylic FA, and C27 bile acid intermediates (10, 11).

The partial overlap in substrate specificity between ABCD1 and its homologs explains their ability, upon overexpression, to compensate for ABCD1 defect (12–14). However, the basal expression levels of ABCD2 and ABCD3 are not sufficient to allow the compensation mechanisms to be efficient enough in X-ALD patients. This may be explained by the fact that ABCD2 expression mirrors ABCD1 distribution in many cell types in different tissues (15) and by the fact that ABCD3, although ubiquitously expressed (16, 17), has mainly a distinct substrate specificity (10, 11) and mediates the transport of ABCD1 substrates with less efficiency (3).

Peroxisomal ABCD transporters are half-transporters containing one nucleotide-binding domain (NBD) and one transmembrane domain as opposed to ABC full-length transporters that contain two copies of each domain. It is therefore commonly accepted that half-transporters have to dimerize to generate a minimal functional unit. The expression pattern of peroxisomal ABC transporters allows, in principle, the formation of all combinations of heterodimers. Indeed, ABCD3 is ubiquitously expressed, and although ABCD2 expression mirrors ABCD1 distribution in many cell types in different tissues, ABCD2 expression is highly inducible (18). Thus, upon stimulation, both proteins can be expressed in the same cell. Actually, the presence of both peroxisomal ABCD heterodimers and homodimers has been evidenced mainly by FRET and co-immunoprecipitation (co-IP) assays (8, 19–23). In addition, because chimeric proteins mimicking homo- and heterodimers of ABCD1 and ABCD2 are functionally active (24), one can

This work was supported by grants from the regional council of Burgundy and from the University of Burgundy. The authors declare that they have no conflicts of interest with the contents of this article.

[1] To whom correspondence should be addressed. Tel.: 33-380396202; Fax: 33-380396250; E-mail: doriane.trompier@u-bourgogne.fr.

[2] The abbreviations used are: ABC, ATP-binding cassette; DHA, docosahexaenoic acid; EGFP, enhanced green fluorescent protein; IP, immunoprecipitation; MUFA, monounsaturated fatty acid(s); NBD, nucleotide-binding domain; PUFA, polyunsaturated fatty acids; VLCFA, very long-chain fatty acid(s); X-ALD, X-linked adrenoleukodystrophy; AMP-PNP, 5′-adenylyl-β,γ-imidodiphosphate; FA, fatty acid(s); DDM, dodecyl maltopyranoside; BisTris, 2-[bis(2-hydroxyethyl)amino]-2-(hydroxymethyl)propane-1,3-diol; HB, homogenization buffer; ACN, acetonitrile.

© 2017 by The American Society for Biochemistry and Molecular Biology, Inc. Published in the U.S.A.

Downloaded from http://www.jbc.org/ at INSERM on August 2, 2017

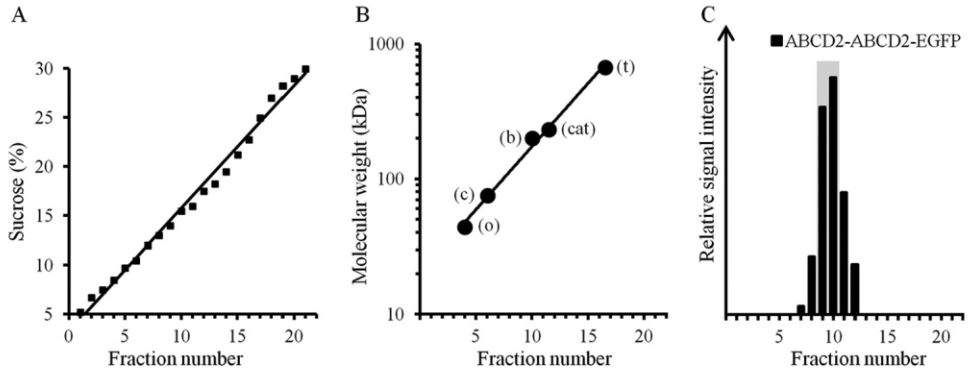


Figure 1. Calibration of velocity sucrose gradients with soluble and membrane protein markers. *A*, 5–30% (w/v) sucrose gradient linearity was checked by monitoring of sucrose concentration using a refractometer. Fractions 1–22 correspond to fractions from the top to the bottom of the gradient. *B*, calibration curve was drawn from the flotation of native soluble protein markers (*t*, thyroglobulin (669 kDa); *cat*, catalase (232 kDa); *b*, β-amylase (200 kDa); *c*, conalbumin (75 kDa); *o*, ovalbumin (44 kDa)) in parallel and equivalent sucrose gradients. *C*, ABCD2-ABCD2-EGFP (194 kDa) solubilized with 1% SDS, used as a membrane protein size marker, floated in fractions 9 and 10 (indicated by a *gray bar*) as monitored by densitometry analysis of immunoblotting performed with an anti-GFP antibody for all collected fractions.

speculate that alternative dimerization of peroxisomal ABCD transporters could lead to different substrate specificity.

It is noteworthy that the level of molecular complexity for peroxisomal ABCD half-transporters might be underestimated. Indeed, other ABC half-transporters, such as ABCG2, exhibit a tetrameric organization consisting in four core domains (25). Moreover, dimers of full-length transporters (also yielding a four-core domain organization) were observed for ABCA1 (26), ABCA3 (27), ABCC1 (28), and ABCC7 (29). Therefore, it is tempting to speculate that the interactions described within the peroxisomal ABCD subfamily occur within a higher oligomeric structure, such as a tetramer. If the substrate specificity is determined by the oligomeric status of ABCD1 and its homologs, it is essential to analyze their quaternary structure.

In this work, our objective was to study the quaternary structure of ABCD1 and ABCD2 proteins in the peroxisomal membrane by combining different biochemical approaches, including velocity sucrose gradient centrifugation, co-immunoprecipitation assays, and native PAGE. We evidenced the presence of tetrameric forms whose ABCD1/ABCD2 composition was explored and whose stability was evaluated during the catalytic cycle of the transporters. In addition, the composition of even higher molecular assemblies containing ABCD2 was deciphered by quantitative co-IP assays coupled to tandem mass spectrometry.

Results

High-molecular weight assembly of ABCD1 and ABCD2

We characterized the oligomeric state of ABCD1 and ABCD2 proteins by analyzing on a sucrose gradient the corresponding cell lysate fractions obtained by using either a denaturing detergent, such as SDS; mild detergents, such as Triton X-100, α-dodecyl maltopyranoside (α-DDM), or β-DDM; and a stabilizing detergent, C4C8 (30). Cell lysates were obtained from a specific H4IIEC3 hepatoma cell model that does not express ABCD2 at the basal level but expresses a functional ABCD2-EGFP fusion protein, depending on the dose of doxycycline added in the culture medium (clone 28.38) (8, 31). Compared with *ABCD3*, the *ABCD1* gene expression level is relatively low (31), but the ABCD1 protein expression level is sufficient to allow VLCFA β-oxidation measurements (8). At floating equilibrium, 22 fractions were collected from a 5–30% (w/v) sucrose gradient, checked for linearity (Fig. 1*A*), and calibrated with native soluble markers (Fig. 1*B*) and with a membrane protein marker (denatured ABCD2-ABCD2-EGFP; Fig. 1*C*) performed to ensure a more accurate interpretation of the results. Indeed, it should be noted that the sedimentation properties of membrane proteins depend on the amount of membrane lipids and detergent bound (size of the micelle). Thus, ABCD1- and ABCD2-particle floatation data were analyzed by considering the apparent size of the complexes based on the position of the chimeric ABCD2-ABCD2-EGFP protein marker and by considering the shift in peak positions obtained depending on the detergents.

The 22 collected sucrose fractions were analyzed by Western blotting for the presence of ABCD1 (82 kDa) and ABCD2-EGFP (111 kDa). The sedimentation of proteins solubilized with SDS was observed in fractions 6 and 7 for ABCD1 and fractions 7 and 8 for ABCD2-EGFP (Fig. 2). The molecular weights corresponding to these fractions are in agreement with a monomeric state for both ABCD1 and ABCD2-EGFP. This result was expected, considering the denaturing nature of the detergent used.

Upon solubilization with the mild detergent α-DDM, ABCD1 and ABCD2-EGFP floated as high-molecular mass complexes with a peak centered at fractions 11–14 of 215–415 kDa and at fractions 12–15 of 270–515 kDa, respectively (Fig. 2). These complexes could correspond to tetrameric associations, considering the monomeric molecular mass of ABCD1 (82 kDa) and ABCD2-EGFP (111 kDa) and the α-DDM micelle size (38.3 kDa) (32) and considering the important shift obtained from fractions 9 and 10 of the chimeric dimer ABCD2-ABCD2-EGFP (Fig. 1*C*) to the above denser fractions.

The use of detergents with intermediate strength, such as C4C8, Triton X-100, or β-DDM (Fig. 2), tended to destabilize the high-molecular weight complexes to likely dimeric forms. Indeed, upon fractionation in the presence of these detergents, ABCD1 and ABCD2-EGFP signals were found in fractions 9

Downloaded from http://www.jbc.org/ at INSERM on August 2, 2017

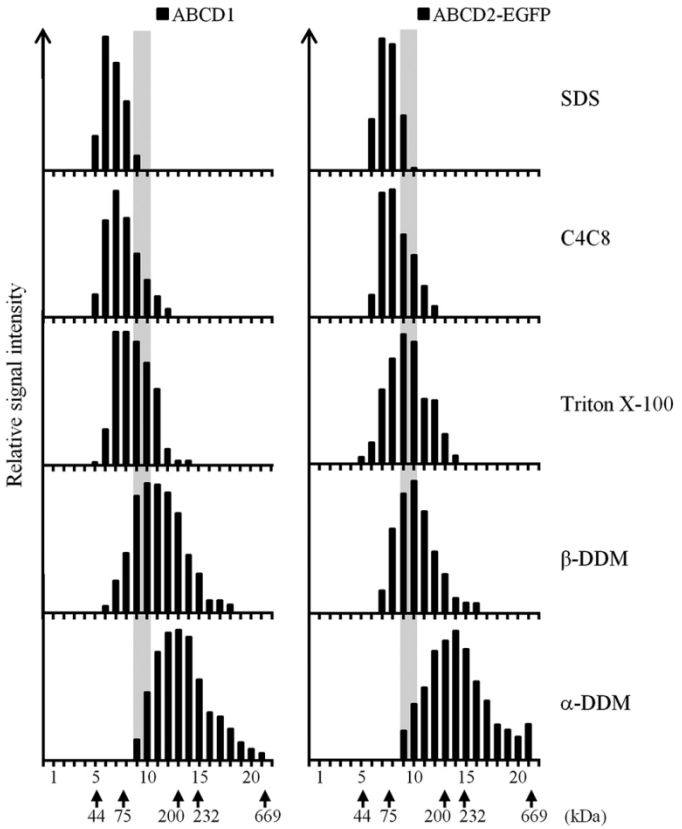


Figure 2. Velocity sedimentation of ABCD1 and ABCD2-EGFP-containing particles on sucrose gradients is dependent on the detergent used. Denatured monomeric ABCD1 and ABCD2-EGFP (from SDS lysis of induced clone 28.38) sedimented in fractions 6 and 7 and in fractions 7 and 8, respectively. In the presence of the mild detergent α-DDM, ABCD1 and ABCD2-EGFP floated as high-molecular weight complexes in fractions 11–14 of 215–415 kDa and in fractions 12–15 of 270–515 kDa, respectively. Detergents with intermediate strength (C4C8, Triton X-100, or β-DDM) destabilized these high-molecular weight complexes, considering the shift obtained to lighter fractions. The densitometric analysis of ABCD1 and ABCD2-EGFP signals detected in the gradient fractions by immunoblotting (anti-ABCD1 and anti-GFP antibodies) is given as relative signal intensity and is representative of at least two independent experiments. The positions of the soluble and membrane (position of 194-kDa ABCD2-ABCD2-EGFP indicated by a *gray bar*) protein markers are indicated.

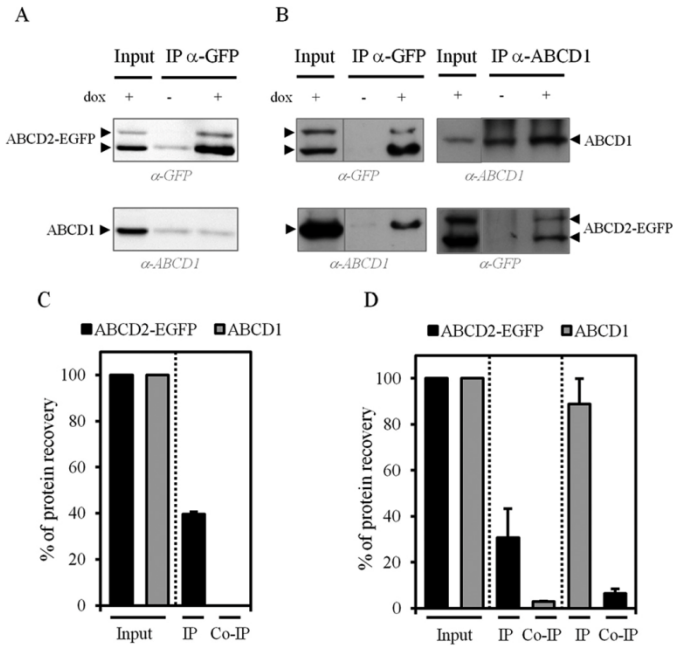


Figure 3. ABCD1/ABCD2 interaction by co-immunoprecipitation assays depends on the detergent used. Whole-cell lysates of clone 28.38 (−/+ *dox*) in the presence of 1% C4C8 (*A* and *C*) or 1% Triton X-100 (*B* and *D*) were used for anti-GFP and anti-ABCD1 IP assays. Input (one-eighth of the total amount was loaded) and eluted proteins, including immunoprecipitated and co-immunoprecipitated proteins, were analyzed by SDS-PAGE followed by immunoblotting with anti-ABCD1 and anti-GFP antibodies. *A* and *B*, immunoblots shown are representative of three independent experiments. *C* and *D*, percentage of immunoprecipitated and co-immunoprecipitated ABCD1 and ABCD2-EGFP proteins (of the input referred to as 100%). When ABCD1 and ABCD2-EGFP were solubilized in the presence of C4C8, no specific co-immunoprecipitation was detected, although a significant co-immunoprecipitation was obtained when solubilized by Triton X-100. Data are mean ± S.D. (*error bars*) ($n = 3$).

and 10, which corresponds to the position of the ABCD2 chimeric dimers (Fig. 1*C*).

Altogether, our fractionation experiments show that high-molecular weight assemblies of ABCD1 and ABCD2 are present, and their proportions were found to increase as the strength of the detergent used decreased. Upon solubilization with the milder detergent (α-DDM), the majority of high-molecular weight assemblies could correspond to tetrameric associations.

Interaction between ABCD1 and ABCD2 within supradimeric assemblies

We took advantage of the C4C8 detergent that solubilized ABCD1 and ABCD2-EGFP as a monomer/dimer mix to further characterize the dimer content. To determine whether or not heterodimers exist, we performed a cell lysis with C4C8 and immunoprecipitated ABCD2-EGFP with an anti-GFP antibody. PVDF membranes containing the immune complexes were probed with the anti-ABCD1 antibody. IP assays performed with non-induced ABCD2-EGFP lysate ("−dox" condition) were used as a control. The anti-GFP antibody immunoprecipitated ~40% of ABCD2-EGFP (Fig. 3, *A* and *C*), but no specific co-immunoprecipitation of ABCD1 was detected (when comparing *−dox* and *+dox lanes* in Fig. 3*A*), suggesting the presence of only ABCD2-EGFP within the dimer. The absence of interaction between ABCD1 and ABCD2-EGFP previously solubilized with C4C8 was further confirmed by the anti-ABCD1 IP, which failed to reveal ABCD2-EGFP in the co-IP fraction (data not shown).

However, ABCD1/ABCD2-EGFP interaction was evidenced when co-IP assays were performed on cell lysates obtained with Triton X-100, a milder detergent compared with C4C8 (Fig. 3*B*). Nevertheless, the percentage of co-immunoprecipitated ABCD2-EGFP with ABCD1 was relatively low; ABCD1 (88.8 ± 11.2% of the pool) co-immunoprecipitated only 6.4 ± 1.9% of the ABCD2-EGFP pool (Fig. 3*D*). Moreover, cross-co-IP experiments showed that a small fraction of ABCD1 was co-immunoprecipitated (2.9 ± 0.1%) with ABCD2-EGFP (30.7 ± 12.5% of the pool).

We performed quantitative cross co-IPs in BV-2 cells, a microglial cell line described to naturally express ABCD1 and ABCD2 (33). We found on one hand that the ABCD1 expression level is slightly lower in BV-2 cells than in hepatoma cells (induced clone 28.38) and, on the other hand, the expression level of the endogenous ABCD2 is comparable with the forced

Downloaded from http://www.jbc.org/ at INSERM on August 2, 2017

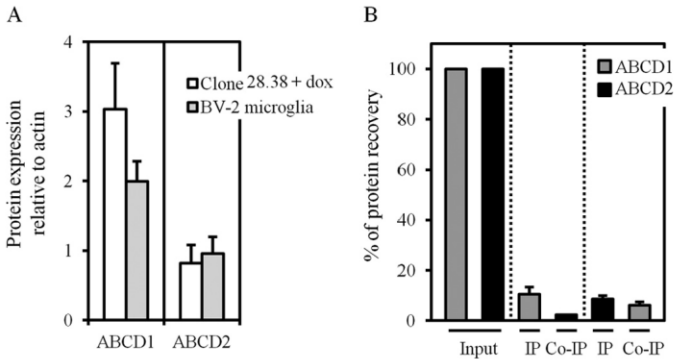


Figure 4. ABCD1 interacts with ABCD2 in the BV-2 microglial cell line. *A*, histograms showing the relative ABCD1 and ABCD2 protein expression levels as determined by densitometric analysis of immunoblots with anti-ABCD1 (*left*) and anti-ABCD2 (*right*) antibodies after normalization with actin, in mouse BV-2 cells and in rat hepatoma-induced clone 28.38. Whereas similar ABCD2 levels are found, a 1.5-fold increase in ABCD1 expression was found in BV-2 cells compared with the induced clone 28.38. Values are mean ± S.D. ($n = 3$). *B*, cross-co-IP experiments showed that ABCD1 interacts with ABCD2 in BV-2 cells. Whole-cell Triton X-100 lysates of BV-2 cells were used for anti-ABCD1 and anti-ABCD2 IP. Input and eluted proteins were analyzed by SDS-PAGE, followed by immunoblotting with anti-ABCD1 and anti-ABCD2 antibodies. Histograms show the mean percentage ± S.D. (*error bars*) of immunoprecipitated and co-immunoprecipitated proteins (out of the input referred as 100%) for three independent experiments.

expression of ABCD2-EGFP in the induced clone 28.38 (Fig. 4*A*). The analysis of repeated co-IP experiments should be approached with caution because a very low amount of immunoprecipitated ABCD1 (10.45 ± 2.8%) and ABCD2-EGFP (8.57 ± 1.5%) was obtained. Nevertheless, if we consider the above 8–10% of the immunoprecipitated proteins, ABCD1/ABCD2 interaction seems to be favored in microglial cells in comparison with hepatoma cells (induced clone 28.38). Indeed, the same overall percentage of co-IP proteins was obtained in hepatoma cells (2.9–6.4%; Fig. 3*D*) and in BV-2 cells (2.3–6.1%; Fig. 4*B*), although the percentage of immunoprecipitated proteins was much higher in hepatoma cells (30–88%; Fig. 3*D*) than in BV-2 cells (8–10%; Fig. 4*B*).

If the interaction between ABCD1 and ABCD2 or ABCD2-EGFP in ABCD2-naturally expressing cells (microglial BV-2 cells) or in ABCD2-EGFP-expressing hepatoma cells was clearly observed, it remained to evaluate whether the interaction occurs within a dimer or within higher molecular assemblies. The absence of ABCD1/ABCD2 interaction when solubilized with C4C8 and the presence of ABCD1/ABCD2 interaction when solubilized with the milder detergent Triton X-100 suggest that this interaction does not occur within a dimer but rather within supradimeric assemblies.

Homo- and heterotetrameric forms of ABCD1 and ABCD2

The fractionation experiments previously showed that ABCD1 and ABCD2-EGFP are present in high-molecular weight assemblies that could correspond to tetrameric associations.

Chimeric proteins containing two ABCD1 or ABCD2 moieties were previously reported to be functional (24). When co-expressing ABCD1 chimeric homodimers ABCD1-ABCD1 and ABCD1-ABCD1-EGFP in COS-7 cells, co-IP experiments showed that ABCD1-ABCD1 specifically interacts with ABCD1-ABCD1-EGFP, directly confirming the existence of ABCD1 homotetramers (Fig. 5*A*). The presence of ABCD2 homotetramers was confirmed as well by co-IP experiments in cells expressing ABCD2 chimeric homodimers (ABCD2-ABCD2 plus ABCD2-ABCD2-EGFP) (Fig. 5*B*). Heterotetramers as a result of an assembly of the two different homodimers ABCD1-ABCD1 and ABCD2-ABCD2-EGFP were detected similarly (Fig. 5*C*).

We further explored the ABCD1 and ABCD2 oligomeric status by native PAGE. To that end, we used a protocol for membrane proteins that we adapted by replacing glycine by histidine in the cathode buffer for sample focusing to take into account the basic character of ABCD1 and ABCD2 proteins (34). To improve the migration of membrane proteins, we used the Deriphat (disodium-*N*-lauryl-β-iminodipropionate; Anatrace)-PAGE system adapted from Peter and Thornber (35) successfully used for an ABC full-length transporter (36). The peroxisome-enriched fraction was prepared from the ABCD2-EGFP-expressing hepatoma cells (induced clone 28.38), and ABCD1 and ABCD2-EGFP were solubilized with the milder detergent α-DDM. Surprisingly, the extraction of ABCD1 and ABCD2 proteins from peroxisomal membranes by α-DDM micelles was drastically increased when peroxisomes were incubated with ATP before incubation with the detergent (Fig. 6*A*). ABCD1 and ABCD2-EGFP solubility increased from 13.7 ± 10.3 to 65 ± 9.6% and from 7.9 ± 11.4 to 43.6 ± 22.1%, respectively (Fig. 6*B*). Native electrophoresis of solubilized ABCD1 and ABCD2-EGFP proteins using the Deriphat-PAGE system resulted in a prominent band with an apparent molecular mass of ~350 kDa for ABCD1 (Fig. 6*C*) and ~480 kDa for ABCD2-EGFP (Fig. 6*D*), whereas single proteins have a molecular mass of 82 and 111 kDa, respectively. This suggests that both proteins may assemble as a tetramer. Of note, ABCD1, but not ABCD2-EGFP, was also systematically detected as a faint band at ~200 kDa consistent with dimeric assembly (Fig. 6*C*). Superimposition of the densitometric tracing of the native-PAGE electrophoretic patterns clearly showed that ABCD1 and ABCD2-EGFP were mainly present in distinct complexes, as evidenced by a weak overlapping of ABCD1 and ABCD2-EGFP bands (Fig. 6*E*).

Solubilized ABCD1 and ABCD2 from the peroxisome-enriched fraction of BV-2 cells preincubated or not with ATP (Fig. 7*A*) showed that both proteins are found in high-molecular weight complexes as well on native PAGE (Fig. 7*B*). However, both proteins were detected in broader bands with an estimated apparent molecular mass in the range of 350–700 kDa for ABCD1 (Fig. 7*B*, *left*) and in the range of 480–700 kDa for ABCD2 (Fig. 7*B*, *right*), consistent with the presence of at least tetrameric forms.

Altogether, ABCD1 and ABCD2 can form homotetramers and heterotetramers, as demonstrated by co-IP assays of chimeric dimers. Moreover, native-PAGE experiments showed that high-molecular weight assemblies for both transporters are present in BV-2 cells and in induced clone 28.38 and are likely to correspond to tetrameric associations, mainly homotetramers.

Downloaded from http://www.jbc.org/ at INSERM on August 2, 2017

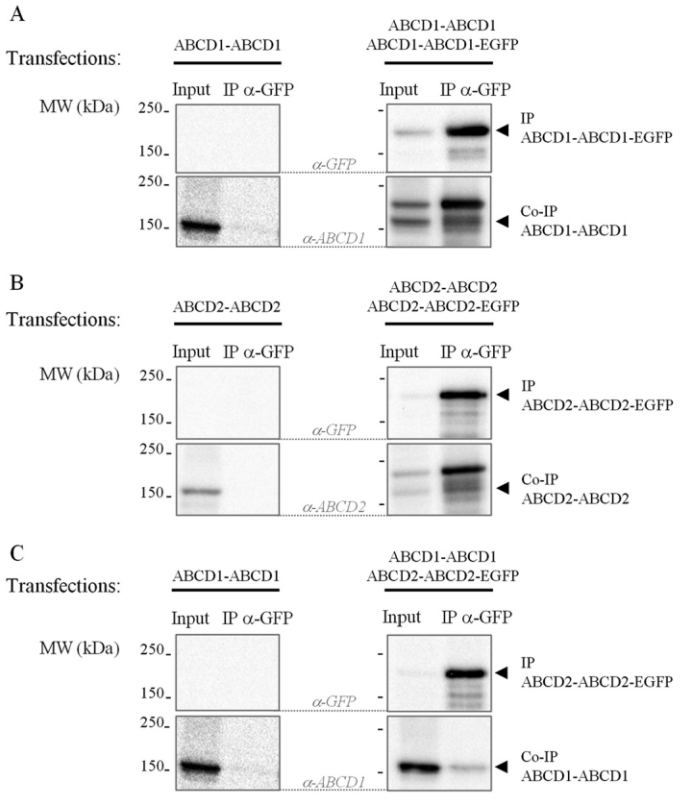


Figure 5. ABCD1 and ABCD2 are present in homo- and heterotetramers. Co-IP experiments were performed from single- and double-transfected COS-7 cells with plasmids that encode for chimeric ABCD1 dimers or chimeric ABCD2 dimers either fused to EGFP or not. Single (negative control)- and double-transfected cell lysates (400 μg) were used for the anti-GFP IP experiments. Input (50 μg) and eluted proteins (IP and co-IP proteins) were analyzed by SDS-PAGE and immunoblotting with the antibodies indicated. Immunoblots are representative of three independent experiments. *A*, using an anti-GFP antibody, co-IP of ABCD1-ABCD1 (band at ~160 kDa; *right*) with ABCD1-ABCD1-EGFP showed the presence of ABCD1 homotetramers. The anti-GFP IP performed on ABCD1-ABCD1-transfected COS-7 cells, used as negative control, revealed no band (*left*). *B*, using an anti-GFP antibody, co-IP of ABCD2-ABCD2 (band at ~160 kDa; *right*) with ABCD2-ABCD2-EGFP demonstrated the presence of ABCD2 homotetramers. No band was detected for the negative IP control (*left*). *C*, using an anti-GFP antibody, co-immunoprecipitation of ABCD1-ABCD1 (band at ~160 kDa; *right*) with ABCD2-ABCD2-EGFP showed the presence of heterotetramers. No band was detected for the negative IP control (*left panels* reused *A*).

ABCD1 and ABCD2 tetrameric assemblies remain unchanged during the catalytic cycle of the transporters

We next analyzed whether activation or inactivation of the ATP-driven fatty-acid transport assumed by ABCD1 and ABCD2 could be associated with an altered ability to tetramerize and could trap transient assembly.

Blocking ATP hydrolysis activity of ABCD1 and ABCD2 was provided by the peroxisome-enriched fraction treatment with a non-hydrolyzable competitor of ATP (AMP-PNP). Similarly to ATP, preincubation of peroxisomes with AMP-PNP drastically increased the extraction of ABCD1 and ABCD2-EGFP proteins from peroxisomal membranes by α-DDM micelles (Fig. 8*A*), indicating that nucleotide binding but not nucleotide hydrolysis is responsible for such an elevated extraction yield. Analysis of these α-DDM-soluble fractions on Deriphat-PAGE showed that ABCD1 and ABCD2-EGFP high-molecular weight assemblies (*i.e.* tetramers) remained unchanged whatever the conditions (Fig. 8*B*).

Stimulation of the ATP-driven fatty-acid transport was obtained by incubation of isolated peroxisomes in the presence of ATP, fatty acid (C26:0), and the cytosolic fraction, previously reported to be needed for functional β-oxidation in isolated peroxisomes (3). The subsequent analysis revealed a comparable ABCD1 and ABCD2-EGFP extraction efficiency in all treated samples (Fig. 8*C*) and the same banding pattern on Deriphat-PAGE (Fig. 8*D*).

Overall, by interfering with the ATP-driven fatty-acid transport assumed by ABCD1 and ABCD2-EGFP, our data indicate that ABCD1 and ABCD2-EGFP tetrameric assemblies remain unchanged during the catalytic cycle of both transporters and hence that these transporters probably form obligate tetramers.

Identification of potential ABCD2-binding partners

The asymmetric peaks seen on native-PAGE profiles with a shoulder toward the high-molecular weight region both for ABCD1 and ABCD2 (Figs. 6*E* and 7*B*) suggested that besides tetrameric forms, higher molecular assemblies of ABCD1 and ABCD2 are present (up to 720 kDa). We wondered whether ABCD1 and ABCD2 form oligomeric structures (>4 monomers) or belong to a complex formed by a tetramer interacting with other proteins.

To identify potential interacting partners specific for ABCD2, we developed a co-IP/mass spectrometry (MS) strategy. The α-DDM soluble fraction of the peroxisome-enriched fraction, prepared from the clone 28.38 expressing or not expressing ABCD2-EGFP, was subjected to anti-GFP co-IP assays. Quantitative liquid chromatography-electrospray ionization-tandem mass spectrometry was used to identify eluted proteins from co-IP assays. Differential analysis between samples expressing or not expressing ABCD2-EGFP (+dox/−dox) was performed to limit identification of false-positive interactions. Hence, only proteins detected exclusively in the positive samples were listed (Table 1). ABCD2 was successfully identified, with 26 unique peptides to ABCD2 and two shared peptides between ABCD1 and ABCD2 leading to 51.7% ABCD2 sequence coverage. Interestingly, a total of 13 non-redundant proteins were found to potentially interact with ABCD2-EGFP (Table 1). Four of them are statistically relevant (-fold change > 2): the fatty-acid amide hydrolase 1 (FAAH1), the sarcoplasmic/endoplasmic reticulum calcium ATPase 2 (AT2A2), the sodium/potassium-transporting ATPase subunit β-1 (AT1B1), and the serum paraoxonase/arylesterase 1 (PON1).

Discussion

For the first time, we demonstrate the presence of tetrameric assemblies of the peroxisomal ABCD1 and ABCD2 transporters in rodents, although the scientific community has previously reported a dimeric status for peroxisomal ABCD proteins in yeast (37, 38), rodents, or humans (8, 19–23). Our data clearly demonstrate that ABCD1 and ABCD2-EGFP are found in high-molecular weight complexes, which could correspond to tetramers, as assessed by velocity gradient centrifugation when solubilized with the mild detergent α-DDM. Tetrameric assemblies were further evidenced by co-IP assays of functional chimeric dimers expressed in transfected COS-7 cells. Opti-

Downloaded from http://www.jbc.org/ at INSERM on August 2, 2017

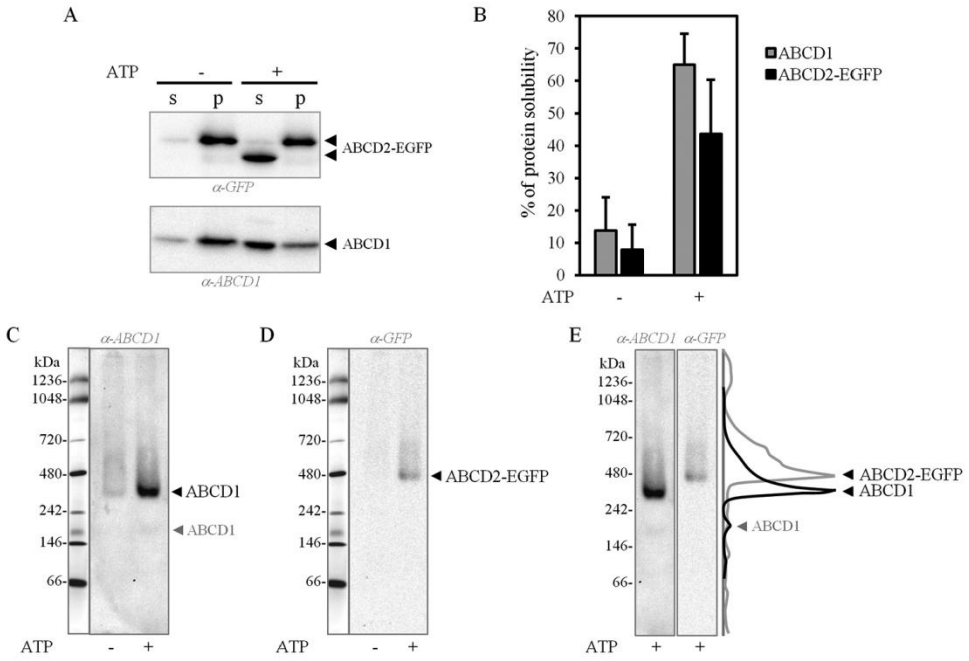


Figure 6. Presence of ABCD1 and ABCD2-EGFP in distinct high-molecular weight complexes in rat hepatoma cells by native PAGE. ABCD1 and ABCD2-EGFP membrane extraction from induced clone 28.38 was performed by α-DDM-containing solubilization buffer on peroxisome-enriched fraction preincubated or not with ATP. *A*, after centrifugation, the resulting soluble (supernatant (*s*)) and insoluble (pellet (*p*)) fractions were analyzed by SDS-PAGE and immunoblotting. Immunoblots are representative of three independent experiments. *B*, histograms representing the densitometric analysis of immunoblots of solubilized ABCD1 and ABCD2-EGFP from the peroxisome-enriched fraction preincubated or not with ATP. A markedly increased solubility of ABCD1 (4.7-fold) and ABCD2-EGFP (5.5-fold) was obtained with ATP. Values are mean ± S.D. (*error bars*) ($n = 6$). *C* and *D*, analysis of the soluble fraction (with/without ATP conditions) by native PAGE. The same PVDF membrane was used for immunoblotting with the anti-ABCD1 antibody (*C*) and with the anti-GFP antibody (*D*) after membrane stripping, to detect ABCD1 and ABCD2-EGFP proteins, respectively. The same native molecular mass marker lane is indicated at the *left*. ABCD1 is detected as a major band at ~350 kDa consistent with tetrameric assembly and as a faint band at ~200 kDa consistent with dimeric assembly. ABCD2-EGFP is only detected as a major band at ~480 kDa consistent with tetrameric assembly. *E*, superimposition of the densitometric tracing of the native-PAGE electrophoretic patterns showed that ABCD1 and ABCD2 were mainly present in distinct complexes, as shown by a weak overlapping of ABCD1 and ABCD2-EGFP bands. The native-PAGE immunoblotting images are representative of several experiments performed.

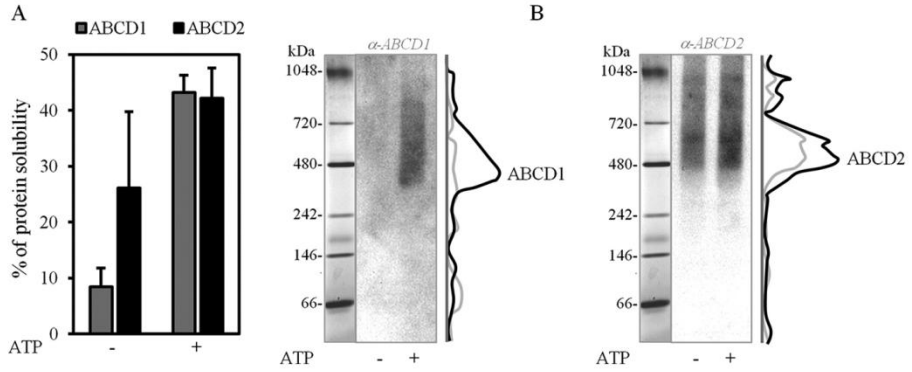


Figure 7. Native-PAGE profiles of ABCD1 and ABCD2 in the BV-2 microglial cell line. *A*, histograms representing the percentage of α-DDM-solubilized ABCD1 and ABCD2 proteins from the BV-2 cell peroxisome-enriched fraction, preincubated or not with ATP. Values are mean ± S.D. (*error bars*) ($n = 3$). The densitometric analyses were performed on immunoblots using the anti-ABCD1 and anti-ABCD2 antibodies. *B*, native-PAGE profiles of solubilized ABCD1 and ABCD2, as described in *A* showed that both proteins are found in high-molecular weight complexes. The same PVDF membrane was used for immunoblotting with the anti-ABCD1 antibody (*left*) and with the anti-GFP antibody (*right*) after membrane stripping. In both *panels*, the same native molecular mass marker lane is indicated at the *left*. ABCD1 is detected in a large band with an estimated molecular mass in the range of 350–700 kDa (*left*). ABCD2 is detected in a large band as well, with an estimated molecular mass in the range of 480–700 kDa (*right*).

mized native-PAGE experiments confirmed that tetrameric assemblies were predominant in ABCD2-EGFP forced expression cells (clone 28.38) and in ABCD1/ABCD2-naturally expressing cells (BV-2) as well. The weak overlap of ABCD1 and ABCD2 bands on native-PAGE profiles indicates that homotetramers are greatly favored over the heterotetramers. Previous bioluminescence resonance energy transfer experiments have led to the conclusion that homo-oligomerization of ABCD1 is favored over hetero-oligomerization with ABCD3 (39). Moreover, ABCD1 homointeraction, interpreted as a dimer, was also found to be either predominant in transfected cells (21) or exclusive in the liver (22), an organ with low ABCD2 expression level (2, 16). Hence, the predominance of homotetramers over heterotetramers is consistent with previous data reporting preferred homointeraction over heterointeraction.

In an attempt to decipher the composition of the tetrameric forms, we took advantage of the C4C8 detergent, which solubilized ABCD1 and ABCD2-EGFP as a mix of monomer/dimer.

Downloaded from http://www.jbc.org/ at INSERM on August 2, 2017

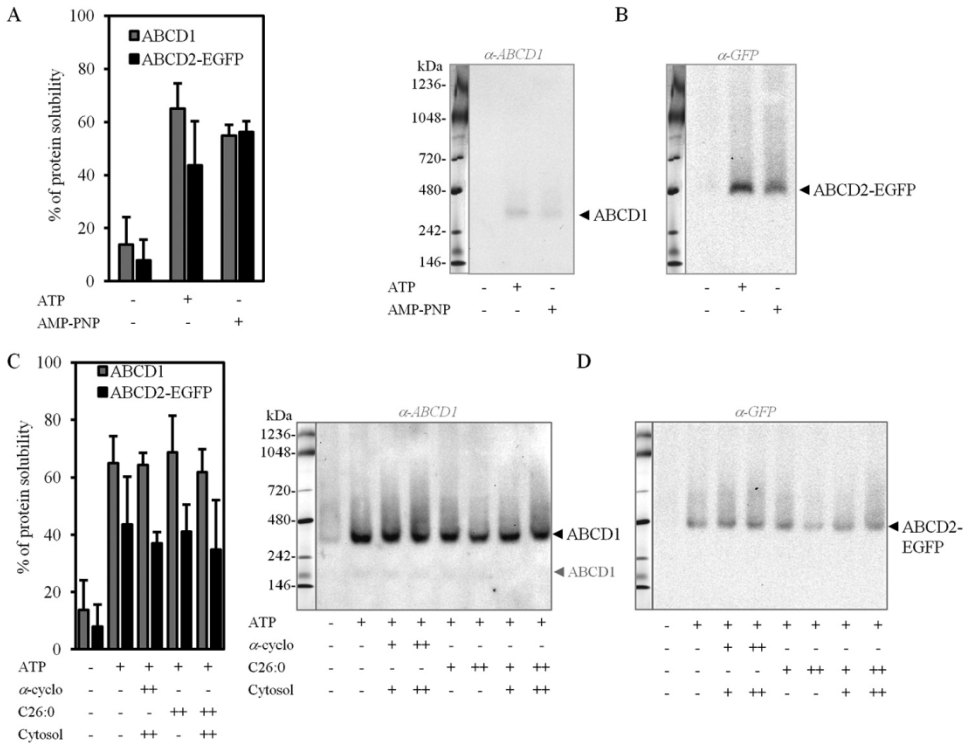


Figure 8. Unchanged ABCD1- and ABCD2-EGFP molecular assemblies during the catalytic cycle of the transporters. *A*, histograms representing the percentage of α-DDM-solubilized ABCD1 and ABCD2-EGFP proteins from the induced clone 28.38 peroxisome-enriched fraction preincubated or not with ATP or AMP-PNP. The densitometric analyses were performed on immunoblots using the anti-ABCD1 and anti-GFP antibodies. Values are mean ± S.D. (*error bars*) ($n = 3$). *B*, native-PAGE profiles of solubilized ABCD1 and ABCD2-EGFP, as described in *A*. The same PVDF membrane was used for immunoblotting with anti-ABCD1 (*left*) and anti-GFP (*right*) antibodies after membrane stripping, and the same native molecular mass marker lane is indicated in both *panels*. The molecular assembly of both proteins remained unchanged whatever the pretreatment done. *C*, histograms representing the densitometric analysis of immunoblots of α-DDM-solubilized ABCD1 and ABCD2-EGFP from the induced clone 28.38 peroxisome-enriched fraction preincubated in the presence of 4 mM ATP (+); 0.2 (+) or 0.8 mM α-cyclodextrine (++); 4 (+) or 16 μM C26:0 (++); or cytosol (++) or 4-fold dilution (+), separately or in combination as indicated. *D*, native-PAGE profiles of solubilized ABCD1 and ABCD2-EGFP, as described in *C*. The same PVDF membrane was used for immunoblotting with anti-ABCD1 (*left*) and anti-GFP (*right*) antibodies, and the same native molecular mass marker lane is indicated at the *left* of both *panels*. The molecular assembly of both proteins (*i.e.* the 350-kDa ABCD1 complex and the 480-kDa ABCD2-EGFP complex) remained unchanged whatever the pretreatment done.

Table 1

List of proteins identified in co-immunoprecipitated ABCD2-EGFP complex by LC-MS/MS

Protein accession	Protein symbol	Protein name	No. of peptides[a]	Protein probability	Sequence coverage	Change[b]
					%	*-fold*
Q9QY44	**ABCD2**	**ATP-binding cassette sub-family D member 2**	**28 (2)**	**1**	**51.7**	**12.42**
P97612	FAAH1	Fatty-acid amide hydrolase 1	4	1	13.1	5.02
P11507	AT2A2	Sarcoplasmic/endoplasmic reticulum calcium ATPase 2	27 (7)	1	34.6	4.71
P07340	AT1B1	Sodium/potassium-transporting ATPase subunit beta-1	3	1	25	2.48
P55159	PON1	Serum paraoxonase/arylesterase 1	9	1	40.8	2.32
D3ZHR2	ABCD1	ATP-binding cassette sub-family D member 1	7 (2)	1	17	< 2
P16970	ABCD3	ATP-binding cassette sub-family D member 3	4	1	11.1	< 2
Q7TS56	CBR4	Carbonyl reductase family member 4	3	1	17.4	< 2
P11505	AT2B1	Plasma membrane calcium-transporting ATPase 1	6 (2)	1	6.6	< 2
P16086	SPTN1	Spectrin α chain, non-erythrocytic 1	8	1	3.9	< 2
Q63151	ACSL3	Long-chain acyl-CoA synthetase 3	3	0.9997	6.9	< 2
O88813	ACSL5	Long-chain acyl-CoA synthetase 5	2	0.9994	3.4	< 2
P14408	FUMH	Fumarate hydratase, mitochondrial	1	0.8013	3.9	< 2
P25235	RPN2	glycosyltransferase subunit 2	1	0.7224	3.8	< 2

[a] Numbers in parentheses refer to the numbers of shared peptides between homologous proteins among the total number of peptides indicated.
[b] Statistical significance was obtained for proteins identified with a -fold change > 2.

This detergent belongs to the anionic calix[4]arene-based detergent described to successfully extract several functional ABC half-transporters as dimers (30). Interestingly, the absence of interaction of ABCD1 with ABCD2-EGFP by co-IP experiments when solubilized with C4C8 suggests that homointeraction is greatly favored or pushed to the extreme that only homointeraction would exist within a dimer. This result calls into question the relevance of the chimeric heterodimers that we previously constructed and studied (24). Despite the fact that the chimeric heterodimers were functionally active, we were intrigued by their much lower expression levels compared with chimeric homodimers. The results observed for chimeric heterodimers after temperature rescue experiments suggest that the low expression level is due to folding defects. Thus, the absence of interaction of ABCD1 with ABCD2 within a dimer, as evidenced by co-IP, suggests that ABCD1/ABCD2 het-

Downloaded from http://www.jbc.org/ at INSERM on August 2, 2017

erodimers might not be favored or even might not exist *in vivo*. Hence, the absence of or minor heterointeraction within a dimer and the existence of heterotetramers suggest that heterotetramers would be mainly composed of two different homodimers.

In the ABC field, the structure-function relationship remains difficult to establish for such intractable proteins, and only a few reports have been published. Yang *et al.* (28) succeeded in demonstrating that the functional unit of the full-length transporter ABCC1 involved in multidrug resistance is a dimer, thanks to an ABCC1 mutant that has a dominant-negative function when co-expressed with wild-type ABCC1. Interestingly, for the cholesterol full-length transporter ABCA1, a dimer-monomer interconversion occurred during HDL generation revealed by single-molecule imaging (26). The oligomerization (monomers, dimers, and even tetramers) of the surfactant lipid transporter ABCA3, a full-length ABC, was suggested to be crucial for its function (27). Concerning ABCD1, acyl-CoA binding induced conformational changes, as assessed by a protease-based approach (40). However, these conformational changes probably do not affect the overall molecular assembly of the transporter because the ABCD1 tetrameric assembly remained unchanged during the catalytic cycle. Thus, contrary to ABCA1 and ABCA3, for which both monomeric and oligomeric forms co-exist during the catalytic cycle, ABCD1 and ABCD2 are likely to form obligate tetramers during this cycle.

In ABC transporters, a tight cross-talk between substrate binding and ATP binding has been extensively described and is associated with the modification of the inward/outward-facing structures. Of note, whatever the different biochemical approaches used in our study, difficulties in solubilizing ABC transporters from the peroxisomal membrane were overcome by preincubation of peroxisomes with ATP before the solubilization step. We hypothesized that the difference in solubility could be due to the supposed different conformations adopted by the transporters during the catalytic cycle. Indeed, ABC transporters were described as adopting an inward-facing conformation, with very large separation of the NBDs in the absence of ATP, and an outward-facing conformation with a smaller separation of the NBDs when bound to nucleotides (41). Thus, a transporter in an outward-facing conformation, which is the most compact structure, should be easier to extract from the peroxisomal membrane by the detergent micelle. It could also be postulated that the observed resistance to α-DDM solubilization is related to the association of peroxisomal ABC transporters with detergent-resistant microdomains. In the presence of ATP, both transporters would be distributed outside the detergent-resistant microdomains and hence would be easily solubilizable. ABCD1 and ABCD3 were indeed described as being associated with different detergent-resistant microdomains in peroxisomes of hepatocytes (42). Further experiments should be done to shed light on this increased solubility mediated by ATP, which certainly has a biological relevance.

In any even, the fact that heterotetramers of ABCD1 and ABCD2 would be composed of two different homodimers is of particular interest. In a previous study, we have demonstrated a transdominant-negative effect of mutated ABCD2 on ABCD1 function (8). In light of the current results, it would mean that the functional unit is at minimum a tetramer. If ABCD1 tetramerization is indeed crucial for its function, disruption of oligomerization due to mutations could represent a novel pathomechanism in X-ALD. It is thus important to determine whether ABCD1 mutations that are found in X-ALD patients have any impact on its tetramerization. Among the >300 non-recurrent missense *ABCD1* gene mutations distributed all along the protein sequence, those located in the last 87 C-terminal amino acids could be of interest because this region has been reported to be involved in ABCD1 interaction with itself and with ABCD2 and ABCD3 (19, 21).

The native-PAGE profiles obtained suggest that besides tetrameric forms, higher molecular assemblies of ABCD1 and ABCD2 are present, up to 720 kDa. Coincidently, similar native-PAGE experiments from *Arabidopsis thaliana* cultured cells showed the presence of the unique peroxisomal ABC transporter (*i.e.* COMATOSE, a full-length transporter ortholog to ABCD1) in a complex of ~700 kDa (43). Several studies have reported physical interaction between the peroxisomal ABCD transporters and other proteins, such as the very long-chain acyl-CoA synthetases 1 and 4 (ACSVL1 and -4), the ATP citrate synthase, the fatty-acid synthase variant protein (FASN), the phytanoyl-CoA 2-hydroxylase, and PEX19p (39, 44–46). Large complexes containing ABC transporters and accessory proteins are frequent in the ABC family. Moreover, such interactions are in agreement with the hydrophobic nature of the substrates, which probably require a "continual chaperoning" from the cytosol to the peroxisomal matrix. Among the interacting partners listed above, only PEX19p has been reported to interact with the ABCD2 transporter (46). The co-IP/MS strategy developed in the present study has been adapted to membrane proteins and successfully identified potential binding partners of ABCD2, including soluble and membrane proteins. These partners are different from those previously identified for ABCD1, ABCD2, and ABCD3 (39, 44–46). Interestingly, they are distributed in the peroxisome (ABCD1 and ABCD3) but also in the cytoplasm (spectrin α chain, SPTN1), in lipid droplets (long-chain acyl-CoA synthetase 3 (ACSL3)), and in other organelles, such as endoplasmic reticulum (FAAH1 and long-chain acyl-CoA synthetase 3 (ACSL3)) and mitochondria (carbonyl reductase family member 4 (CBR4) and ACSL5). These data corroborate the existence of peroxisome interconnection with organelles, lipid droplets, and the cytoskeleton (47). The first molecular mechanism for establishing peroxisome-endoplasmic reticulum associations has been discovered recently (48, 49). Moreover, it has been evidenced recently that ABCD2 is localized to a subclass of peroxisome that may associate physically with mitochondria and the endoplasmic reticulum (50). Nevertheless, the mechanisms leading to such physical contacts between these different cell compartments and the physiological relevance of these interactions are largely unknown.

The co-IP/MS experiment succeeded in identifying ABCD1 and ABCD3 proteins as ABCD2-binding partners, despite the presence of degenerate peptides (two shared peptides between ABCD1 and ABCD2), which brings uncertainty and ambiguity in determining the identities of sample proteins (51). The -fold change between samples expressing or not ABCD2-EGFP was

ASBMB

Downloaded from http://www.jbc.org/ at INSERM on August 2, 2017

used as a guide for specific interaction. Although ABCD1 and ABCD3 were identified with a -fold change less than the arbitrary threshold value of 2, ABCD1 and ABCD3 are true ABCD2 partners, judging from the present co-IP assays and from previous reports (8, 19, 20, 24).

The protein identified with the highest -fold change is FAAH1 localized at the endoplasmic reticulum and responsible for the degradation of fatty-acid amides to the corresponding fatty acids, with a preference of PUFA over MUFA and saturated fatty acids, at least for the long-chain fatty acids tested (52, 53). As a reminder, ABCD2, but not ABCD1 or ABCD3, would be involved in the transport of PUFA, such as docosahexaenoic acid (DHA) (C22:6 *n*-3) (5, 8). Interestingly, the ethanolamine amide of DHA (*N*-docosahexaenoyl ethanolamine) is degraded to DHA by the FAAH1 (54), and DHA is known to be β-oxidized into the peroxisome (55). Hence, it is tempting to speculate that FAAH1 interaction with ABCD2 permits to supply the PUFA substrate to ABCD2 for further degradation into the peroxisome. Other potential binding partners of ABCD2 identified are involved in lipid metabolism, such as CBR4 and the long-chain acyl-CoA synthetase 3 and 5 (ACSL3 and ACSL5). Interestingly, ACSL3 has a substrate preference for PUFA (56).

AT2A2 was also identified with a high -fold change, suggesting that this protein is also a true interactor of ABCD2. In addition, its homolog (AT2A1) has been identified by proteomic analysis in a subclass of peroxisome expressing ABCD2 (50). By transferring Ca^{2+} from the cytosol to the endoplasmic reticulum, this enzyme is involved in calcium signaling. Interestingly, disturbed calcium signaling was recently proposed to be involved in the pathogenesis of X-ALD (57). Altogether, the link between ABCD2 and calcium signaling would require further investigation, especially because the calcium-transporting ATPase 1 (AT2B1), which is expressed at the plasma membrane and transports calcium out of the cell, was also identified as a potential interactor of ABCD2 (Table 1).

In conclusion, the characterization of the quaternary structure of ABCD1 and its homolog ABCD2 demonstrated for the first time that both proteins exist as tetramers, mainly homotetramers, in the peroxisomal membrane. However, the functional significance of this tetramerization remains unknown. A question that is still pending is whether or not oligomerization participates in substrate specificity. Molecular complexes of higher molecular weight were also observed and remain to be characterized in detail. In addition, we identified potential binding partners of ABCD2, involved in PUFA metabolism and calcium signaling, whose interaction with ABCD2 remains to be confirmed and whose physiological relevance remains to be elucidated.

Experimental procedures

Cell culture

H4IIEC3 rat hepatoma cells stably expressing ABCD2-EGFP (clone 28.38) (8, 31) were cultured as described previously. COS-7 cells (ECACC catalog no. 87021302) were grown in DMEM supplemented with 10% FBS. Murine microglial cells (BV-2) from Banca-Biologica e Cell Factory (catalog no. ATL03001) were cultured in DMEM supplemented with 10% heat-inactivated FBS and 1% penicillin/streptomycin (Dutscher). Cultures were maintained at 37 °C in a humidified atmosphere containing 5% CO_2.

Plasmid constructs

For COS-7 cell transfection, the pEGFP-N3 plasmids coding for the chimeric dimers fused to EGFP (ABCD1-ABCD1-EGFP and ABCD2-ABCD2-EGFP) were obtained previously (24). The pcDNA3.1(−) plasmids coding for ABCD1-ABCD1 and ABCD2-ABCD2 were obtained by a similar strategy (24) and generated chimeric proteins containing two moieties linked by 3 alanine residues.

Transfection

COS-7 cells (500,000 cells at 70–80% confluence) were transiently transfected with plasmids (4 μg for a single transfection or 2 μg of each plasmid for double transfection) coding for the chimeric dimers (pEGFP-N3 or pcDNA3.1(−) plasmids) using the ExGen 500 *in vitro* transfection reagent (Euromedex), according to the manufacturer's instructions. After transfection, cells were cultured in DMEM supplemented with 10% FBS for 48 h and then lysed for further experiments.

Peroxisome-enriched fraction isolation by subcellular fractionation

Cells (from 10 140-mm-diameter Petri dishes at 80–90% confluence) were homogenized in 100 ml of homogenization buffer (HB) (250 mM sucrose, 1 mM EDTA, 0.1% ethanol, 50 mM Tris-HCl, pH 7.5) by six strokes with a Dounce homogenizer (pestle B) followed by centrifugation at 1,000 × *g* for 5 min. The pellet was suspended in HB, and homogenization was repeated twice. Supernatants were pooled and then centrifuged first at 7,500 × *g* for 4 min, 8 s and second at 55,000 × *g* for 4 min, 48 s to pellet peroxisomes, lysosomes, and light mitochondria. After pellet resuspension in 5 ml of HB and protein concentration measurement using the bicinchoninic acid assay (BCA; Sigma-Aldrich), the peroxisome-enriched fraction (L fraction) (58) was subjected to ABCD protein solubilization assays.

Cytosolic fractions were prepared from 8 140-mm-diameter Petri dishes at 80–90% confluence of H4IIEC3 rat hepatoma cells stably expressing ABCD2-EGFP (clone 28.38 + 2 μg/ml doxycycline overnight). Cells were homogenized (Dounce, pestle B) in 2 ml of HB, and the homogenate was centrifuged at 199,000 × *g* for 45 min. The resulting supernatant corresponds to the cytosolic fraction.

ABCD protein solubilization assays from the peroxisome-enriched fraction

The peroxisome-enriched pellet was suspended (20 μg/150 μl) in the treatment buffer (0.25 M sucrose, 10 mM $MgCl_2$, 50 mM Tris-HCl, pH 8.0) containing separately or in combination 4 mM ATP (Sigma-Aldrich), 4 mM AMP-PNP (Sigma-Aldrich), 0.8 mM α-cyclodextrine (Sigma-Aldrich), 4 or 16 μM C26:0, and a 1:5 dilution (+) or 2:5 dilution (++) of the cytosol. The mixture was incubated at 37 °C for 40 min, and after centrifugation at 20,000 × *g* for 20 min, the pellet was suspended in the solubilization buffer (50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 0.4% detergent, pH 8.0) for 30 min at 4 °C (15 μl/pellet). After centrifugation (20,000 × *g* for 20 min at 4 °C), the supernatant (containing

Downloaded from http://www.jbc.org/ at INSERM on August 2, 2017

solubilized proteins) and/or the pellet (containing insoluble proteins) were either loaded on SDS-PAGE or on native PAGE for further analysis.

Velocity sucrose gradient centrifugation

COS-7 cells transfected with pABCD2-ABCD2-EGFP-N3 plasmid (48 h post-transfection) or H4IIEC3 rat hepatoma cells stably expressing ABCD2-EGFP (clone 28.38 + 2 μg/ml doxycycline overnight) and at 80–90% confluence were washed twice with phosphate-buffered saline (PBS). The cells were then solubilized at 4 °C for 30 min in 150 mM NaCl and 50 mM Tris-HCl, pH 7.4, in the presence of 1% SDS, 1% of the anionic calix[4]arene-based detergent C4C8 (30), 1% Triton X-100 (Euromedex), 1% α-DDM (Anatrace), or 1% β-DDM (Anatrace) and supplemented with a protease inhibitor mixture (Roche Diagnostics) plus 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF). After centrifugation at 20,000 × *g* at 4 °C for 20 min, the cleared post-nuclear supernatant was collected, and protein concentration was measured by BCA. Post-nuclear supernatants (2.5 mg) adjusted to 400 μl were layered on top of a discontinuous 5–30% (w/v) sucrose gradient prepared by successive layers of 2.5 ml of 30% (w/v), 2 ml of 20%, 2 ml of 15%, 2 ml of 10%, and 2 ml of 5% sucrose in 50 mM Tris-HCl (pH 7.4), 150 mM NaCl, and the appropriate detergent. The overlaid gradients were subjected to ultracentrifugation in a SW41 rotor at 260,000 × *g* for 12 h at 4 °C except for SDS gradients (24 °C). At equilibrium, twenty-two 500-μl fractions were collected and numbered from top to bottom. For sucrose gradients loaded with lysate of ABCD2-ABCD2-EGFP-transfected COS-7 cells, protein samples from each fraction collected were concentrated 5 times by acetone precipitation. Each fraction (50 μl, concentrated or not) was analyzed for ABCD1 and ABCD2 contents by immunoblotting. Sucrose gradient linearity was confirmed by refractometry (Abbe-2WAJ) on blank gradients.

Because the estimation of the approximate molecular weight of membrane protein complexes by comparison with sedimentation of soluble protein standards is complicated by the contribution of unknown amounts of bound detergent in the micelle and by the fact that micelles may affect buoyancy, we included a membrane protein marker, the chimeric dimer ABCD2-ABCD2-EGFP. Native soluble protein markers (thyroglobulin (669 kDa), catalase (232 kDa), β-amylase (200 kDa), conalbumin (75 kDa), ovalbumin (44 kDa)) and a denatured membrane protein marker ABCD2-ABCD2-EGFP (194 kDa) were run in parallel gradients. Peak migration of soluble markers and of the membrane marker was determined by absorbance at 280 nm or by immunoblotting analysis, respectively, for all fractions.

Co-IP assays

Mouse monoclonal anti-GFP antibody covalently immobilized on agarose beads (MBL) and homemade rabbit polyclonal anti-ABCD1 antibody (serum 029) cross-linked to agarose beads via dimethyl pimelimidate (24) were used for co-IP assays. COS-7 cells transiently transfected with plasmids (coding for ABCD1-ABCD1, ABCD1-ABCD1-EGFP, ABCD2-ABCD2, ABCD2-ABCD2-EGFP) and H4IIEC3 cells stably expressing ABCD2-EGFP (clone 28.38 + 2 μg/ml of doxycycline overnight) or not were homogenized in the solubilization buffer: 50 mM Tris-HCl, pH 7.4, 150 mM NaCl, 1% detergent (C4C8 (30), Triton X-100, or β-DDM), 1 mM PMSF, and protease inhibitor mixtures (Roche Diagnostics). Immunoprecipitation assays (from 200 to 1,600 μg of precleared cell lysate) were carried out as described previously (24). Bound proteins, including IP and co-IP proteins, were analyzed by SDS-PAGE, followed by immunoblotting with anti-ABCD1, anti-ABCD2, and anti-GFP antibodies.

For co-IP assays coupled to mass spectrometry, the peroxisome-enriched fractions were prepared as described from the clone 28.38 expressing or not expressing ABCD2-EGFP (with or without 2 μg/ml doxycycline overnight). The α-DDM-soluble fractions of the peroxisome-enriched fraction (300 μg) were subjected to anti-GFP (covalently immobilized on agarose beads (MBL)) co-IP assays. Eluted proteins were further identified by LC-MS/MS.

Native-PAGE fractionation and analysis

Solubilized proteins (with 0.4% α-DDM containing solubilization buffer) from peroxisome-enriched fractions (20 μg/assay) preincubated with fatty acid and/or cytosolic fraction and/or ATP or derivatives were loaded on a Deriphat native PAGE as described previously (36). Samples were fractionated on 4–16% native-PAGE BisTris gel (Life Technologies, Inc.), and 0.1% Deriphat was included in the upper reservoir. After electrophoresis at 4 °C at 50 V for 12 h, proteins were transferred onto a PVDF membrane at 4 °C in 25 mM Tris, 192 mM glycine, and 20% (v/v) methanol. PVDF membranes were further probed with antibodies to detect the presence of ABCD1 and ABCD2 proteins. The migration of native marker unstained protein standards (Invitrogen) was analyzed by Coomassie Brilliant Blue G staining (Sigma-Aldrich) of an excised marker lane of the gel and by Ponceau S staining of the PVDF membrane.

Western blotting

Proteins from total cell lysate (40–50 μg), proteins solubilized or not from peroxisome-enriched fraction (20 μg/assay), velocity sucrose gradient fractions concentrated or not (50 μl), and immunoprecipitated proteins were separated on 7.5% SDS-PAGE or on 4–16% native Deriphat-PAGE and transferred onto a PVDF membrane. First incubated in 5% skimmed milk in PBS, 0.1% Tween 20 (PBS/T) for 1 h at room temperature, the membrane was then probed with mouse anti-β-actin (dilution 1:10,000; Sigma-Aldrich), mouse anti-GFP (dilution 1:250; Roche Diagnostics), rabbit polyclonal anti-ABCD1 (1:5,000; homemade serum 029) (24), or rabbit polyclonal anti-ABCD2 (generous gift from Prof. G. Graf, University of Kentucky) (9) antibodies. The anti-ABCD1 and anti-ABCD2 antibodies do not cross-react with ABCD2 and ABCD1, respectively (data not shown). Following the incubation with the appropriate horseradish peroxidase (HRP)-conjugated secondary antibody (1:5,000; Santa Cruz Biotechnology, Inc.), immunoreactivity was revealed by ECL (Santa Cruz Biotechnology). Image processing and analysis were obtained using a Bio-Rad-Chemidoc XRS system and the Image Lab version 4.0 software for quantitative analysis. The double band detected with the anti-

Downloaded from http://www.jbc.org/ at INSERM on August 2, 2017

GFP antibodies on immunoblots obtained from SDS-PAGE corresponds to two different denatured states of the ABCD2-EGFP protein: a fully denatured protein (upper band) and a partially denatured protein (lower band). These two bands were obtained because samples were not boiled to avoid membrane protein aggregation. Both bands were systematically considered when immunoblots were subjected to densitometric analysis.

Protein identification by LC-MS/MS

Eluted proteins from co-IP assays were separated (short gel run, 1 cm) on 1D PAGE (Invitrogen). This 1-cm area was cut in spots and washed with 0.1 M NH_4HCO_3 and next with 100% acetonitrile (ACN) for 10 min. Reduction/alkylation was achieved by incubating the excised spots successively in 10 mM tris(2-carboxyethyl) phosphine, 0.1 M NH_4HCO_3 for 30 min at 37 °C and in 55 mM iodoacetamide, 0.1 M NH_4HCO_3 for 20 min. Peptide fragments were obtained after digestion with a solution of 40 mM NH_4HCO_3, 10% ACN containing 5 ng/μl trypsin (Promega) for 3 h at 37 °C. The resulting peptides were acidified with 0.1% formic acid. Extraction from the polyacrylamide gel pieces was performed by two successive incubations for a few min in ACN with sonication.

Peptides were further concentrated by evaporation and separated with the Ultimate 3000 RSLC nano system (ThermoScientific) fitted with a C18 trapping column (5-μm average particle diameter; 300-μm inner diameter × 5-mm length; ThermoScientific) and a C18 analytical column (2-μm average particle diameter, 75-μm inner diameter × 150-mm length; ThermoScientific). A 120-min gradient was performed, and peptides were analyzed by nano-LC-MS/MS using an LTQ-Orbitrap Elite mass spectrometer equipped with the Advion TriVersa NanoMate nanospray source. Full-scan spectra from a mass/charge ratio of 400 to one of 1,700 at a resolution of 120,000 full width at half-maximum were acquired in the Orbitrap mass spectrometer. From each full-scan spectrum, the 20 ions with the highest intensity were selected for fragmentation in the ion trap, and a 30-s exclusion time was defined. Each sample was analyzed in triplicate.

The acquired data were searched against the International Protein Index/UniProt using Mascot and X!Tandem. Based on tandem mass spectrometry data, peptide and protein identifications were validated through Peptide and ProteinProphet software (59). At the end of the above steps, each injection was described by a list of validated proteins and peptides. Peptides that were not identified in at least 2 of the 3 technical replicates injected per sample were excluded. Retention times were then aligned, and peptide intensity was extracted using the MASIC software (60). Using this quantification, a new filter based on the coefficients of variation of each peptide in each sample is applied to discard too poorly reproducible peptides. A linear mixed model is then used to select differential proteins between the positive (+dox) and negative (−dox) conditions (61). The false-discovery rate correction was applied to take into account the high dimension (far more tested variables than samples). Proteins identified with a -fold change higher than 2, with a false-discovery rate at 5%, were kept. Proteins detected exclusively in the positive samples but absent in the negative samples are also listed even if their presence is not statistically relevant.

Author contributions—F. G., C. G., and D. T. designed the experiments. F. G. conducted most of the experiments. C. G., Q. R., and A. M. M. D. participated in the biochemical data collection. D. P., C. T., G. L., and P. D. designed and performed mass spectrometry analyses. P. F. provided calixar detergents. F. G., C. G., S. S., D. T. analyzed data. D. T. conceived and coordinated the study with S. S. S. S. and D. T. wrote the paper. All authors read, improved, and approved the final manuscript.

Acknowledgments— We thank Thomas Munch, Lucine Marotte, and Stéphanie Nguyen for technical assistance as master student trainees.

References

1. Mosser, J., Douar, A. M., Sarde, C. O., Kioschis, P., Feil, R., Moser, H., Poustka, A. M., Mandel, J. L., and Aubourg, P. (1993) Putative X-linked adrenoleukodystrophy gene shares unexpected homology with ABC transporters. *Nature* **361,** 726–730
2. Trompier, D., and Savary, S. (2013) *X-linked Adrenoleukodystrophy*, Morgan & Claypool Life Sciences, 10.4199/C00075ED1V01Y201303GBD004
3. Wiesinger, C., Kunze, M., Regelsberger, G., Forss-Petter, S., and Berger, J. (2013) Impaired very long-chain acyl-CoA β-oxidation in human X-linked adrenoleukodystrophy fibroblasts is a direct consequence of ABCD1 transporter dysfunction. *J. Biol. Chem.* **288,** 19269–19279
4. van Roermund, C. W., Visser, W. F., Ijlst, L., van Cruchten, A., Boek, M., Kulik, W., Waterham, H. R., and Wanders, R. J. (2008) The human peroxisomal ABC half transporter ALDP functions as a homodimer and accepts acyl-CoA esters. *FASEB J.* **22,** 4201–4208
5. van Roermund, C. W., Visser, W. F., Ijlst, L., Waterham, H. R., and Wanders, R. J. (2011) Differential substrate specificities of human ABCD1 and ABCD2 in peroxisomal fatty acid β-oxidation. *Biochim. Biophys. Acta* **1811,** 148–152
6. Lombard-Platet, G., Savary, S., Sarde, C. O., Mandel, J. L., and Chimini, G. (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,** 1265–1269
7. Kamijo, K., Taketani, S., Yokota, S., Osumi, T., and Hashimoto, T. (1990) The 70-kDa peroxisomal membrane protein is a member of the Mdr (P-glycoprotein)-related ATP-binding protein superfamily. *J. Biol. Chem.* **265,** 4534–4540
8. Genin, E. C., Geillon, F., Gondcaille, C., Athias, A., Gambert, P., Trompier, D., and Savary, S. (2011) Substrate specificity overlap and interaction between adrenoleukodystrophy protein (ALDP/ABCD1) and adrenoleukodystrophy-related protein (ALDRP/ABCD2). *J. Biol. Chem.* **286,** 8075–8084
9. Liu, J., Sabeva, N. S., Bhatnagar, S., Li, X. A., Pujol, A., and Graf, G. A. (2010) ABCD2 is abundant in adipose tissue and opposes the accumulation of dietary erucic acid (C22:1) in fat. *J. Lipid Res.* **51,** 162–168
10. van Roermund, C. W., Ijlst, L., Wagemans, T., Wanders, R. J., and Waterham, H. R. (2014) A role for the human peroxisomal half-transporter ABCD3 in the oxidation of dicarboxylic acids. *Biochim. Biophys. Acta* **1841,** 563–568
11. Ferdinandusse, S., Jimenez-Sanchez, G., Koster, J., Denis, S., Van Roermund, C. W., Silva-Zolezzi, I., Moser, A. B., Visser, W. F., Gulluoglu, M., Durmaz, O., Demirkol, M., Waterham, H. R., Gökcay, G., Wanders, R. J., and Valle, D. (2015) A novel bile acid biosynthesis defect due to a deficiency of peroxisomal ABCD3. *Hum. Mol. Genet.* **24,** 361–370
12. Netik, A., Forss-Petter, S., Holzinger, A., Molzer, B., Unterrainer, G., and Berger, J. (1999) Adrenoleukodystrophy-related protein can compensate functionally for adrenoleukodystrophy protein deficiency (X-ALD): implications for therapy. *Hum. Mol. Genet.* **8,** 907–913
13. Pujol, A., Ferrer, I., Camps, C., Metzger, E., Hindelang, C., Callizot, N., Ruiz, M., Pàmpols, T., Giròs, M., and Mandel, J. L. (2004) Functional

Downloaded from http://www.jbc.org/ at INSERM on August 2, 2017

overlap between ABCD1 (ALD) and ABCD2 (ALDR) transporters: a therapeutic target for X-adrenoleukodystrophy. *Hum. Mol. Genet.* **13,** 2997–3006
14. Flavigny, E., Sanhaj, A., Aubourg, P., and Cartier, N. (1999) Retroviral-mediated adrenoleukodystrophy-related gene transfer corrects very long chain fatty acid metabolism in adrenoleukodystrophy fibroblasts: implications for therapy. *FEBS Lett.* **448,** 261–264
15. Troffer-Charlier, N., Doerflinger, N., Metzger, E., Fouquet, F., Mandel, J. L., and Aubourg, P. (1998) Mirror expression of adrenoleukodystrophy and adrenoleukodystrophy related genes in mouse tissues and human cell lines. *Eur. J. Cell Biol.* **75,** 254–264
16. Berger, J., Albet, S., Bentejac, M., Netik, A., Holzinger, A., Roscher, A. A., Bugaut, M., and Forss-Petter, S. (1999) The four murine peroxisomal ABC-transporter genes differ in constitutive, inducible and developmental expression. *Eur. J. Biochem.* **265,** 719–727
17. Langmann, T., Mauerer, R., Zahn, A., Moehle, C., Probst, M., Stremmel, W., and Schmitz, G. (2003) Real-time reverse transcription-PCR expression profiling of the complete human ATP-binding cassette transporter superfamily in various tissues. *Clin. Chem.* **49,** 230–238
18. Trompier, D., Gondcaille, C., Lizard, G., and Savary, S. (2014) Regulation of the adrenoleukodystrophy-related gene (ABCD2): focus on oxysterols and LXR antagonists. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **446,** 651–655
19. Liu, L. X., Janvier, K., Berteaux-Lecellier, V., Cartier, N., Benarous, R., and Aubourg, P. (1999) Homo- and heterodimerization of peroxisomal ATP-binding cassette half-transporters. *J. Biol. Chem.* **274,** 32738–32743
20. Smith, K. D., Kemp, S., Braiterman, L. T., Lu, J. F., Wei, H. M., Geraghty, M., Stetten, G., Bergin, J. S., Pevsner, J., and Watkins, P. A. (1999) X-linked adrenoleukodystrophy: genes, mutations, and phenotypes. *Neurochem. Res.* **24,** 521–535
21. Hillebrand, M., Verrier, S. E., Ohlenbusch, A., Schäfer, A., Söling, H. D., Wouters, F. S., and Gärtner, J. (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,** 26997–27005
22. Guimarães, C. P., Domingues, P., Aubourg, P., Fouquet, F., Pujol, A., Jimenez-Sanchez, G., Sá-Miranda, C., and Azevedo, J. E. (2004) Mouse liver PMP70 and ALDP: homomeric interactions prevail *in vivo*. *Biochim. Biophys. Acta* **1689,** 235–243
23. Tanaka, A. R., Tanabe, K., Morita, M., Kurisu, M., Kasiwayama, Y., Matsuo, M., Kioka, N., Amachi, T., Imanaka, T., and Ueda, K. (2002) ATP binding/hydrolysis by and phosphorylation of peroxisomal ATP-binding cassette proteins PMP70 (ABCD3) and adrenoleukodystrophy protein (ABCD1). *J. Biol. Chem.* **277,** 40142–40147
24. Geillon, F., Gondcaille, C., Charbonnier, S., Van Roermund, C. W., Lopez, T. E., Dias, A. M., Pais de Barros, J. P., Arnould, C., Wanders, R. J., Trompier, D., and Savary, S. (2014) Structure-function analysis of peroxisomal ATP-binding cassette transporters using chimeric dimers. *J. Biol. Chem.* **289,** 24511–24520
25. Wong, K., Briddon, S. J., Holliday, N. D., and Kerr, I. D. (2016) Plasma membrane dynamics and tetrameric organisation of ABCG2 transporters in mammalian cells revealed by single particle imaging techniques. *Biochim. Biophys. Acta* **1863,** 19–29
26. Nagata, K. O., Nakada, C., Kasai, R. S., Kusumi, A., and Ueda, K. (2013) ABCA1 dimer-monomer interconversion during HDL generation revealed by single-molecule imaging. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **110,** 5034–5039
27. Frixel, S., Lotz-Havla, A. S., Kern, S., Kaltenborn, E., Wittmann, T., Gersting, S. W., Muntau, A. C., Zarbock, R., and Griese, M. (2016) Homooligomerization of ABCA3 and its functional significance. *Int. J. Mol. Med.* **38,** 558–566
28. Yang, Y., Liu, Y., Dong, Z., Xu, J., Peng, H., Liu, Z., and Zhang, J. T. (2007) Regulation of function by dimerization through the amino-terminal membrane-spanning domain of human ABCC1/MRP1. *J. Biol. Chem.* **282,** 8821–8830
29. Li, C., Roy, K., Dandridge, K., and Naren, A. P. (2004) Molecular assembly of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator in plasma membrane. *J. Biol. Chem.* **279,** 24673–24684
30. Matar-Merheb, R., Rhimi, M., Leydier, A., Huché, F., Galián, C., Desuzinges-Mandon, E., Ficheux, D., Flot, D., Aghajari, N., Kahn, R., Di Pietro, A., Jault, J. M., Coleman, A. W., and Falson, P. (2011) Structuring detergents for extracting and stabilizing functional membrane proteins. *PLoS One* **6,** e18036
31. 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) A novel cell model to study the function of the adrenoleukodystrophy-related protein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **341,** 150–157
32. Abel, S., Dupradeau, F. Y., Raman, E. P., MacKerell, A. D., Jr., and Marchi, M. (2011) Molecular simulations of dodecyl-beta-maltoside micelles in water: influence of the headgroup conformation and force field parameters. *J. Phys. Chem. B* **115,** 487–499
33. Nury, T., Zarrouk, A., Ragot, K., Debbabi, M., Riedinger, J. M., Vejux, A., Aubourg, P., and Lizard, G. (2016) 7-Ketocholesterol is increased in the plasma of X-ALD patients and induces peroxisomal modifications in microglial cells: potential roles of 7-ketocholesterol in the pathophysiology of X-ALD. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 10.1016/j.jsbmb.2016.03.037
34. Niepmann, M., and Zheng, J. (2006) Discontinuous native protein gel electrophoresis. *Electrophoresis* **27,** 3949–3951
35. Peter, G. F., and Thornber, J. P. (1991) Biochemical composition and organization of higher plant photosystem II light-harvesting pigment-proteins. *J. Biol. Chem.* **266,** 16745–16754
36. Trompier, D., Alibert, M., Davanture, S., Hamon, Y., Pierres, M., and Chimini, G. (2006) Transition from dimers to higher oligomeric forms occurs during the ATPase cycle of the ABCA1 transporter. *J. Biol. Chem.* **281,** 20283–20290
37. Shani, N., Sapag, A., Watkins, P. A., and Valle, D. (1996) An S. cerevisiae peroxisomal transporter, orthologous to the human adrenoleukodystrophy protein, appears to be a heterodimer of two half ABC transporters: Pxa1p and Pxa2p. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **804,** 770–772
38. Hettema, E. H., van Roermund, C. W., Distel, B., van den Berg, M., Vilela, C., Rodrigues-Pousada, C., Wanders, R. J., and Tabak, H. F. (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,** 3813–3822
39. Hillebrand, M., Gersting, S. W., Lotz-Havla, A. S., Schäfer, A., Rosewich, H., Valerius, O., Muntau, A. C., and Gärtner, J. (2012) Identification of a new fatty acid synthesis-transport machinery at the peroxisomal membrane. *J. Biol. Chem.* **287,** 210–221
40. Guimarães, C. P., Sá-Miranda, C., and Azevedo, J. E. (2005) Probing substrate-induced conformational alterations in adrenoleukodystrophy protein by proteolysis. *J. Hum. Genet.* **50,** 99–105
41. Locher, K. P. (2016) Mechanistic diversity in ATP-binding cassette (ABC) transporters. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **23,** 487–493
42. Woudenberg, J., Rembacz, K. P., Hoekstra, M., Pellicoro, A., van den Heuvel, F. A., Heegsma, J., van Ijzendoorn, S. C., Holzinger, A., Imanaka, T., Moshage, H., and Faber, K. N. (2010) Lipid rafts are essential for peroxisome biogenesis in HepG2 cells. *Hepatology* **52,** 623–633
43. De Marcos Lousa, C., van Roermund, C. W., Postis, V. L., Dietrich, D., Kerr, I. D., Wanders, R. J., Baldwin, S. A., Baker, A., and Theodoulou, F. L. (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,** 1279–1284
44. Makkar, R. S., Contreras, M. A., Paintlia, A. S., Smith, B. T., Haq, E., and Singh, I. (2006) Molecular organization of peroxisomal enzymes: protein-protein interactions in the membrane and in the matrix. *Arch. Biochem. Biophys.* **451,** 128–140
45. Ewing, R. M., Chu, P., Elisma, F., Li, H., Taylor, P., Climie, S., McBroom-Cerajewski, L., Robinson, M. D., O'Connor, L., Li, M., Taylor, R., Dharsee, M., Ho, Y., Heilbut, A., Moore, L., *et al.* (2007) Large-scale mapping of human protein-protein interactions by mass spectrometry. *Mol. Syst. Biol.* **3,** 89
46. Gloeckner, C. J., Mayerhofer, P. U., Landgraf, P., Muntau, A. C., Holzinger, A., Gerber, J. K., Kammerer, S., Adamski, J., and Roscher, A. A. (2000) Human adrenoleukodystrophy protein and related peroxisomal ABC transporters interact with the peroxisomal assembly protein PEX19p. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **271,** 144–150

Downloaded from http://www.jbc.org/ at INSERM on August 2, 2017

47. Schrader, M., Grille, S., Fahimi, H. D., and Islinger, M. (2013) Peroxisome interactions and cross-talk with other subcellular compartments in animal cells. *Subcell. Biochem.* **69,** 1–22
48. Costello, J. L., Castro, I. G., Hacker, C., Schrader, T. A., Metz, J., Zeuschner, D., Azadi, A. S., Godinho, L. F., Costina, V., Findeisen, P., Manner, A., Islinger, M., and Schrader, M. (2017) ACBD5 and VAPB mediate membrane associations between peroxisomes and the ER. *J. Cell Biol.* **216,** 331–342
49. Hua, R., Cheng, D., Coyaud, É., Freeman, S., Di Pietro, E., Wang, Y., Vissa, A., Yip, C. M., Fairn, G. D., Braverman, N., Brumell, J. H., Trimble, W. S., Raught, B., and Kim, P. K. (2017) VAPs and ACBD5 tether peroxisomes to the ER for peroxisome maintenance and lipid homeostasis. *J. Cell Biol.* **216,** 367–377
50. Liu, X., Liu, J., Lester, J. D., Pijut, S. S., and Graf, G. A. (2015) ABCD2 identifies a subclass of peroxisomes in mouse adipose tissue. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **456,** 129–134
51. Huang, T., Wang, J., Yu, W., and He, Z. (2012) Protein inference: a review. *Brief. Bioinform.* **13,** 586–614
52. Boger, D. L., Fecik, R. A., Patterson, J. E., Miyauchi, H., Patricelli, M. P., and Cravatt, B. F. (2000) Fatty acid amide hydrolase substrate specificity. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **10,** 2613–2616
53. Wei, B. Q., Mikkelsen, T. S., McKinney, M. K., Lander, E. S., and Cravatt, B. F. (2006) A second fatty acid amide hydrolase with variable distribution among placental mammals. *J. Biol. Chem.* **281,** 36569–36578
54. Brown, I., Cascio, M. G., Wahle, K. W., Smoum, R., Mechoulam, R., Ross, R. A., Pertwee, R. G., and Heys, S. D. (2010) Cannabinoid receptor-dependent and -independent anti-proliferative effects of ω-3 ethanolamides in androgen receptor-positive and -negative prostate cancer cell lines. *Carcinogenesis* **31,** 1584–1591
55. Madsen, L., Frøyland, L., Dyrøy, E., Helland, K., and Berge, R. K. (1998) Docosahexaenoic and eicosapentaenoic acids are differently metabolized in rat liver during mitochondria and peroxisome proliferation. *J. Lipid Res.* **39,** 583–593
56. Van Horn, C. G., Caviglia, J. M., Li, L. O., Wang, S., Granger, D. A., and Coleman, R. A. (2005) Characterization of recombinant long-chain rat acyl-CoA synthetase isoforms 3 and 6: identification of a novel variant of isoform 6. *Biochemistry* **44,** 1635–1642
57. Kruska, N., Schönfeld, P., Pujol, A., and Reiser, G. (2015) Astrocytes and mitochondria from adrenoleukodystrophy protein (ABCD1)-deficient mice reveal that the adrenoleukodystrophy-associated very long-chain fatty acids target several cellular energy-dependent functions. *Biochim. Biophys. Acta* **1852,** 925–936
58. De Duve, C., Pressman, B. C., Gianetto, R., Wattiaux, R., and Appelmans, F. (1955) Tissue fractionation studies. 6. Intracellular distribution patterns of enzymes in rat-liver tissue. *Biochem. J.* **60,** 604–617
59. Nesvizhskii, A. I., Keller, A., Kolker, E., and Aebersold, R. (2003) A statistical model for identifying proteins by tandem mass spectrometry. *Anal. Chem.* **75,** 4646–4658
60. Monroe, M. E., Shaw, J. L., Daly, D. S., Adkins, J. N., and Smith, R. D. (2008) MASIC: a software program for fast quantitation and flexible visualization of chromatographic profiles from detected LC-MS(/MS) features. *Comput. Biol. Chem.* **32,** 215–217
61. Clough, T., Thaminy, S., Ragg, S., Aebersold, R., and Vitek, O. (2012) Statistical protein quantification and significance analysis in label-free LC-MS experiments with complex designs. *BMC Bioinformatics* 10.1186/1471-2105-13-S16-S6

Downloaded from http://www.jbc.org/ at INSERM on August 2, 2017

International Journal of
Molecular Sciences

MDPI

Article

Predictive Structure and Topology of Peroxisomal ATP-Binding Cassette (ABC) Transporters

Pierre Andreoletti *, Quentin Raas, Catherine Gondcaille, Mustapha Cherkaoui-Malki, Doriane Trompier and Stéphane Savary *

Laboratoire Bio-PeroxIL EA7270, University of Bourgogne Franche-Comté, 6 Bd Gabriel, 21000 Dijon, France; Quentin.Raas@u-bourgogne.fr (Q.R.); Catherine.Gondcaille@u-bourgogne.fr (C.G.); mustapha.cherkaoui-malki@u-bourgogne.fr (M.C.-M.); doriane.trompier@u-bourgogne.fr (D.T.)

* Correspondence: pierre.andreoletti@u-bourgogne.fr (P.A.); stsavary@u-bourgogne.fr (S.S.); Tel.: +33-380-39-62-73 (S.S.)

Received: 26 June 2017; Accepted: 19 July 2017; Published: 22 July 2017

Abstract: The peroxisomal ATP-binding Cassette (ABC) transporters, which are called ABCD1, ABCD2 and ABCD3, are transmembrane proteins involved in the transport of various lipids that allow their degradation inside the organelle. Defective ABCD1 leads to the accumulation of very long-chain fatty acids and is associated with a complex and severe neurodegenerative disorder called X-linked adrenoleukodystrophy (X-ALD). Although the nucleotide-binding domain is highly conserved and characterized within the ABC transporters family, solid data are missing for the transmembrane domain (TMD) of ABCD proteins. The lack of a clear consensus on the secondary and tertiary structure of the TMDs weakens any structure-function hypothesis based on the very diverse ABCD1 mutations found in X-ALD patients. Therefore, we first reinvestigated thoroughly the structure-function data available and performed refined alignments of ABCD protein sequences. Based on the 2.85 Å resolution crystal structure of the mitochondrial ABC transporter ABCB10, here we propose a structural model of peroxisomal ABCD proteins that specifies the position of the transmembrane and coupling helices, and highlight functional motifs and putative important amino acid residues.

Keywords: ATP-binding Cassette (ABC) transporters; peroxisome; fatty acid transport; topology; predictive structure; adrenoleukodystrophy

1. Introduction

ATP-Binding Cassette (ABC) transporters belong to a superfamily conserved from bacteria to humans [1]. With the exception of a few members, ABC transporters are transmembrane proteins whose minimal functional unit is predicted to contain two nucleotide-binding domains (NBDs) and two transmembrane domains (TMDs) [2]. In bacteria, each domain can result from the expression of independent genes and bind together post-translationally to form a functional ABC transporter as in the case of the *E. coli* nickel transporter [3]. There are also examples of fusion proteins containing either two NBDs (RbsA, the *E. coli* ribose transporter) or two TMDs (FhuB, the *E. coli* Vitamin B_{12} transporter) or fusion proteins composed of one NBD and one TMD, which are called half-transporters (MsbA, the *E. coli* lipid flippase for instance) [3]. In eukaryotes, homodimers (for instance ABCG2, a transporter involved in multidrug resistance) and heterodimers (for instance ABCB2/ABCB3—Tap1/Tap2, the transporter associated with antigen presentation) of half-transporters coexist with full-length ABC transporters, i.e., proteins composed of the four domains covalently linked (TMD-NBD-TMD-NBD) such as ABCB1 (P-glycoprotein), which is associated with multidrug resistance. Most of the ABC transporters or half-transporters present their TMD on their N-terminal end but the reverse domain organization also exists as in the ABCG subfamily. Auxiliary proteins participating in substrate

binding, membrane anchoring or regulation may complete this common architecture in some cases. The sequence of the NBDs is very well conserved among the superfamily, in particular for the Walker A and B motifs and the ABC transporter signature (ATS) motifs which are all required for binding and hydrolysis of ATP. In contrast, a weak conservation exists among the TMDs. Classical TMDs comprise six transmembrane α-helices (TMHs) and a few conserved motifs such as the EAA motif present in intracellular loops (ICLs), which are mainly involved in the crosstalk between the TMDs and the NBDs. These interactions result in the tight coupling between substrate transport and ATP hydrolysis.

In mammals, based on structure and sequence homology, seven subfamilies from A to G have been distinguished. Peroxisomal ABC transporters belong to the subfamily D and correspond to three proteins called ABCD1 (ALDP) [4], ABCD2 (ALDRP) [5] and ABCD3 (PMP70) [6]. A fourth member of the subfamily D, ABCD4 (PMP69), originally identified as peroxisomal, is actually located into lysosomes and endoplasmic reticulum, the protein lacking a peroxisomal targeting signal [7–9]. Structurally, the ABCD proteins are half-transporters and must therefore dimerize to form a functional ABC transporter. Several experimental evidences argue for the existence of functional heterodimers [10,11]. However, homodimers seem to prevail in vivo [12,13]. We recently demonstrated that the dimers are mainly present within tetrameric or oligomeric structure [14]. A tetrameric assembly could be homomeric but could also consist in the assembly of two different homodimers. Among the numerous studies related to ABCD proteins, much focused on ABCD1, which is associated with the most frequent peroxisomal disorder called X-linked adrenoleukodystrophy (X-ALD) [15]. This complex neurodegenerative disorder is biochemically associated with increased levels of very long-chain fatty acids (VLCFA). X-ALD patients present a huge clinical variability both in the age of onset and in symptoms. There are two main forms: the childhood cerebral ALD associated with inflammatory demyelination of the central nervous system and the adult form called adrenomyeloneuropathy, characterized by a non-inflammatory slowly progressive demyelination affecting the spinal cord and peripheral nerves. Besides, there are few structure-function data as compared with the numerous studies published on the most famous ABC transporters (i.e., P-glycoprotein [16,17] or CFTR [18]) which benefit from crystallized proteins, site-directed mutagenesis studies and substrates allowing easy characterization of binding sites and translocation processes. Direct functional reconstitution of transport for peroxisomal ABC transporters remains a big challenge. However, recent studies, particularly in yeast as well as in animal, in plant or in cell models concluded to the participation of the ABCD1–3 transporters in the transport of various acyl-CoA esters across the peroxisomal membrane to allow their β-oxidation [19–26]. Accordingly, ABCD1 was suggested to transport preferentially saturated and monounsaturated CoA esters of VLCFA. ABCD2 presents overlapping substrate specificity with ABCD1 and was suggested to transport the same substrates probably with a lower affinity and/or efficiency. Nonetheless, ABCD2 is thought to be specifically dedicated to polyunsaturated fatty acids. Finally, ABCD3 was associated with transport of dicarboxylic acids, branched-chain fatty acids and bile acid precursors. In mammals, peroxisomal β-oxidation starts with the activation of fatty acid to its activated Co-enzyme A thioester by an acyl-CoA synthetase associated to the cytosolic side of the peroxisomal membrane. Protease protection assays have suggested that acyl-CoA esters but not free fatty acids bind to the TMD [27]. Recent works have suggested that the translocation of the acyl-CoA esters is tightly linked to an enzymatic process of CoA-ester hydrolysis [19,28,29]. The peroxisomal ABC transporters would release a free fatty acid that should be re-esterified inside the peroxisome before its catabolic processing. Once translocated inside the peroxisome, substrates could be re-esterified thanks to a specific synthetase (ACSL4, SLC27A2, and SLC27A4) [30] and directly delivered to specific Acyl-CoA oxidases (ACOX1 for VLCFA [31] or BrCACOX for branched-chain fatty acids and bile acid intermediates [32]). If true, it remains to identify motifs in charge of the protein-protein interactions.

Actually, many questions about the transport mechanism, the dimerization and oligomerization status, the substrate specificity and the substrate-binding pockets, or the peroxisomal targeting, remain to be answered. The lack of a clear consensus on the secondary and tertiary structure of ABCD transporters hampers efforts of scientists in the field and renders difficult any conceptualization of structure-function hypotheses based on mutations in patients or in site-directed mutations leading to protein truncations or modifications. As an example, UniProtKB annotations indicate 4 to 5 TMHs for ABCD proteins while most papers concerning these proteins talk about 6 transmembrane segments, the position of each α-helix differing from a source to another [33–37]. While a quasi-consensus seems to emerge for the position of TMH 1, 2, 4 and 5, the TMH 3 and 6 are either non-predicted or positioned differently depending on source. Altogether, this prompted us to reinvestigate the structure-function data available in the literature of peroxisomal ABC transporters in light of the latest knowledge of ABCD sequences in various species and of structural information obtained from crystallographic studies of mammalian ABC transporters. Using refined alignments of ABCD protein sequences and homology modeling based on the 2.85 Å resolution crystal structure of mitochondrial ABC transporter ABCB10, we propose a structural model of ABCD1 which specifies the position of the transmembrane and coupling helices, and highlights new functional putative motifs of the TMD.

2. Results

2.1. Position of Transmembrane α Helices

As underlined before, many contradictory data are available on the position of the TMHs and various conserved motifs found of the ABCD proteins. Therefore, we first analyzed and compared the results of secondary structure prediction programs for ABCD1, ABCD2 and ABCD3 sequences. Accurate prediction of membrane spanning regions remains a challenge. Among the common tools available for topology prediction, TMHMM, MEMSAT, and SPLIT4 have been considered as the most robust programs but other programs such as TMpred, TOPCONS, SABLE (MINNOU server) or HMMTOP should also be considered [38,39]. The results obtained after analyses by these predictive programs are shown in Figure 1. Most of the programs display only four putative TMHs if we exclude a putative helix located close to the N-terminal end of the proteins, the helix known as the membrane peroxisomal targeting signal (mPTS) and helices found in the NBD. MemSat [40], used in the CCTOP and PSIPRED servers, as well as MINNOU [41], were able to predict 5 to 6 TMHs. MemBrain [42], a tool with improved ability in correctly identifying the ends of TMHs and which is also used in the CCTOP server, detected six to seven TMHs. While a consensus emerged for the positions of the TMH 1, 2, 4 and 5, the TMH 3 and 6 were poorly predicted. Moreover, when predicted, the different programs did not converge to a unique positioning of the TMH 3 and TMH 6.

To further progress in the accurate determination of the TMHs, we performed hydrophobic cluster analysis (DRAWHCA) [43]. DRAWHCA results in a two-dimensional representation of the protein sequence, in which hydrophobic amino acids congregate into clusters, mainly corresponding to regular secondary structures [44]. A careful examination of the regions previously suspected to correspond to TMHs confirmed the positions of TMH 3 and permitted to refine the ends of the TMH 6. To finalize this analysis and to obtain the most accurate annotation of TMHs, we compared the results of various programs dedicated to membrane protein alignment (MAFFT, KALIGN, AlignMe) with local alignment of the predicted TMHs. Using Aliview, an editing software of multiple sequence alignment (MSA) based on Muscle [45], we finally obtained a refined alignment of human, mouse and rat sequences of ABCB10, ABCD1, ABCD2 and ABCD3 (Figure 2) and deduced the very likely positions of the TMHs (Table 1). Conserved residues located between the TMHs are known features of ABC transporters and emerged from this alignment reinforcing its validity. The analysis of the structural alignment computed by Espript server [46] also revealed conserved coupling helices extending the helical structure of TMHs in ABCD proteins in agreement with other ABC transporters.

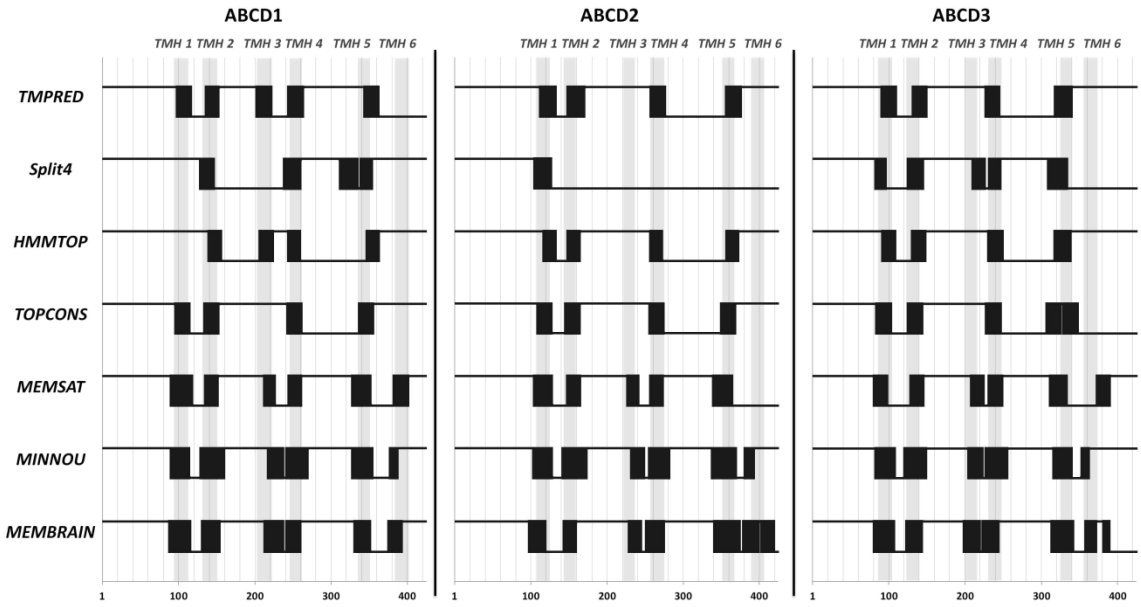


Figure 1. Predictive positions of the transmembrane helices (TMH) of human peroxisomal ATP-binding Cassette (ABC) transporters using various secondary structure prediction programs. Black boxes correspond to the predicted TMHs from their amino acid sequences (aa^1–aa^{425}) for each program. The grey bands correspond to the deduced position of TMHs from the refined analysis (see above).

Table 1. Deduced positions of the transmembrane helices in human peroxisomal ATP-binding Cassette transporters

Transporter	TMH 1	TMH 2	TMH 3	TMH 4	TMH 5	TMH 6
ABCD1	93–112	130–147	208–224	244–262	338–355	384–403
ABCD2	106–125	143–160	221–237	257–274	351–368	388–407
ABCD3	85–104	122–139	200–216	231–248	324–341	356–375

2.2. Structural Model of ABCD1 Based on ABCB10 Homology

Modelization was focused on ABCD1 only because ABCD1 is considered as the prototype of the ABCD subfamily. Moreover, ABCD1 is associated with the most frequent peroxisomal disorder (X-ALD) and many known mutations could be linked to stability, dimerization or functional concerns. In mammals, the mouse ABCB1 [17,47], as well as the human ABCC7 [18] and ABCB10 [48] proteins have been crystallized in different states. These structural data provide a reference for other ABC transporters. Among these proteins, ABCB10 displays the better percentage of identity (18%) and similarity (30%) with ABCD1. Moreover, ABCB10, like ABCD1, is a half-transporter with intracellular localization (the inner membrane of the mitochondria) and was therefore chosen as a template for structural modelization. A 2.85 Å resolution crystal structure has been determined in the presence of a non-hydrolysable analog of ATP and demonstrated an open-inwards conformation. We used the rod form of this crystal structure (PDB ID 4AYX) as a template to obtain a structural model of human ABCD1 using the Swiss-Model server (Figure 3). The structural model was constructed from the ABCD1/ABCB10 pairwise alignment presented in Appendix A (Figure A1). In order to improve the quality of the alignment, the N-terminal part of each sequence containing specific subcellular targeting signals was deleted. Gaps, mainly located in the loops linking helices, were inserted to fit with the results of the predictive secondary structures for each protein. If low confidence remains in the regions corresponding to these gaps, the overall model resulted in a reliable predictive structure, particularly in TMHs, NBDs and contact regions between ICLs and TMDs.

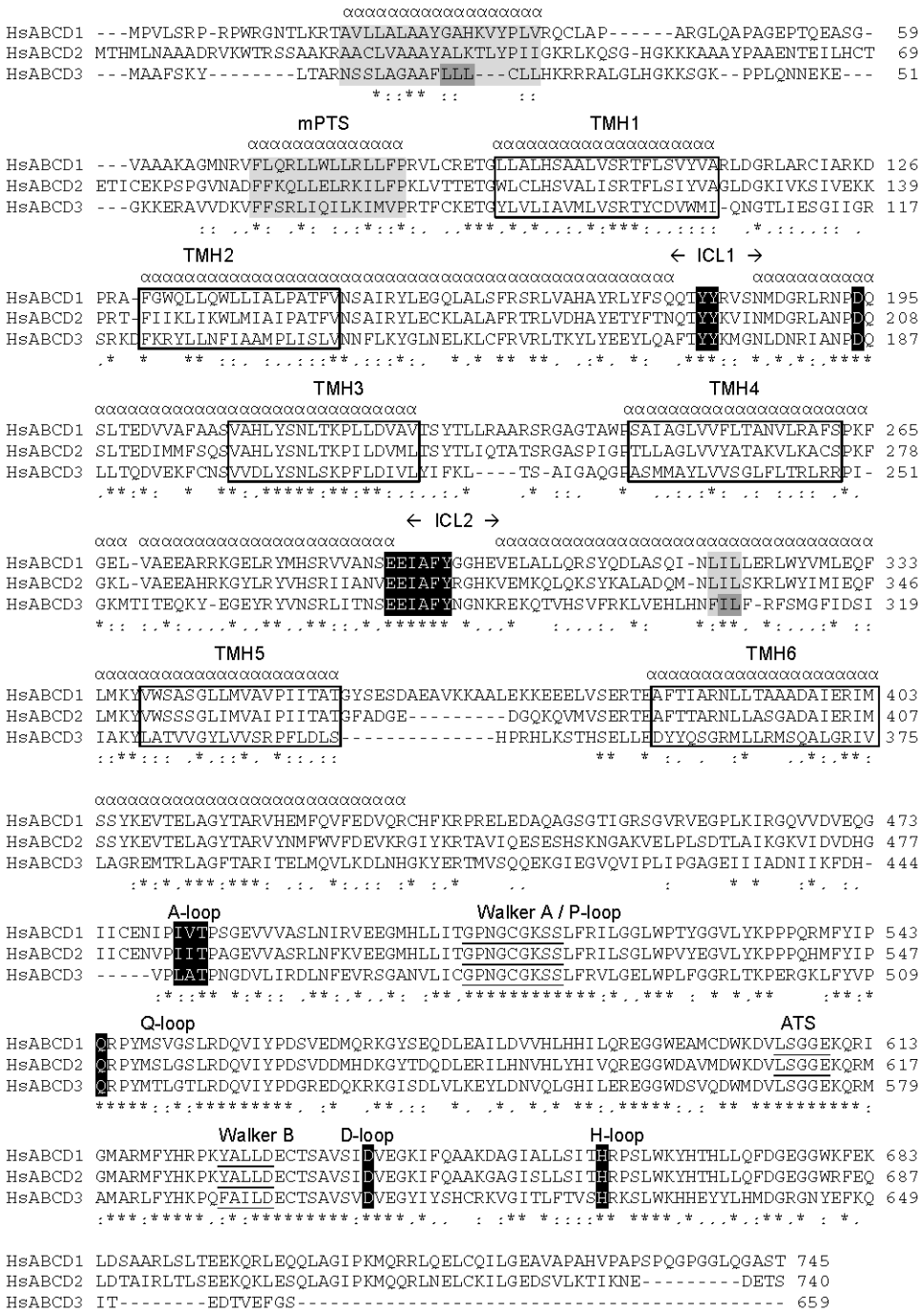


Figure 2. Sequence alignment of the human peroxisomal ABC transporters. Transmembrane helices (TMHs) are boxed. The membrane peroxisomal targeting signal (mPTS) in light grey is anotated. Hydrophobic clusters (containing LLL and LL motifs, dark grey) and supposed to participate in peroxisomal targeting are also in light grey. Conserved residues ("*" for identity; ":" for strong similarity; "." for weak similarity) and helical structure ("α") within the TMD are indicated. Intracellular loops (ICLs) 1 and 2 are indicated. Walker A and B motifs as well as the ABC-transporter signature (ATS) of the NBD are underlined. Conserved residues discussed in the text and suspected to participate in the NBD/TMD crosstalk are black boxed.

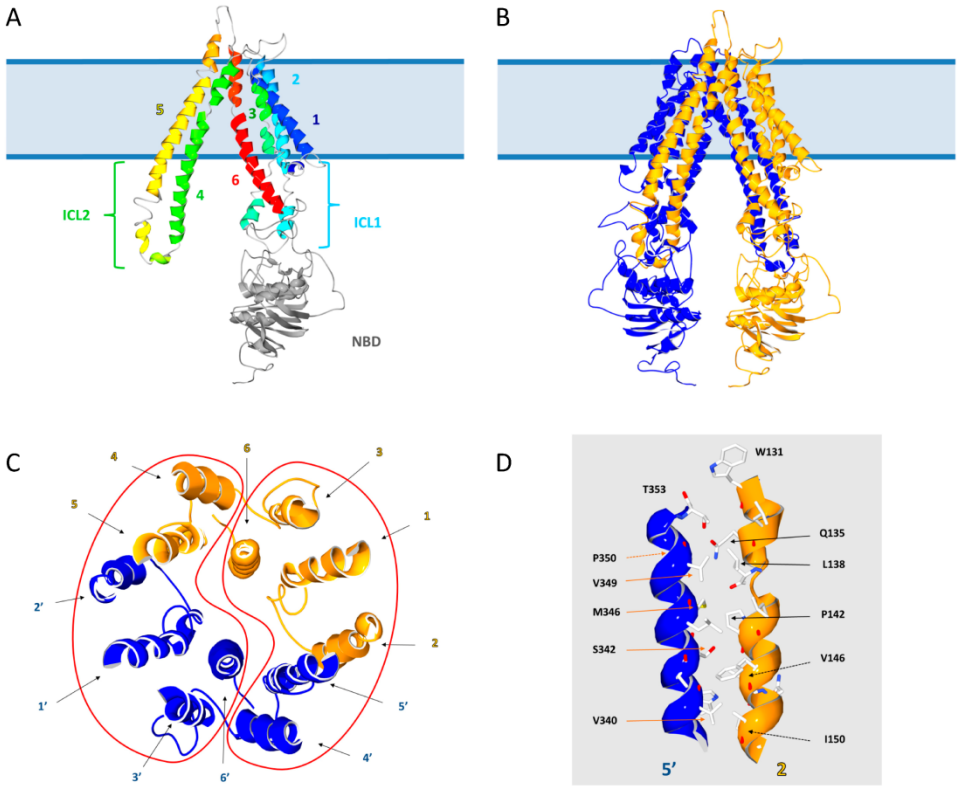


Figure 3. Structural model of human ABCD1. (**A**) Ribbon representation of the ABCD1 monomer. TMD helices are numbered from 1 to 6 and rainbow colored from dark blue to red. NBD is in light grey; (**B**) Ribbon representation of the ABCD1 homodimer with the two subunits respectively colored in dark blue and yellow; (**C**) Cytoplasmic view of a 32 Å cross-section of the ABCD1 TMD (with the two subunits respectively colored in dark blue and yellow) showing the TMHs organization. Transmembrane helices of each subunit are numbered from 1 to 6 for one monomer (yellow) and from 1′ to 6′ for the second monomer (dark blue). Red lines contour the two putative "supra-domains" at the interface of which the substrate could access the center of the TMD; (**D**) Ribbon representation of hydrophobic interactions between TMH 2 (in yellow) and TMH 5′ (in dark blue), sidechains of interacting amino acids are shown in CPK colored sticks. The PDB file of the model and the alignment of ABCD1 with ABCB10 are available in supplementary material and in Appendix A (Figure A1) respectively.

3. Discussion

Several members of the ABCD subfamily have been reported (or are predicted to be present) in a large variety of organisms and permitted to obtain a phylogenetic tree from orthologous sequences of peroxisomal ABC transporters of vertebrates (mammals, birds, fishes), insects, protozoa and nematodes, yeasts and plants [15]. These sequences were aligned and compared to highlight the conserved motifs of the TMDs and NBDs [15]. In the light of the readjusted positions of the TMHs and of the structural model presented here, the likely participation of some conserved residues in dimerization, peroxisomal targeting, and transport mechanism, is discussed below.

3.1. The Membrane Peroxisome Targeting Signal and the PEX19 Binding Site

From the N-terminal end of HsABCD1, the first conserved motif is located 10 amino acids before TMH 1 and corresponds to the sequence FLQRLLWLLRLLFP (71–84). The underlined residues display the highest level of conservation among the ABCD subfamily. Their conservation level reaches almost 100% if similarity is taken into account ([FAVL], [RK][LVI], [PAS]) This motif has been described as the mPTS and must be structurally followed by TMH 1 and TMH 2 to be fully effective [36]. Various

truncations or deletion mutants contributed to demonstrate the direct involvement of this motif in peroxisomal targeting of ABCD1. Studies of ABCD3 led to the same conclusions [49]. Peroxisomal targeting of ABCD3 seems to depend on the presence of this motif, the TMH 1 and 2, and also on several residues located in the first 60 amino acids (LLL, 21–23) and near the TMH 5 (IL 307–308) (Figure 2) [35,50]. Interestingly, the LLL motif likely belongs to a hydrophobic helix, which is quite well conserved in other ABCD transporters (20–36 in ABCD1). Moreover, the IL motif near the TMH 5 belongs to a consensus sequence composed of three hydrophobic residues [FL]-I-[FL] (LIL in ABCD1). The conservation of these hydrophobic clusters suggests functional conservation among peroxisomal ABC transporters. Peroxisomal biogenesis factor 19 (Pex19) has been proposed to act as a chaperone for peroxisomal membrane protein, which is necessary for their integration in the peroxisomal membrane [51–53]. The mPTS motif was proposed to directly interact with PEX19 [54] but other studies concluded that the mPTS motif is not essential for the interaction [49]. However, interaction of ABCD3 with Pex19 would not only depend on the mPTS motif but also on the LLL and IL motifs [35,50].

3.2. *The Intracellular Loops*

From the structural data available on the ABC family, TMHs are prolonged by cytosolic amphipathic helices [55,56]. By analogy with prokaryotic ABC importers, two cytosolic helices connected by a loop form an intracellular loop (ICL), and participate in the crosstalk between the TMDs and the NBDs. In ABCD1, the putative ICL1 (between TMH 2 and TMH 3) covers 56 residues and shows very well conserved residues and motifs: Y153, LALSFRSRL (158–166), Y174, YY (180–181), RLRNPDQSLTED (189–200) (Figure 2). The role of these amino acids in peroxisomal ABC transporters is currently unknown but mutations of L158, L160, R163, R165, L166, Y181, R189, L190, P193, D194, Q195, L197, T198, E199, D200 have been described in X-ALD patients, supporting a functional key role (http://www.x-ald.nl/) [33]. Among the conserved residues of the ICL1, R163, R189, L190 and D194 are strikingly conserved in other ABC subfamilies. They correspond to R248, R274, L275, and D278 in human ABCB10 and to R148, R174, L175, and D178 in human ABCB1 ,respectively. In ABCB1, the segment between R148 and D178 is thought to play a key functional role [57]. R148 and D178 are suggested to take part in the structural stabilization of the protein and the transport mechanism. R174 would be involved in the interactions with the ICL2. F163 and D164 would interact with the intracellular helix extending the TMH 6. W162 and L171 would interact with the NBD, in particular with the Q loop. The YY 180–181 motif of ABCD1 could correspond to the aromatic residue doublet (FF in ABCB10 or WF in ABCB1) proposed to be in close contact with the NBD in ABCB1 [58]. In the closed conformation of ABCB1, the D177 residue located in the coupling helix before TMH 3 was predicted to be very close (4.4 Å) to the N820 residue of the coupling helix before TMH 9 [59]. D178 of ABCB1 is aligned with D194 in ABCD1. In the ABCD1 structural model, D194 is orientated towards the center of the TMD and was found to form a hydrogen bond with R189. Substitutions of D194 by either H or N have been described in X-ALD patient (http://www.x-ald.nl/). The ABCD1 protein bearing this D194H mutation was correctly targeted into the peroxisomal membrane. However, such mutated ABCD1 protein was shown to be non-functional and triggered a dominant negative effect on WT ABCD1 protein in situation of coexpression assay [60]. Interestingly, the equivalent mutation in ABCD2 D207H produced similar results [11].

The ICL2 (intracellular loop between TMH 4 and TMH 5 containing the EAA motif) of ABCD1 contains highly conserved amino acids as well: G266, G277, RYMHSRVVANSEEIAFYGGHEVE (280–302), Y310, L313, IL 320-321, R324 (Figure 2). Mutations have been identified for almost all these conserved positions (G266, G277, R280, H283, S284, R285, E291, E292, A294, F295, Y296, G298, E302, L313). Interestingly, the substitution G266R is one the most frequent mutations found in X-ALD patients (http://www.x-ald.nl/).

As shown in Figure 4, a zoom in the ABCB10 structural homology model of ABCD1 permitted to precise the putative interactions between the ICLs and the NBDs. The ICL1 and the NBD of one

ABCD1 subunit (respectively in dark and light blue) interact on each side of the ICL2 of the second subunit. In this model hydrophobic interactions and hydrogen bonds link the Q-loop of the NDB to one side of the ICL2 (between Y296 and Y547/M548, and between I293 and M548). The other side of the ICL2 makes close contacts with the ICL1: hydrophobic interactions between Y174 and a cluster composed of V287, L303, and L306 (buried in the inner part of the ICL2, not shown), hydrogen bonds and hydrophobic interactions between Y181 and S184 and E292. A hydrophobic interaction links the ICL1 and the NDB A loop (respectively Q177 and P484). Finally, a clear hydrophobic interaction between F295 and W524 participates in the interaction between ICL2 and the NBD P-loop, respectively.

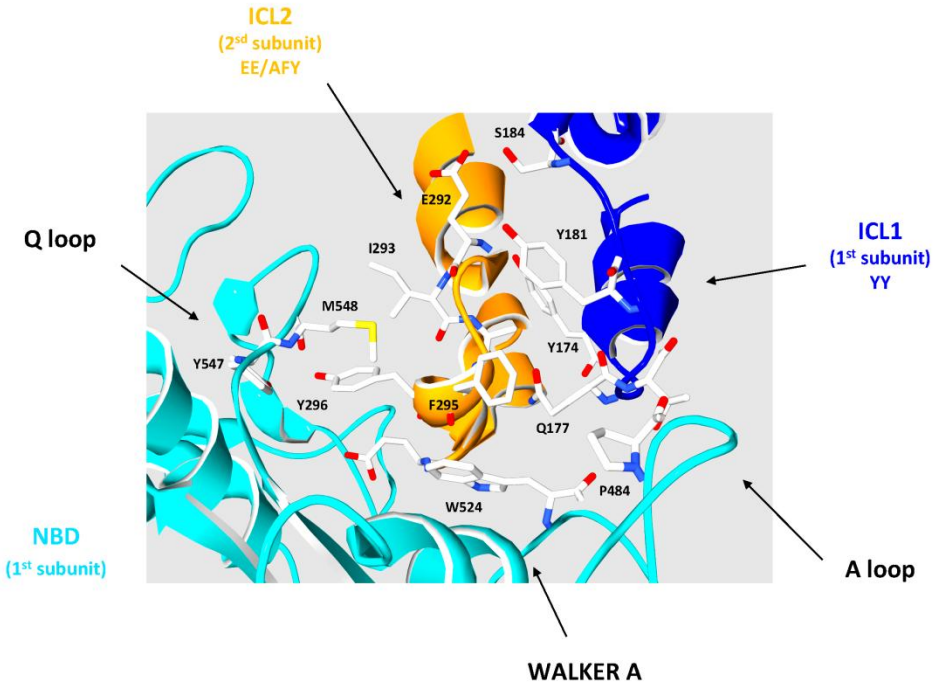


Figure 4. Interactions between intracellular loops (ICLs) and nucleotide-binding domains (NBDs) in the ABCD1 model. The picture shows a zoom on the interaction between the 1st subunit ICL1 (ribbon in dark blue) and the NBD (ribbon in light blue) and ICL2 (ribbon in orange) of the 2nd subunit. Amino acids involved in the interactions are shown in stick representation CPK colored. A loop, Walker A and Q loop of the NBD are arrowed.

As underlined by Beek et al. [61] and contrarily to importers, ABC exporters (such as ABCD1) contain a second coupling helix located in ICL1 between TMH 2 and TMH 3. As said above, the role of these helices is to transduce signals from TMD to NBD to allow ATP binding and hydrolysis and from NBD to TMD to carry out the substrate transport through conformational changes. So, the existence of these two coupling helices, from two different subunits, involving four TMHs of the TMD (TMHs 2 to 5), with strong interaction between them and with the NDB, suggests the need for a global conformational modification to perform the substrate translocation.

3.3. Motifs Putatively Involved in Substrate Specificity

The role of peroxisomal ABC transporters has been ascribed to the transport of different substrates: acyl-CoA esters of saturated and monounsaturated VLCFA for ABCD1, polyunsaturated LCFA and VLCFA for ABCD2, branched-chain FA, dicarboxylic FA and bile acid precursors for ABCD3. Previous studies on ABC transporters involved in multidrug resistance [62] revealed that the substrate preference of peroxisomal ABC transporters depends on binding sites located in the TMHs. The poor sequence conservation in the TMDs is in agreement with the diversity of lipids displaying various sizes, physicochemical and biophysical properties that have to interact with these ABC transporters.

However, a partial functional redundancy between ABCD1, ABCD2 and ABCD3 has been documented and is probably associated with some conserved residues of the TMHs, particularly in the TMH 1, 2 and 3 (Figure 2). The lack of adequate assays to reconstitute substrate transport by ABCD transporters renders difficult the identification of substrate binding pockets and interaction motifs within the TMHs. Since the substrates are predicted to contact the TMHs through the membrane interface, they must pass between TMHs to reach the core of the TMD. Our model presents strong hydrophobic interactions between helices 2 and 5′ (and 2′ and 5) of the two monomers (Figure 3D). The access to the inner part of the TMD through the monomers interface could thus be energetically difficult. It is to note that interactions between TMH 3 and TMH 4, and between TMH 4 and TMH 6 appear less tight and could be a way for substrates to enter the TMD (Figure 3C). Consequently, the TMD could be divided in two "supra-domains" containing each six TMHs: one supra-domain with TMHs 1′, 2′, 3′, 4, 5 and 6′ and the second supra-domain with TMHs 1, 2, 3, 4′, 5′ and 6 (contoured by a red line in Figure 3C), the substrate accessing the center of TMD through the interface of these two "supra-domains".

In this quest towards the identification of a substrate-binding site, the hydrophobic nature of substrates should be taken into account. Protein-protein interactions are proposed to play an important role in the transport mechanism, first to permit the substrate to reach the peroxisomal membrane and then to be released inside the peroxisome. This would suppose protein-protein interactions involving transmembrane helices, cytosolic loops as well as peroxisomal internal loops and a tight incidence between these interactions and the substrate specificity. Specific fatty acid binding proteins and synthetases have been proposed to bind and activate fatty acids and release the substrates, i.e., acyl-CoAs, to the ABC transporters [30]. These substrate modifications could be tightly associated with the transport mechanism [19,28,29]. If true, protein-protein interactions between these accessory proteins and the ABC transporters are required. There are 3 loops proposed to be located in the lumen of the peroxisome (Figures 2 and 3A). The loop between TMH 5 and TMH 6 being the longest one and corresponding to one of the less conserved zones of the TMD, both in size and in sequence, we postulate a possible role in such interactions. Interestingly, missense mutations in X-ALD patients have been described in this region but they have unfortunately not been studied in more detail.

3.4. Motifs Putatively Involved in Dimerization

Dimerization is considered as an obligatory step for stability and function of peroxisomal ABC transporters. If we recently evidenced that these proteins form mainly tetramers [14], there are currently no evident motifs responsible for such interactions. The amino acids responsible for the interactions within a dimer remain to be characterized too. Dimerization probably depends on residues belonging to the NBD [63,64]. However, as said before, our structural model highlights a close proximity between the TMH 2 of the first subunit and the TMH 5 of the second one (TMH 5′, Figure 3C), proximity that is prolonged through the coupling helices. A zoom in that region suggests the existence of multiple hydrophobic interactions involving W131/T353, Q135/P350, L138/V349, P142/M346, V146/S342, I150/V340. Further studies will be needed to confirm such interactions.

4. Methods

4.1. Prediction of Transmembrane Helices

Several programs were used to predict the TMHs of peroxisomal ABC transporters: TMpred, SPLIT4, HMMTOP, TOPCONS, MEMSAT, MINNOU and MemBrain [38,39]. Hydrophobic cluster analysis (DRAWHCA) was used as a complementary analysis [43].

4.2. Alignment

Aliview, an editing software of alignment based on Muscle algorithm [45] was used to perform MSA of peroxisomal ABC transporter sequences. Alignment of human ABCD1 with human ABCB10 was performed in three steps. First, the human, mouse and rat sequences of ABCB10, ABCD1, ABCD2 and ABCD3 were aligned. Then, the known positions of the TMHs of ABCB10 were used as anchors to perform local alignment with the putative TMHs of the ABCD proteins. Finally, rodent sequences were removed as well as ABCD2 and ABCD3 sequences in order to obtain an ACBD1/ABCB10 pairwise alignment suitable for homology modeling.

4.3. Homology Modeling

Homology modeling was computed using the "target-template alignment" mode of the SWISS-MODEL [65–67]. The optimized ABCD1/ABCB10 pairwise alignment (Figure A1) computed was used as template to direct the homology modeling process against the 2.85 Å resolution rod form structure of ABCB10 (PDB ID 4AYX). A sequence identity of 17.7% for the alignment was sufficient to Swiss-Model server to successfully compute a homodimeric model for ABCB1 (pdb file in Supplementary Data).

5. Conclusions

In conclusion, the present study provides a refined TMH annotation and a structural model of ABCD1, which might help structure-function investigations on the impact of ABCD1 mutations associated with X-ALD. Regarding the sequence homology between ABCD1 and ABCD2 or ABCD3, the hypotheses raised by this study should apply at the other peroxisomal ABC transporters. However, given the limitations of the structural model (low similarity between ABCB10 and ABCD1), further structural data will be required to achieve better reliability and complete elucidation will only be obtained after protein purification and crystallographic analysis of peroxisomal ABC transporters.

Supplementary Materials: Supplementary materials can be found at www.mdpi.com/1422-0067/18/7/1593/s1.

Acknowledgments: This work was supported by the French Ministry of Education and Research.

Author Contributions: Pierre Andreoletti and Stéphane Savary performed sequence analyses and modelization, analyzed the data and wrote the manuscript. Doriane Trompier, Quentin Raas, Catherine Gondcaille and Mustapha Cherkaoui-Malki, contributed to the writing of the paper and to interpretation of the data about conserved residues. Stéphane Savary conceived and supervised the study.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

Abbreviations

ABC	ATP-binding Cassette
ATS	ABC Transporter Signature
ICL	IntraCellular Loop
FA	Fatty Acid
MSA	Multiple Sequence Alignment
NBD	Nucleotide-binding Domain
TMD	TransMembrane Domain
TMH	TransMembrane Helix
VLCFA	Very Long-Chain Fatty Acid
X-ALD	X-linked Adrenoleukodystrophy

Appendix A

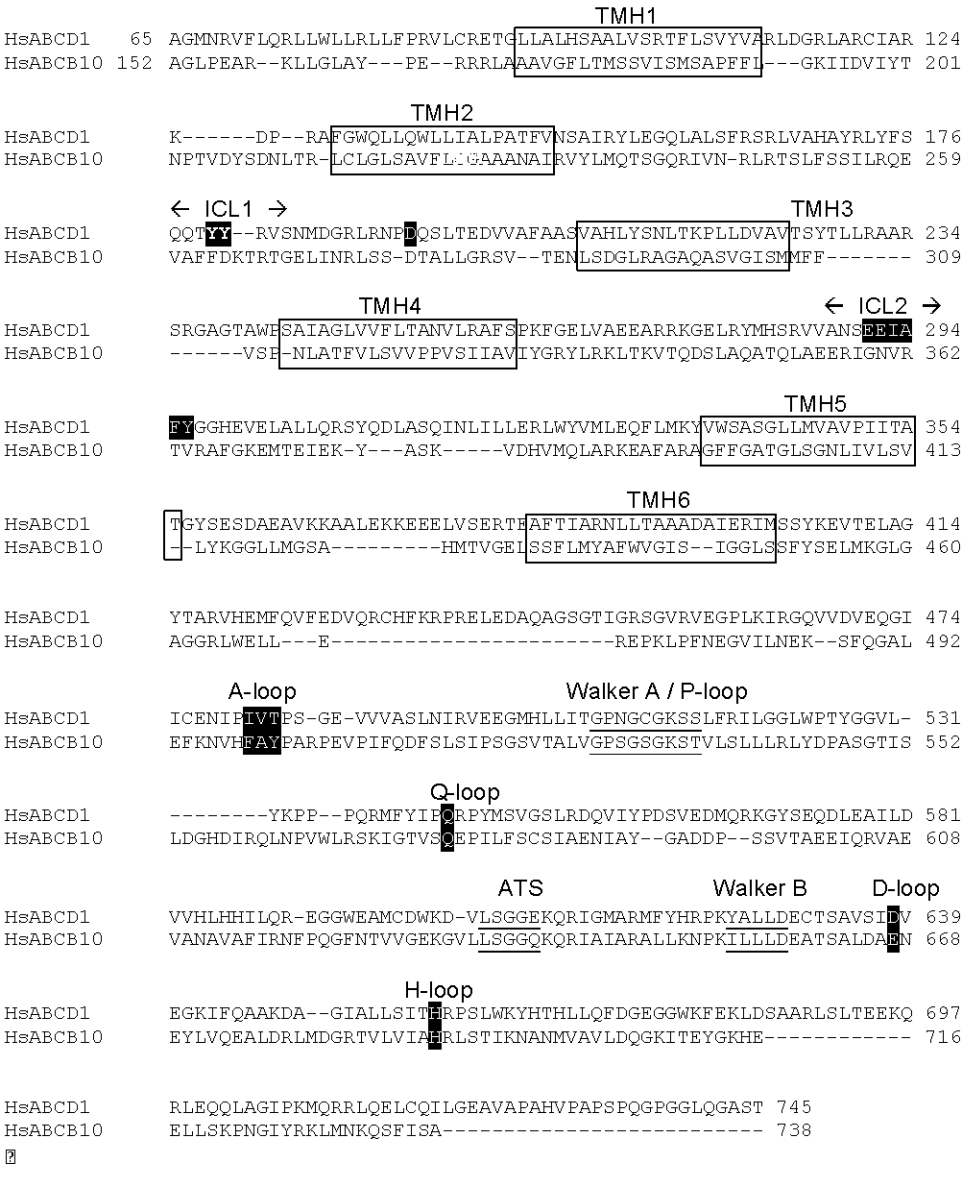


Figure A1. Sequence alignment of the human peroxisomal ABC transporter ABCD1 and the mitochondrial ABC transporter ABCB10. Transmembrane helices (TMHs) are boxed. Intracellular loops (ICLs) 1 and 2 are indicated. Walker A and B motifs as well as the ABC-transporter signature (ATS) of the NBD are underlined. Conserved residues discussed in the text and suspected to participate in the NBD/TMD crosstalk are black boxed.

References

1. Dean, M.; Annilo, T. Evolution of the ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily in vertebrates. *Annu. Rev. Genom. Hum. Genet.* **2005**, *6*, 123–142. [CrossRef] [PubMed]
2. Kos, V.; Ford, R.C. The ATP-binding cassette family: A structural perspective. *Cell. Mol. Life Sci.* **2009**, *66*, 3111–3126. [CrossRef] [PubMed]
3. Biemans-Oldehinkel, E.; Doeven, M.K.; Poolman, B. ABC transporter architecture and regulatory roles of accessory domains. *FEBS Lett.* **2006**, *580*, 1023–1035. [CrossRef] [PubMed]

4. Mosser, J.; Douar, A.M.; Sarde, C.O.; Kioschis, P.; Feil, R.; Moser, H.; Poustka, A.M.; Mandel, J.L.; Aubourg, P. Putative X-linked adrenoleukodystrophy gene shares unexpected homology with ABC transporters. *Nature* **1993**, *361*, 726–730. [CrossRef] [PubMed]
5. Lombard-Platet, G.; Savary, S.; Sarde, C.O.; Mandel, J.L.; Chimini, G. 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*, 1265–1269. [CrossRef] [PubMed]
6. Kamijo, K.; Taketani, S.; Yokota, S.; Osumi, T.; Hashimoto, T. The 70-kDa peroxisomal membrane protein is a member of the Mdr (P-glycoprotein)-related ATP-binding protein superfamily. *J. Biol. Chem.* **1990**, *265*, 4534–4540. [PubMed]
7. Kim, J.C.; Lee, N.C.; Hwu, P.W.; Chien, Y.H.; Fahiminiya, S.; Majewski, J.; Watkins, D.; Rosenblatt, D.S. Late onset of symptoms in an atypical patient with the cblJ inborn error of vitamin B_{12} metabolism: Diagnosis and novel mutation revealed by exome sequencing. *Mol. Genet. Metab.* **2012**, *107*, 664–668. [CrossRef] [PubMed]
8. Coelho, D.; Kim, J.C.; Miousse, I.R.; Fung, S.; Du Moulin, M.; Buers, I.; Suormala, T.; Burda, P.; Frapolli, M.; Stucki, M.; et al. Mutations in ABCD4 cause a new inborn error of vitamin B_{12} metabolism. *Nat. Genet.* **2012**, *44*, 1152–1155. [CrossRef] [PubMed]
9. Kashiwayama, Y.; Seki, M.; Yasui, A.; Murasaki, Y.; Morita, M.; Yamashita, Y.; Sakaguchi, M.; Tanaka, Y.; Imanaka, T. 70-kDa peroxisomal membrane protein related protein (P70R/ABCD4) localizes to endoplasmic reticulum not peroxisomes, and NH_2-terminal hydrophobic property determines the subcellular localization of ABC subfamily D proteins. *Exp. Cell Res.* **2009**, *315*, 190–205. [CrossRef] [PubMed]
10. Geillon, F.; Gondcaille, C.; Charbonnier, S.; van Roermund, C.W.; Lopez, T.E.; Dias, A.M.; Pais de Barros, J.P.; Arnould, C.; Wanders, R.J.; Trompier, D.; et al. Structure-Function Analysis of Peroxisomal ATP-binding Cassette Transporters Using Chimeric Dimers. *J. Biol. Chem.* **2014**, *289*, 24511–24520. [CrossRef] [PubMed]
11. Genin, E.C.; Geillon, F.; Gondcaille, C.; Athias, A.; Gambert, P.; Trompier, D.; Savary, S. Substrate specificity overlap and interaction between adrenoleukodystrophy protein (ALDP/ABCD1) and adrenoleukodystrophy-related protein (ALDRP/ABCD2). *J. Biol. Chem.* **2011**, *286*, 8075–8085. [CrossRef] [PubMed]
12. Van Roermund, C.W.; Visser, W.F.; Ijlst, L.; van Cruchten, A.; Boek, M.; Kulik, W.; Waterham, H.R.; Wanders, R.J. The human peroxisomal ABC half transporter ALDP functions as a homodimer and accepts acyl-CoA esters. *FASEB J.* **2008**, *22*, 4201–4208. [CrossRef] [PubMed]
13. Guimaraes, C.P.; Domingues, P.; Aubourg, P.; Fouquet, F.; Pujol, A.; Jimenez-Sanchez, G.; Sa-Miranda, C.; Azevedo, J.E. Mouse liver PMP70 and ALDP: Homomeric interactions prevail in vivo. *Biochim. Biophys. Acta-Mol. Basis Dis.* **2004**, *1689*, 235–423. [CrossRef] [PubMed]
14. Geillon, F.; Gondcaille, C.; Raas, Q.; Dias, A.M.M.; Pecqueur, D.; Truntzer, C.; Lucchi, G.; Ducoroy, P.; Falson, P.; Savary, S.; et al. Peroxisomal ATP-binding cassette transporters form mainly tetramers. *J. Biol. Chem.* **2017**, *292*, 6965–6977. [CrossRef] [PubMed]
15. Trompier, D.; Savary, S. *X-Linked Adrenoleukodystrophy*, 1st ed.; Morgan and Claypool Life Sciences Publishers: San Rafael, CA, USA, 2013; ISBN 9781615045549.
16. Ward, A.B.; Szewczyk, P.; Grimard, V.; Lee, C.W.; Martinez, L.; Doshi, R.; Caya, A.; Villaluz, M.; Pardon, E.; Cregger, C.; et al. Structures of P-glycoprotein reveal its conformational flexibility and an epitope on the nucleotide-binding domain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2013**, *110*, 13386–13391. [CrossRef] [PubMed]
17. Aller, S.G.; Yu, J.; Ward, A.; Weng, Y.; Chittaboina, S.; Zhuo, R.; Harrell, P.M.; Trinh, Y.T.; Zhang, Q.; Urbatsch, I.L.; et al. Structure of P-glycoprotein reveals a molecular basis for poly-specific drug binding. *Science* **2009**, *323*, 1718–1722. [CrossRef] [PubMed]
18. Liu, F.; Zhang, Z.; Csanady, L.; Gadsby, D.C.; Chen, J. Molecular structure of the human CFTR Ion channel. *Cell* **2017**, *169*, 85–95. [CrossRef] [PubMed]
19. Baker, A.; Carrier, D.J.; Schaedler, T.; Waterham, H.R.; van Roermund, C.W.; Theodoulou, F.L. Peroxisomal ABC transporters: Functions and mechanism. *Biochem. Soc. Trans.* **2015**, *43*, 959–965. [CrossRef] [PubMed]
20. Van Roermund, C.W.; Ijlst, L.; Wagemans, T.; Wanders, R.J.; Waterham, H.R. A role for the human peroxisomal half-transporter ABCD3 in the oxidation of dicarboxylic acids. *Biochim. Biophys. Acta Mol. Cell Biol. Lipids* **2013**, *1841*, 563–568. [CrossRef] [PubMed]
21. Van Roermund, C.W.; Visser, W.F.; Ijlst, L.; Waterham, H.R.; Wanders, R.J. Differential substrate specificities of human ABCD1 and ABCD2 in peroxisomal fatty acid beta-oxidation. *Biochim. Biophys. Acta Mol. Cell Biol. Lipids* **2010**, *1811*, 148–152. [CrossRef] [PubMed]

22. Liu, J.; Liang, S.; Liu, X.; Brown, J.A.; Newman, K.E.; Sunkara, M.; Morris, A.J.; Bhatnagar, S.; Li, X.; Pujol, A.; et al. The absence of ABCD2 sensitizes mice to disruptions in lipid metabolism by dietary erucic acid. *J. Lipid Res.* **2012**, *53*, 1071–1079. [CrossRef] [PubMed]
23. Fourcade, S.; Ruiz, M.; Camps, C.; Schluter, A.; Houten, S.M.; Mooyer, P.A.; Pampols, T.; Dacremont, G.; Wanders, R.J.; Giros, M.; et al. A key role for the peroxisomal ABCD2 transporter in fatty acid homeostasis. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **2009**, *296*, E211–E221. [CrossRef] [PubMed]
24. Pujol, A.; Ferrer, I.; Camps, C.; Metzger, E.; Hindelang, C.; Callizot, N.; Ruiz, M.; Pampols, T.; Giros, M.; Mandel, J.L. Functional overlap between ABCD1 (ALD) and ABCD2 (ALDR) transporters: A therapeutic target for X-adrenoleukodystrophy. *Hum. Mol. Genet.* **2004**, *13*, 2997–3006. [CrossRef] [PubMed]
25. Pujol, A.; Hindelang, C.; Callizot, N.; Bartsch, U.; Schachner, M.; Mandel, J.L. Late onset neurological phenotype of the X-ALD gene inactivation in mice: A mouse model for adrenomyeloneuropathy. *Hum. Mol. Genet.* **2002**, *11*, 499–505. [CrossRef] [PubMed]
26. Ferdinandusse, S.; Jimenez-Sanchez, G.; Koster, J.; Denis, S.; van Roermund, C.W.; Silva-Zolezzi, I.; Moser, A.B.; Visser, W.F.; Gulluoglu, M.; Durmaz, O.; et al. A novel bile acid biosynthesis defect due to a deficiency of peroxisomal ABCD3. *Hum. Mol. Genet.* **2015**, *24*, 361–730. [CrossRef] [PubMed]
27. Guimaraes, C.P.; Sa-Miranda, C.; Azevedo, J.E. Probing substrate-induced conformational alterations in adrenoleukodystrophy protein by proteolysis. *J. Hum. Genet.* **2005**, *50*, 99–105. [CrossRef] [PubMed]
28. De Marcos Lousa, C.; van Roermund, C.W.; Postis, V.L.; Dietrich, D.; Kerr, I.D.; Wanders, R.J.; Baldwin, S.A.; Baker, A.; Theodoulou, F.L. 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. USA* **2013**, *110*, 1279–1284. [CrossRef] [PubMed]
29. Theodoulou, F.L.; Carrier, D.J.; Schaedler, T.A.; Baldwin, S.A.; Baker, A. How to move an amphipathic molecule across a lipid bilayer: different mechanisms for different ABC transporters? *Biochem. Soc. Trans.* **2016**, *44*, 774–782. [CrossRef] [PubMed]
30. Watkins, P.A.; Ellis, J.M. Peroxisomal acyl-CoA synthetases. *Biochim. Biophys. Acta-Mol. Basis Dis.* **2012**, *1822*, 1411–1420. [CrossRef] [PubMed]
31. Casteels, M.; Schepers, L.; van Veldhoven, P.P.; Eyssen, H.J.; Mannaerts, G.P. Separate peroxisomal oxidases for fatty acyl-CoAs and trihydroxycoprostanoyl-CoA in human liver. *J. Lipid Res.* **1990**, *31*, 1865–1872. [PubMed]
32. Baumgart, E.; vanhooren, J.C.; Fransen, M.; Marynen, P.; Puype, M.; vandekerckhove, J.; Leunissen, J.A.; Fahimi, H.D.; Mannaerts, G.P.; van Veldhoven, P.P. Molecular characterization of the human peroxisomal branched-chain acyl-CoA oxidase: cDNA cloning, chromosomal assignment, tissue distribution, and evidence for the absence of the protein in Zellweger syndrome. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1996**, *93*, 13748–13753. [CrossRef] [PubMed]
33. Kemp, S.; Pujol, A.; Waterham, H.R.; van Geel, B.M.; Boehm, C.D.; Raymond, G.V.; Cutting, G.R.; Wanders, R.J.; Moser, H.W. ABCD1 mutations and the X-linked adrenoleukodystrophy mutation database: Role in diagnosis and clinical correlations. *Hum. Mutat.* **2001**, *18*, 499–515. [CrossRef] [PubMed]
34. Takahashi, N.; Morita, M.; Maeda, T.; Harayama, Y.; Shimozawa, N.; Suzuki, Y.; Furuya, H.; Sato, R.; Kashiwayama, Y.; Imanaka, T. Adrenoleukodystrophy: subcellular localization and degradation of adrenoleukodystrophy protein (ALDP/ABCD1) with naturally occurring missense mutations. *J. Neurochem.* **2007**, *101*, 1632–1643. [CrossRef] [PubMed]
35. Kashiwayama, Y.; Asahina, K.; Morita, M.; Imanaka, T. Hydrophobic regions adjacent to transmembrane domains 1 and 5 are important for the targeting of the 70-kDa peroxisomal membrane protein. *J. Biol. Chem.* **2007**, *282*, 33831–33844. [CrossRef] [PubMed]
36. Landgraf, P.; Mayerhofer, P.U.; Polanetz, R.; Roscher, A.A.; Holzinger, A. Targeting of the human adrenoleukodystrophy protein to the peroxisomal membrane by an internal region containing a highly conserved motif. *Eur. J. Cell Biol.* **2003**, *82*, 401–410. [CrossRef] [PubMed]
37. Shani, N.; Sapag, A.; Valle, D. Characterization and analysis of conserved motifs in a peroxisomal ATP-binding cassette transporter. *J. Biol. Chem.* **1996**, *271*, 8725–8730. [CrossRef] [PubMed]
38. Moller, S.; Croning, M.D.; Apweiler, R. Evaluation of methods for the prediction of membrane spanning regions. *Bioinformatics* **2001**, *17*, 646–653. [CrossRef] [PubMed]
39. Cuthbertson, J.M.; Doyle, D.A.; Sansom, M.S. Transmembrane helix prediction: A comparative evaluation and analysis. *Protein Eng. Des. Sel.* **2005**, *18*, 295–308. [CrossRef] [PubMed]

40. Jones, D.T.; Taylor, W.R.; Thornton, J.M. A model recognition approach to the prediction of all-helical membrane protein structure and topology. *Biochemistry* **1994**, *33*, 3038–3049. [CrossRef] [PubMed]
41. Cao, B.; Porollo, A.; Adamczak, R.; Jarrell, M.; Meller, J. Enhanced recognition of protein transmembrane domains with prediction-based structural profiles. *Bioinformatics* **2006**, *22*, 303–309. [CrossRef] [PubMed]
42. Xiao, F.; Shen, H.B. Prediction enhancement of residue real-value relative accessible surface area in transmembrane helical proteins by solving the output preference problem of machine learning-based predictors. *J. Chem. Inf. Model.* **2015**, *55*, 2464–2474. [CrossRef] [PubMed]
43. Lemesle-Varloot, L.; Henrissat, B.; Gaboriaud, C.; Bissery, V.; Morgat, A.; Mornon, J.P. Hydrophobic cluster analysis: Procedures to derive structural and functional information from 2-D-representation of protein sequences. *Biochimie* **1990**, *72*, 555–574. [CrossRef]
44. Callebaut, I.; Labesse, G.; Durand, P.; Poupon, A.; Canard, L.; Chomilier, J.; Henrissat, B.; Mornon, J.P. Deciphering protein sequence information through hydrophobic cluster analysis (HCA): Current status and perspectives. *Cell. Mol. Life Sci.* **1997**, *53*, 621–645. [CrossRef] [PubMed]
45. Larsson, A. AliView: A fast and lightweight alignment viewer and editor for large datasets. *Bioinformatics* **2014**, *30*, 3276–3278. [CrossRef] [PubMed]
46. Robert, X.; Gouet, P. Deciphering key features in protein structures with the new ENDscript server. *Nucleic Acids Res.* **2014**, *42*, W320–W324. [CrossRef] [PubMed]
47. Li, J.; Jaimes, K.F.; Aller, S.G. Refined structures of mouse P-glycoprotein. *Protein Sci.* **2014**, *23*, 34–46. [CrossRef] [PubMed]
48. Shintre, C.A.; Pike, A.C.; Li, Q.; Kim, J.I.; Barr, A.J.; Goubin, S.; Shrestha, L.; Yang, J.; Berridge, G.; Ross, J.; et al. Structures of ABCB10, a human ATP-binding cassette transporter in apo- and nucleotide-bound states. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2013**, *110*, 9710–9715. [CrossRef] [PubMed]
49. Biermanns, M.; Gartner, J. Targeting elements in the amino-terminal part direct the human 70-kDa peroxisomal integral membrane protein (PMP70) to peroxisomes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2001**, *285*, 649–655. [CrossRef] [PubMed]
50. Iwashita, S.; Tsuchida, M.; Tsukuda, M.; Yamashita, Y.; Emi, Y.; Kida, Y.; Komori, M.; Kashiwayama, Y.; Imanaka, T.; Sakaguchi, M. Multiple organelle-targeting signals in the N-terminal portion of peroxisomal membrane protein PMP70. *J. Biochem.* **2009**, 581–590. [CrossRef] [PubMed]
51. Gloeckner, C.J.; Mayerhofer, P.U.; Landgraf, P.; Muntau, A.C.; Holzinger, A.; Gerber, J.K.; Kammerer, S.; Adamski, J.; Roscher, A.A. Human adrenoleukodystrophy protein and related peroxisomal ABC transporters interact with the peroxisomal assembly protein PEX19p. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2000**, *271*, 144–150. [CrossRef] [PubMed]
52. Kashiwayama, Y.; Asahina, K.; Shibata, H.; Morita, M.; Muntau, A.C.; Roscher, A.A.; Wanders, R.J.; Shimozawa, N.; Sakaguchi, M.; Kato, H.; et al. Role of Pex19p in the targeting of PMP70 to peroxisome. *Biochim. Biophys. Acta-Mol. Cell Res.* **2005**, *1746*, 116–128. [CrossRef] [PubMed]
53. Jones, J.M.; Morrell, J.C.; Gould, S.J. PEX19 is a predominantly cytosolic chaperone and import receptor for class 1 peroxisomal membrane proteins. *J. Cell Biol.* **2004**, *164*, 57–67. [CrossRef] [PubMed]
54. Halbach, A.; Lorenzen, S.; Landgraf, C.; Volkmer-Engert, R.; Erdmann, R.; Rottensteiner, H. Function of the PEX19-binding site of human adrenoleukodystrophy protein as targeting motif in man and yeast. PMP targeting is evolutionarily conserved. *J. Biol. Chem.* **2005**, *280*, 21176–21182. [CrossRef] [PubMed]
55. Wen, P.C.; Tajkhorshid, E. Conformational coupling of the nucleotide-binding and the transmembrane domains in ABC transporters. *Biophys. J.* **2011**, *101*, 680–690. [CrossRef] [PubMed]
56. Saurin, W.; Köster, W.; Dassa, E. Bacterial binding protein-dependent permeases: Characterization of distinctive signatures for functionally related integral cytoplasmic membrane proteins. *Mol. Microbiol.* **1994**, *12*, 993–1004. [CrossRef] [PubMed]
57. Seigneuret, M.; Garnier-Suillerot, A. A structural model for the open conformation of the mdr1 P-glycoprotein based on the MsbA crystal structure. *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 30115–30124. [CrossRef] [PubMed]
58. Dawson, R.J.; Locher, K.P. Structure of a bacterial multidrug ABC transporter. *Nature* **2006**, *443*, 180–185. [CrossRef] [PubMed]
59. Loo, T.W.; Bartlett, M.C.; Clarke, D.M. Human P-glycoprotein is active when the two halves are clamped together in the closed conformation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2010**, *395*, 436–440. [CrossRef] [PubMed]

60. Unterrainer, G.; Molzer, B.; Forss-Petter, S.; Berger, J. Co-expression of mutated and normal adrenoleukodystrophy protein reduces protein function: Implications for gene therapy of X-linked adrenoleukodystrophy. *Hum. Mol. Genet.* **2000**, *9*, 2609–2616. [CrossRef] [PubMed]
61. Ter Beek, J.; Guskov, A.; Slotboom, D.J. Structural diversity of ABC transporters. *J. Gen. Physiol.* **2014**, *143*, 419–435. [CrossRef] [PubMed]
62. Ravna, A.W.; Sylte, I.; Sager, G. Binding site of ABC transporter homology models confirmed by ABCB1 crystal structure. *Theor. Biol. Med. Model.* **2009**, *6*, 20. [CrossRef] [PubMed]
63. Chuang, C.Y.; Chen, L.Y.; Fu, R.H.; Chen, S.M.; Ho, M.H.; Huang, J.M.; Hsu, C.C.; Wang, C.C.; Chen, M.S.; Tsai, R.T. Involvement of the carboxyl-terminal region of the yeast peroxisomal half ABC transporter Pxa2p in its interaction with Pxa1p and in transporter function. *PLoS ONE* **2014**, *9*, e104892. [CrossRef] [PubMed]
64. Liu, L.X.; Janvier, K.; Berteaux-Lecellier, V.; Cartier, N.; Benarous, R.; Aubourg, P. Homo- and heterodimerization of peroxisomal ATP-binding cassette half-transporters. *J. Biol. Chem.* **1999**, *274*, 32738–32743. [CrossRef] [PubMed]
65. Benkert, P.; Biasini, M.; Schwede, T. Toward the estimation of the absolute quality of individual protein structure models. *Bioinformatics* **2011**, *27*, 343–350. [CrossRef] [PubMed]
66. Biasini, M.; Bienert, S.; Waterhouse, A.; Arnold, K.; Studer, G.; Schmidt, T.; Kiefer, F.; Gallo Cassarino, T.; Bertoni, M.; Bordoli, L.; et al. SWISS-MODEL: Modelling protein tertiary and quaternary structure using evolutionary information. *Nucleic Acids Res.* **2014**, *42*, W252–W258. [CrossRef] [PubMed]
67. Arnold, K.; Bordoli, L.; Kopp, J.; Schwede, T. The SWISS-MODEL workspace: A web-based environment for protein structure homology modelling. *Bioinformatics* **2006**, *22*, 195–201. [CrossRef] [PubMed]

© 2017 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

MIEUX COMPRENDRE UNE MALADIE GÉNÉTIQUE TOUCHANT LE CERVEAU

✚ NEUROBIOLOGIE

QUENTIN RAAS est jeune chercheur en neurobiologie au sein du Laboratoire « BioperoxIL » de l'université de Bourgogne. Il s'intéresse à un ensemble de cellules qui protègent le cerveau : la microglie. Des chercheurs ont montré que l'absence d'un élément dans ces cellules était à l'origine d'une maladie génétique : l'adrénoleucodystrophie. Quentin cherche à recréer ce défaut dans des cellules au sein de son laboratoire, pour mieux comprendre pourquoi l'absence de cet élément provoque la maladie. Ses résultats pourront ensuite servir à trouver des traitements pour les malades.

« Aucune journée ne se ressemble, la découverte de résultats et l'avancement de ma recherche rendent mon quotidien vraiment réjouissant. En plus, en participant à la recherche sur les maladies rares, on sait que les résultats seront vraiment utiles aux malades. »

Quentin Raas

Notre cerveau est constitué de milliards de cellules. Certaines ont pour rôle de protéger le cerveau des agressions : elles forment ce qu'on appelle « la microglie ». Ces cellules sont capables d'éliminer l'agresseur et de réparer ce qui a été abîmé en envoyant des signaux aux cellules alentour.

Les informations contenues dans chaque cellule lui permettent de produire tous les éléments qui la composent et dont elle a besoin pour fonctionner. Un petit défaut d'une des informations utiles à la microglie peut avoir des conséquences dramatiques pour le cerveau. C'est le cas pour la maladie appelée adrénoleucodystrophie. A cause d'une mutation, un élément manque dans la microglie et elle n'arrive plus à protéger correctement le cerveau. Ce défaut se traduit par des handicaps sévères chez les malades : ils se retrouvent en fauteuil roulant. Il existe peu de traitements pour les soigner. Quentin cherche donc à mieux comprendre cette maladie.

Pour cela, Quentin recrée le défaut « *in vitro* » dans la microglie isolée et cultivée dans des flacons dans son laboratoire. Il modifie les informations présentes dans des cellules normales pour enlever le même élément qui manque dans la microglie des malades. Il obtient alors des cellules mutantes malades. Il espère ensuite pouvoir comprendre ce qui fait que les cellules mutantes obtenues n'arrivent plus à protéger le cerveau, en comparant les signaux envoyés par les cellules mutantes et ceux envoyés par les cellules normales. Ces résultats permettront de développer de nouvelles solutions pour que ces cellules puissent jouer leur rôle protecteur dans le cerveau, et donc proposer un traitement pour les malades.

LES OBJECTIFS

- Créer des cellules mutantes malades à partir de cellules normales
- Comparer les cellules malades obtenues à des cellules normales pour voir en quoi la mutation empêche les cellules de jouer leur rôle protecteur
- Essayer de trouver des traitements pour les cellules malades

Laboratoire d'accueil : EA 7270 - Laboratoire Bio-PeroxIL
Faculté des Sciences Gabriel, 6 Bd Gabriel, 21000 Dijon

Titre: Inactivation génique des transporteurs ABCD1 et ABCD2 dans les cellules microgliales BV-2 : étude de la physiopathogenèse de l'adrénoleucodystrophie liée à l'X

Mots clés : Adrénoleucodystrophie liée à l'X, ABCD1, Microglie, Peroxysome, CRISPR-Cas9

Résumé : L'adrénoleucodystrophie liée à l'X (X-ALD) est une maladie neurodégénérative sévère caractérisée par une accumulation d'acides gras à très longue chaîne (AGTLC), conséquence d'un défaut de β-oxydation peroxysomale. La maladie est associée à l'absence de la protéine ABCD1, transporteur ABC du peroxysome qui, tout comme son homologue le plus proche, ABCD2, participe à l'import des AGTLC-CoA au sein du peroxysome, l'unique site de leur dégradation par β-oxydation. La compréhension des mécanismes physiopathologiques est aujourd'hui limitée par le manque de modèles expérimentaux pertinents, cellulaires ou animaux. Puisque le défaut peroxysomal dans la microglie apparaît comme un événement pathogénique majeur, nous avons généré des lignées de cellules microgliales incapables de transporter et/ou β-oxyder les AGTLC au sein du peroxysome. Quatre lignées cellulaires microgliales BV-2 déficientes en ABCD1, ABCD2, ABCD1 et ABCD2 ou ACOX1 (l'enzyme limitante de la β-oxydation peroxysomale) ont ainsi été générées par édition génique par CRISPR-Cas9. Ces cellules déficientes présentent d'importants défauts biochimiques, une accumulation d'AGTLC mais aussi des changements des contenus en acides gras et cholestérol. Les analyses ultrastructurales effectuées démontrent l'existence d'importantes inclusions lipidiques et indiquent également une augmentation du nombre de peroxysomes et mitochondries dans ces cellules. Les profils transcriptomiques signalent des altérations de la plasticité de ces cellules microgliales et de leur capacité de reprogrammation métabolique en réponse à un stimulus inflammatoire. Les fonctions de phagocytose ou de présentation antigénique des cellules microgliales semblent être affectées par le défaut peroxysomal. Enfin, les résultats obtenus à l'aide de ces modèles suggèrent que l'altération du métabolisme lipidique peroxysomal modifie l'organisation des membranes cellulaires. Ces lignées cellulaires apparaissent donc comme des modèles prometteurs, d'un grand intérêt pour la compréhension de la physiopathologie et l'identification de cibles thérapeutiques de cette maladie neurodégénérative complexe.

Title : ABCD1 and ABCD2 deficiency in BV-2 microglial cells: towards a better understanding of the physiopathogenesis of X-ALD

Keywords : X-linked adrenoleukodystrophy, ABCD1, Microglia, Peroxisome, CRISPR-Cas9

Abstract : X-linked adrenoleukodystrophy (X-ALD) is a severe neurodegenerative disorder characterized by very-long-chain fatty acid (VLCFA) accumulation resulting from a peroxisomal β-oxidation defect. The disease is caused by mutations in the ABCD1 gene, which encodes for a peroxisomal half ABC transporter predicted, like its closest homologue ABCD2, to participate in the entry of VLCFA-CoA into the peroxisome, the unique site of their β-oxidation. Progress in understanding the physiopathogenesis of X-ALD suffers from the lack of appropriate cell and animal models. Since peroxisomal defects in microglia seem to be a key element of the onset of the disease, we generated four microglial cell lines unable to transport and/or β-oxidize VLCFA into the peroxisome. BV-2 microglial cells were engineered with CRISPR-Cas9 to generate four microglial cell lines deficient in ABCD1, ABCD2, both ABCD1 and ABCD2 or ACOX-1 (the first rate-limiting enzyme of the peroxisomal β-oxidation system). Biochemical defects and lipid content changes associated with VLCFA accumulation but also fatty acids and cholesterol changes were identified in deficient microglia. Ultrastructural investigations confirmed cytosolic lipid inclusions and an increased number of peroxisome and mitochondria. Transcriptomic profiles of deficient microglia are indicative of an impaired plasticity and an impaired capacity to operate the metabolic shift required upon an inflammatory stimulation. Peroxisomal defect is likely to affect phagocytosis and antigen presentation capacity of microglia. Peroxisomal lipid metabolism defect is also suggested to modify cell membranes organization. Altogether, these novel mutant cell lines represent a promising model that should permit identification of new therapeutic targets for this complex neurodegenerative disease.