



**HAL**  
open science

**Effets d'extraits de raquette du cactus -Opuntia ficus indica- sur la modulation du stress oxydant et du processus inflammatoire liés à la déficience en acyl-CoA oxydase 1 et caractérisation d'une lignée cellulaire BV-2 inactivée pour l'ACOX 1**

Fatima-Ezzahra Saih

► **To cite this version:**

Fatima-Ezzahra Saih. Effets d'extraits de raquette du cactus -Opuntia ficus indica- sur la modulation du stress oxydant et du processus inflammatoire liés à la déficience en acyl-CoA oxydase 1 et caractérisation d'une lignée cellulaire BV-2 inactivée pour l'ACOX 1. Médecine humaine et pathologie. Université Bourgogne Franche-Comté; Université Hassan Ier (Settat, Maroc), 2018. Français. NNT : 2018UBFCI017 . tel-02477187

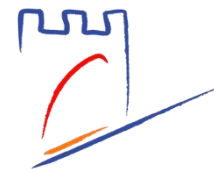
**HAL Id: tel-02477187**

**<https://theses.hal.science/tel-02477187>**

Submitted on 13 Feb 2020

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

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



**UNIVERSITE HASSAN I<sup>er</sup> – Settat – Maroc**  
CENTRE D'ETUDES DOCTORALES BIOLOGIE SANTE ET ENVIRONNEMENT  
FACULTE DES SCIENCES ET TECHNIQUES

**UNIVERSITE DE BOURGOGNE FRANCHE-COMTÉ – Dijon – France**  
ECOLE DOCTORALE DES SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTE N°554  
UFR DES SCIENCES DE LA VIE DE LA TERRE ET DE L'ENVIRONNEMENT

**THESE**  
**EN COTUTELLE**  
Pour l'obtention du titre de  
**Docteur**

**Discipline** : Science de la vie

**Spécialité** : Biochimie, Biologie Moléculaire et Cellulaire

**Effets d'extraits de raquette du cactus -*Opuntia ficus indica*- sur la modulation du stress oxydant et du processus inflammatoire liés à la déficience en acyl-CoA oxydase 1 et caractérisation d'une lignée cellulaire BV-2 inactivée pour l'ACOX 1.**

Présentée et soutenue publiquement par

**M<sup>lle</sup>. Fatima-Ezzahra SAIH**

Le 17 Décembre 2018

Membres de Jury :

**M. Rachid SAILE**  
**M<sup>me</sup>. Maryam BENBACHIR**  
**M. Hamid MORJANI**  
**M. Abdelaziz SOUKRI**  
**M. Pierre ANDREOLETTI**  
**M. Mustapha CHERKAOUI-MALKI**  
**M. Boubker NASSER**

Université Hassan II, Casablanca, Maroc  
Université Hassan I<sup>er</sup>, Settat, Maroc  
Université de Reims Champagne-Ardenne Reims, France  
Université Hassan II, Casablanca, Maroc  
Université de Bourgogne Franche-Comté, Dijon, France  
Université de Bourgogne Franche-Comté, Dijon, France  
Université Hassan I<sup>er</sup>, Settat, Maroc

**Président de jury**  
**Rapporteur**  
**Rapporteur**  
**Rapporteur**  
**Co-directeur de thèse**  
**Directeur de thèse**  
**Directeur de thèse**

# *Avant-Propos*

---

Les travaux de cette thèse en cotutelle ont été conçus et réalisés dans le cadre des échanges franco-marocains de l'action intégrée PHC Toubkal MA/14/310 entre les deux laboratoires :

- Laboratoire de *Biochimie du Peroxysome, Inflammation et Métabolisme Lipidique* « *BioPeroxIL, EA7270* » de la Faculté des Sciences Gabriel, Université de Bourgogne Franche-Comté, Dijon, France, sous la direction du Professeur *Mustapha CHERKAOUI-MALKI* et le co-encadrement du Docteur *Pierre ANDREOLETTI*.
- Laboratoire de *Biochimie et Neurosciences* « *LBN* » de la Faculté des Sciences et Techniques, Université de Hassan I<sup>er</sup>, Settat – Maroc, sous la direction du Professeur *Boubker NASSER*.

Cette thèse a été rendue possible grâce au soutien financier de :

- Action intégrée PHC TOUBKAL
- Ministère des Affaires Étrangères - France
- European Cooperation in Science & Technology - COST « CA 161112 »
- Ministère de l'Enseignement et de la Recherche - France
- École Doctorale Santé et Environnement, Université de Bourgogne Franche-Comté, Dijon - France
- Ministère de l'Éducation Nationale, de l'Enseignement Supérieur, de la Formation des Cadres et de la Recherche Scientifique - Maroc
- Centre d'Étude Doctorale de la Faculté des Sciences et Techniques, Université Hassan I<sup>er</sup>, Settat - Maroc
- Centre Nationale de recherche scientifique et technique CNRST - Maroc



# *Dédicaces*

---

## *À MA TRÈS CHÈRE MAMAN BAHIIJA*

*Affable, honorable, aimable : tu présentes pour moi le symbole de la bonté par excellence, la source de tendresse et l'exemple du dévouement qui n'a pas cessé de m'encourager et de prier pour moi dans mes durs moments de ma vie.*

*Ta prière et ta bénédiction m'ont été d'un grand secours pour mener à bien cette aventure.*

*Aucune dédicace ne saurait être assez éloquente pour exprimer ce que tu mérites pour tous les sacrifices que tu n'as cessé de me donner depuis ma naissance, durant mon enfance et même à l'âge d'adulte*

*Tu as fait plus qu'une mère puisse faire pour ses enfants suivent le bon chemin dans leur vie et leurs études*

*Je te dédie ce travail en témoignage de mon profond amour. Puisse Dieu, le tout puissant, te préserver et t'accorder santé, bonheur et longue vie.*

## *À MON TRÈS CHER PAPAUNET ABDELMAJID*

*En témoignage de brutes d'années de sacrifice, d'encouragements et de prière.*

*Rien au monde ne vaut les efforts fournis jour et nuit pour mon éducation et mon bien être. En ce jour, j'espère réaliser l'un de tes rêves.*

*Aucune dédicace ne saurait exprimer l'amour, le respect, la reconnaissance, le dévouement que j'ai toujours eu pour toi papa.*

*Pourras-tu trouver dans ce travail le fruit de toutes tes peines et tous tes efforts.*

*Puisse Dieu te préserver et te procurer santé et bonheur.*

### *À MA SŒUR MARIEM ET MON FRÈRE OMAR*

*Je ne saurai traduire sur du papier et en quelques lignes l'affection que j'ai pour vous, je n'oublierai jamais ces merveilleux moments passés ensemble.*

*Vous avez été à mes côtés pendant toutes les étapes de ce travail, je vous en suis très reconnaissante.*

*Aucun mot ne peut exprimer mes sentiments d'amour fraternels et d'attachement. Je vous dédie ce travail en témoignage de ma profonde affection en souvenir de notre indéfectible union qui s'est tissée au fil des jours.*

*Puisse Dieu vous protéger, garder et renforcer notre fraternité.*

### *À MA PETITE SŒUR BOUTAINA*

*Ma chère petite sœur présente dans tous mes durs moments de cette aventure par ton soutien moral, ton petit sourire. Tu seras aussi un jour le Pédiatre que tu rêves je n'en doute pas.*

*Je te souhaite un avenir plein de joie, de bonheur, de réussite et de sérénité. Je t'exprime à travers ce travail mes sentiments d'amour.*

### *À FERDAOUS ET ABDELHAKIM*

*Je vous dédie ce travail avec tous mes vœux de bonheur, de santé et de réussite.*

### *À MA MEILLEURE ET UNIQUE AMIE MERIEM AIT AZZAT*

*Je n'oublierai jamais ton soutien tout au long de cette thèse, tu as vécu avec moi les plus difficiles moments de cette aventure même parfois à distance.*

*Depuis que je t'ai connu, tu n'as cessé de me soutenir et de m'épauler. Tu me voulais toujours être la meilleure. Ton amitié ne m'a procuré que l'espoir, la confiance et l'énergie.*

*Je pense que je suis très chanceuse d'avoir une amie comme toi et j'espère que notre amitié durera pour toute notre vie.*

*À TOUS LES MEMBRES DE MA FAMILLE –SAIH–, GRANDS ET  
PETITS*

*Vous avez toujours été présents pour les bons conseils et le grand soutien. Un grand Merci pour votre affection et votre soutien. Trouvez ici l'assurance de mon profond respect et de mon fidèle attachement.*

*Que ce travail soit pour vous un modeste témoignage de ma profonde affection, mon respect et ma vive reconnaissance.*

*A MA TANTE FATIMA SAMIR, LAMYA ET SA PETITE MAYSA,  
SOUHAILA ET ADAM*

*Je ne trouverai jamais l'expression forte pour vous exprimer mon affection.*

*Un grand Merci pour votre soutien et votre présence. Vous m'avez accueilli depuis toujours avec les bras ouverts dans la capitale française et vous étiez et vous êtes ma deuxième famille.*

*Je vous dédie ce travail en témoignage de mon grand respect et mon estime envers vous. J'implore Dieu qu'il vous apporte bonheur et santé.*

*À LA MÉMOIRE DE MES GRANDS PARENTS*

*Comment vous oublier ? Vous restez toujours gravés dans ma mémoire et mon cœur, j'imagine quelle serait votre joie aujourd'hui, j'aurai voulu que vous assistez à l'aboutissement de ces années. Dieu en a décidé autrement. Que Dieu vous accordez la paix éternelle.*

*Que vous reposiez en paix dans le paradis du Bon Dieu.*

# Remerciement

---

*« À l'issue de la rédaction de cette thèse, je suis convaincue qu'un projet de thèse est loin d'être un travail solitaire. En effet, je n'aurais jamais pu réaliser ce travail doctoral sans le soutien d'un grand nombre de personnes dont la générosité, la bonne humeur et l'intérêt manifestés à l'égard de mes travaux de recherches m'ont permis de progresser dans cette réplique délicate de « l'apprenti-chercheur ». »*

***Monsieur le professeur et mon directeur de thèse, M. Boubker NASSER,***

*J'ai eu le privilège de travailler parmi votre équipe et d'apprécier vos qualités et vos valeurs. Votre sérieux, votre compétence et votre sens du devoir m'ont énormément marqué.*

*Veillez trouver ici l'expression de ma profonde admiration pour toutes vos qualités scientifiques et humaines.*

*Ce travail est pour moi l'occasion de vous témoigner ma profonde gratitude.*

***Monsieur le professeur et mon Directeur de thèse, M. Mustapha CHERKAOUI-MALKI,***

*Monsieur, un grand merci de m'avoir accueillie dans votre équipe et d'avoir supervisé ce travail. Je vous remercie pour la confiance que vous m'avez accordée, pour vos multiples conseils, pour les discussions scientifiques et pour votre rigueur.*

*Un grand merci pour toutes les heures que vous avez consacrées à diriger cette thèse. Vous m'avez toujours réservé le meilleur accueil, malgré vos obligations professionnelles.*

*Permettez-moi de vous dire à quel point j'ai toujours apprécié vos encouragements inlassables votre amabilité et votre gentillesse méritent toute admiration.*

*Enfin, j'étais extrêmement sensible à vos qualités humaines, d'écoute, de compréhension et du soutien surtout pendant mes durs moments de ces années. Je saisis cette occasion pour vous exprimer ma profonde gratitude tout en témoignant mon respect.*

***Monsieur le Docteur et mon co-directeur de thèse M. Pierre ANDREOLETTI,***

*Je vous remercie chaleureusement pour m'avoir encadré durant cette thèse, un remerciement particulier et sincère pour tous vos efforts fournis. Vous avez toujours été présent.*

*Un grand merci pour les discussions si intéressantes, pour le précieux temps que vous m'avez consacré et de m'avoir soutenue dans mes périodes tempétueuses.*

*Je vous remercie de m'avoir enseigné la pratique des sciences et la rigueur de la démarche expérimentale, de m'avoir transmise votre capacité d'enthousiasme, J'ai énormément appris de vous et je garderai longtemps le souvenir de votre humanité.*

**Monsieur le Professeur et président de jury de thèse, M. Rachid SAILE,**

*C'est pour moi un grand honneur de vous voir présider cette thèse aujourd'hui. Je vous remercie pour l'intérêt et le temps que vous avez consacré à la lecture et le jugement de ce travail.*

*C'est grâce à vous que j'ai appris les premières bases en biochimie durant mon cycle de licence et de Master. Vous êtes pour moi un très bon exemple de Professeur.*

*Ce travail est une occasion pour moi d'apprécier vos qualités humaines et professionnelles et de vous témoigner ma profonde gratitude.*

*Qu'il me soit permis de vous remercier et de vous exprimer mon estime et profond respect.*

**Madame le professeur et rapporteur de thèse M<sup>me</sup> Maryam BENBACHIR,**

*Madame, vous m'avez fait l'honneur d'accepter avec une très grande amabilité de siéger parmi mon jury de thèse.*

*Veillez trouver Madame mes sincères remerciements pour le temps précieux que vous avez consacré à ce travail.*

**Monsieur le Professeur et rapporteur de thèse M. Hamid MORJANI,**

*Monsieur, Vous m'avez honoré d'accepter avec grande sympathie de juger ce travail et de siéger aujourd'hui parmi ce jury de thèse.*

*Veillez accepter ce travail Monsieur, en gage de mon grand respect et ma profonde reconnaissance.*

**Monsieur le professeur et rapporteur de thèse M. Abdelaziz SOUKRI,**

*Monsieur, je suis très sensible à l'honneur que vous m'avez fait en acceptant de juger ce travail.*

*Veillez accepter l'expression de mon profond respect et ma reconnaissance.*

**Messieurs, le professeur Abdelkhalid ESSAMADI et Docteur Gérard LIZARD**

*Pour m'avoir accueilli au sein de vos laboratoires LBN (FST de Settat-Maroc) et BioPeroxiL (Faculté des Sciences Gabriel-Dijon- France). Soyez sincèrement remercié.*

***Monsieur, le professeur Michel JADOT, de l'Université de Namur-Belgique***

*Je vous remercie Monsieur, pour votre accueil au sein de l'unité de recherche en physiologie moléculaire (URPhym), un grand merci pour votre temps précieux que vous m'avez consacré durant mon séjour à Namur, pour voir partagé des échanges scientifiques et pour la réalisation du fractionnement subcellulaire des cellules BV-2.*

***Madame Virginie TEVEL, de l'Université de Namur-Belgique***

*Je vous remercie Madame pour votre assistance technique pendant la réalisation du fractionnement subcellulaire des cellules BV-2, ainsi pour les discussions que nous avons partagées tout au long de mon séjour à Namur.*

***Madame le professeur Isabelle HAMER, de l'Université de Namur-Belgique***

*Un grand merci pour votre accueil à mon arrivé à Namur, je vous remercie pour votre disponibilité, votre aide, votre amitié et votre sympathie, je n'oublierai jamais notre marche à pieds pour découvrir pour la première fois Namur et la Citadelle de Namur.*

***Monsieur, le Docteur Joseph VAMECQ, CHU de Lille-France***

*Je vous remercie pour votre accueil chaleureux dans le laboratoire de Biochimie et Biologie moléculaire- CHU de Lille- France. Merci pour les longues discussions scientifiques partagées.*

***Monsieur le professeur Stéphane SAVARY, BioPeroxiL-Dijon, France***

*Je vous remercie pour votre disponibilité, votre aide scientifique, vos conseils, vous avez toujours été ouverts à la discussion, un grand Merci pour votre soutien.*

***Monsieur le Docteur Stéphane MANDARD, BioPeroxiL-Dijon, France***

*Un grand merci, pour nous avoir réalisé la mesure des différentes cytokines et pour la discussion des résultats et pour votre gentillesse.*

*Mes remerciements vont également à tous les membres de l'équipe de BioPeroxiL qui m'ont accompagné au quotidien durant mes séjours à Dijon un grand Merci à :*

***Catherine GONDCAILLE, Anne VEJUX, Doriane TROMPIER, Nathalie BANCOD, Thomas NURY et Hanane MOTTOUS, pour votre gentillesse, votre humeur et vos conseils et pour tous les moments de nos discussions partagées. Je vous remercie pour la convivialité qui a régné dans le laboratoire. Grâce à vous je ne me suis jamais senti seule ou étrangère au laboratoire.***

***Monsieur le professeur M. Riad ELKABBAJ***

*Permettez-moi de vous apporter le témoignage de ma profonde reconnaissance, un grand merci pour vos conseils et les discussions que nous avons partagées tout au long de cette période de thèse.*

*Je remercie **Quentin RAAS**, un grand merci pour ton amitié, ton humeur et ta gentillesse, Merci pour les longues heures de travail pour la réalisation des cellules BV-2, je sais que ce n'était pas facile. J'aurai aimé assister à la soutenance de ta thèse, mais nous soutenons la même journée, je suis certaine que tu vas passer une excellente thèse.*



*Marie GRANJON, Amira NAMSI et Anouar HAILAFE, je vous remercie pour votre amitié, pour la bonne humeur, je ne peux pas trouver les mots justes pour vous exprimer mon affection et mes pensées. Vous êtes pour moi des sœurs et un frère et des amis sur qui je peux compter. En témoignage de l'amitié et les souvenirs de tous les moments que nous avons passé ensemble, je vous dédie ce travail et je vous souhaite une vie pleine de santé et bonheur.*

*Merci à mes **collègues** : Abdelbasset, Talale, Soufiane, Ikram, Asemae, Fatiha, Habiba, Soukaina, Mariem et Youssef. Merci à ceux qui ont partagé leurs connaissances avec moi : mes **enseignants, mes amis** ... un grand merci à vous.*

*Enfin, un grand merci à tous ceux qui ne sont pas cités ici mais que je n'oublie pas. Veuillez trouver dans ces lignes mes vifs remerciements.*

# Résumé

---

## Résumé

La déficience en Acyl-CoA oxydase 1 (ACOX1) est une leucodystrophie peroxysomale rare et sévère associée à un déficit dans la  $\beta$ -oxydation des acides gras à très long chaîne. À cause du rôle clé de ce déficit peroxysomal microglial dans la physiopathogénèse de la déficience en ACOX1, nous avons utilisé la lignée microgliale BV-2 comme modèle : (i) pour évaluer les propriétés antioxydantes et anti-inflammatoires des extraits de raquettes du cactus *Opuntia ficus-indica* ; (ii) pour caractériser une nouvelle lignée BV-2 déficiente en ACOX1 générée récemment dans notre laboratoire par édition génique grâce à la méthode CRISPR-Cas9. Dans la première partie des travaux, les cellules BV-2, activées par exposition à quatre sérotypes de lipopolysaccharides (LPS), montre un lien entre la structure du LPS et l'effet sur la  $\beta$ -oxydation des acides gras et les enzymes antioxydantes dans le peroxysome : les LPS dérivant d'*Escherichia coli* diminuent l'activité ACOX1 alors que les LPS de *Salmonella minnesota* réduisent l'activité catalase. Remarquablement, les différents extraits de cactus stimulent l'activité catalase. Cet effet antioxydant est accompagné par un effet anti-inflammatoire attesté par la réduction de la production LPS-dépendante d'oxyde nitrique dans les BV-2. Nos résultats suggèrent que les extraits de cactus auraient une activité neuroprotectrice sur les cellules microgliales activées à travers l'induction d'activités antioxydantes peroxysomales et l'inhibition de la production de NO. Dans la deuxième partie des travaux, la caractérisation de la lignée BV-2 déficiente en ACOX1, portant des mutations alléliques, confirme l'absence de la protéine et de l'activité ACOX1. Bien que ces cellules aient une croissance plus faible, elles ne montrent pas de modifications morphologiques détectables. Par contre, l'activité catalase, due à l'enzyme peroxysomale dégradant l' $H_2O_2$ , est augmentée. Les études par fractionnement subcellulaire et par ultracentrifugation en gradient Nycodenz révèlent une modification de la densité et de la taille de peroxysomes. De plus, ces cellules microgliales déficientes montrent une profonde modification de l'expression des gènes liés à l'inflammation (IL-1b, IL-4, TNF- $\alpha$ ) et particulièrement l'expression de la protéine CCL2/MCP-1 impliquée dans la neuro-inflammation. Cette nouvelle lignée microgliale déficiente en ACOX1 révèlent les mêmes dérégulations biochimiques que celles décrites chez les patients déficients en ACOX1 et représente donc un modèle pour l'étude des conséquences du déficit de la  $\beta$ -oxydation peroxysomale dans la microglie sur les fonctions peroxysomales, le stress oxydatif, l'inflammation et les fonctions cellulaires.

**Mots clés :** Cactus – ACOX1- microglie - BV-2 – Stress oxydant - inflammation

# *Abstract*

---

## Abstarct

Acyl-CoA oxidase 1 (ACOX1) deficiency is a rare and severe peroxisomal leukodystrophy associated with a very long-chain fatty acids  $\beta$ -oxidation defect. As peroxisomal defects in microglia appear to be a key component of physiopathogenesis in ACOX1 deficiency, we used the BV-2 microglial cell line as model: (i) to evaluate the antioxidant and anti-inflammatory properties of *Opuntia ficus-indica* cactus cladode extracts; (ii) to characterize a new BV-2 ACOX1 deficient cell line recently generated in our laboratory by CRISPR/Cas9 gene editing. In the first part of this work, the microglia activation, achieved by BV-2 cells exposition to four structurally and biologically well-defined lipopolysaccharides (LPS) serotypes, exhibited a LPS structure-related differential effect on fatty acid  $\beta$ -oxidation and antioxidant enzymes in peroxisomes: LPS derived from *Escherichia coli* diminished ACOX1 activity while LPS from *Salmonella minnesota* decreased catalase activity. Interestingly, microglial catalase activity activation was obtained by different cactus extracts. This antioxidant effect was accompanied by an anti-inflammatory effect revealed by the reduction of nitric oxide (NO) LPS-dependent production. Our results suggest that cactus extracts may have a neuroprotective activity in activated microglial cells through the induction of peroxisomal antioxidant activity and the inhibition of NO production. In the second part, the characterization of the BV-2 ACOX1 deficient cell line, with allelic mutations, confirmed the absence of ACOX1 protein and enzymatic activity. Although the mutant cells grew more slowly than control cells, they didn't show any discernible morphological changes. However, catalase activity, due to the peroxisomal  $H_2O_2$ -degrading enzyme, was significantly enhanced. Subcellular fractionation and ultracentrifugation on Nycodenz gradient studies revealed a relative modification in size and density of peroxisomes in ACOX1-deficient cells. Besides this, ACOX1 deficient cells show a profound modification of inflammatory gene expression (IL-1b, IL-4, TNF- $\alpha$ ) and particularly of CCL2/MCP-1 protein, which is involved in neuroinflammation. This new Acox1-deficient cell line presents the same biochemical changes shown in the human ACOX1 deficiency and represents a promising model to decipher the consequences of a specific microglial peroxisomal  $\beta$ -oxidation defect on peroxisomal functions, oxidative stress, inflammation and cellular functions.

**Keywords :** Cactus- microglia - BV-2 - Oxidative stress – inflammation

# *Table de matière*

---

<b>Avant-Propos .....</b>	<b>2</b>
<b>Dédicaces.....</b>	<b>4</b>
<b>Remerciement.....</b>	<b>8</b>
<b>Résumé .....</b>	<b>13</b>
<b>Abstract .....</b>	<b>15</b>
<b>Table de matière.....</b>	<b>17</b>
<b>Liste des figures .....</b>	<b>22</b>
<b>Liste des tableaux .....</b>	<b>27</b>
<b>Abréviations.....</b>	<b>29</b>
<b>Introduction .....</b>	<b>32</b>
<b>I. Introduction .....</b>	<b>33</b>
<b>Revue Bibliographique.....</b>	<b>36</b>
<b>II. Les peroxysomes.....</b>	<b>37</b>
<b>A. Découverte .....</b>	<b>37</b>
<b>B. La Biogenèse du peroxysome .....</b>	<b>39</b>
<b>C. Fonctions métaboliques et biochimiques des peroxysomes .....</b>	<b>42</b>
1. L'α-oxydation des acides gras.....	43
2. Métabolisme du glyoxylate peroxysomale .....	44
3. Biosynthèse des éthers phospholipides .....	44
4. La biosynthèse de l'acide docosahéxaénoïque (DHA).....	46
5. Métabolisme des éicosanoïdes :.....	47
<b>D. La β-oxydation peroxysomale des acides gras à très longue chaîne AGTLC .....</b>	<b>47</b>
<b>E. Aperçu générale sur les enzymes impliquées dans la voie de la β-oxydation peroxysomale</b>	<b>52</b>
1. Les Acyl-CoA oxydases.....	52
2. Les protéines bifonctionnelles .....	53
3. Les thiolases.....	53
<b>F. Les pathologies liées aux fonctions peroxysomales .....</b>	<b>54</b>
1. Les pathologies liées aux déficiences enzymatiques peroxysomales .....	56
a) Maladies de la β-oxydation peroxysomale des acides gras.....	57
<b>G. Conséquences physiopathologiques de la déficience en Acyl-CoA oxydase 1.....</b>	<b>59</b>
1. Chez l'homme .....	59
2. Chez la souris .....	60
<b>H. Déficience en ACOX1 et inflammation .....</b>	<b>60</b>
<b>I. Rôle de la microglie dans le cerveau et le processus inflammatoire .....</b>	<b>62</b>

J. Peroxysome et stress oxydant .....	65
K. Peroxysome comme source importante productrice des ROS/RNS .....	65
L. Peroxysomes comme système de défense antioxydant .....	68
M. Relations peroxysome-mitochondrie .....	70
<b>III. Cactus et extraits.....</b>	<b>74</b>
<b>A. Introduction.....</b>	<b>74</b>
<b>B. Composition de cactus.....</b>	<b>75</b>
1. Les composés phénoliques .....	75
2. Les acides gras .....	78
3. Vitamines.....	78
4. Stéroïdes.....	79
5. Minéraux et acides aminés.....	80
6. Propriétés biologiques et médicales de cactus.....	82
7. L'utilisation de la plante de Cactus <i>Opuntia ficus indica</i> .....	83
<b>Matériels &amp; Méthodes .....</b>	<b>84</b>
<b>IV. Matériel et Méthodes .....</b>	<b>85</b>
<b>A. Préparation des extraits issus de la raquette de cactus .....</b>	<b>85</b>
1. Récolte.....	85
2. Séchage .....	85
3. Préparation des différents extraits .....	85
<b>B. Culture cellulaire des cellules BV-2 .....</b>	<b>88</b>
<b>C. Mesure de la viabilité cellulaire par marquage au bleu de Trypan .....</b>	<b>88</b>
<b>D. Mesure de la cytotoxicité et de la viabilité cellulaire par le test MTT .....</b>	<b>89</b>
<b>E. Mesure de l'adhérence cellulaire et de la viabilité par le test de Cristal violet .....</b>	<b>89</b>
<b>F. Mesure du monoxyde d'azote : test NO .....</b>	<b>90</b>
<b>G. Préparation des lysats cellulaires.....</b>	<b>91</b>
1. Extraction des protéines.....	91
2. Dosage des protéines.....	91
<b>H. Le fractionnement subcellulaire complet des cellules .....</b>	<b>92</b>
1. L'homogénéisation.....	92
2. La Préparation et analyses des fractions subcellulaire.....	92
a) Fractionnement par centrifugation différentielle.....	92
b) Purification par gradient de densité : par Gradient de Nycodenz.....	92
3. Protocole du fractionnement complet des cellules BV-2 en culture.....	93
1. Préparation des peroxysomes .....	96
a) Le calcul de la fréquence de chaque fraction .....	96
2. Dosage des protéines.....	96
<b>I. Mesure des activités enzymatiques .....</b>	<b>98</b>
1. Mesure de l'activité enzymatique de l'acyl-CoA oxydase 1 (ACOX1) par dosage fluorimétrique .....	98
2. Mesure l'activité enzymatique de l'oxydation de palmitoyl-CoA insensible au cyanure .....	99
3. Mesure directe de l'activité enzymatique de la catalase .....	100
4. Mesure de l'activité enzymatique de la catalase par la méthode au KMnO4.....	100
5. Mesure de l'activité enzymatique de la $\beta$ -galactosidase.....	101



6.	Mesure de l'activité enzymatique de la $\beta$ -hexoaminisidase .....	101
7.	Mesure de l'activité enzymatique de la Cathepsine-C .....	102
8.	Mesure de l'activité enzymatique du cytochrome C oxydase .....	102
9.	Mesure de l'activité enzymatique de l' $\alpha$ -glucosidase alcaline .....	102
10.	Mesure de l'activité enzymatique de la dipeptyl peptidase III (DPP III) .....	103
11.	Western-blot .....	103
	a) Extraction des protéines.....	103
	b) Préparation des échantillons et Séparation des protéines en SDS-PAGE (PolyAcrylamid Gel Electrophoresis) .....	104
	c) Détection des protéines et révélation.....	104
	d) Déshybridation d'une membrane .....	105
12.	RT-qPCR.....	105
	a) Extraction des ARN à partir des cellules.....	105
	b) Extraction des ARN à partir des tissus.....	105
	c) Dosage des ARN.....	106
	d) Reverse Transcription (RT) des ARNm.....	106
	e) Réaction de polymérisation en chaîne en temps réel : qPCR .....	106
	f) Préparations des échantillons.....	107
	g) Réaction de qPCR.....	107
<b>Résultats .....</b>		<b>109</b>
<b><i>Études des effets protecteurs des extraits de la raquette de cactus -Opuntia ficus indica- sur les fonctions peroxysomales des cellules BV-2 microgliales activées par des lipopolysaccharides (Article).....</i></b>		<b>110</b>
<b>A. Introduction.....</b>		<b>111</b>
<b>B. Objectif.....</b>		<b>112</b>
<b>C. Les lipopolysaccharides .....</b>		<b>112</b>
<b>D. Discussion.....</b>		<b>130</b>
<b><i>Caractérisation d'une nouvelle lignée des cellules BV-2 déficiente en Acyl-CoA oxydase1 (ACOX1) peroxysomale (Article).....</i></b>		<b>132</b>
<b>A. Introduction.....</b>		<b>133</b>
<b>B. Objectif.....</b>		<b>133</b>
<b>C. Caractérisation des cellules BV-2 déficiente en ACOX1.....</b>		<b>134</b>
1.	Étude de la viabilité des cellules BV-2 .....	134
	a) Étude de la morphologie des cellules BV-2 .....	134
	b) Étude de la croissance cellulaire : les cellules BV-2 ACOX1(-/-) croissent plus lentement .....	136
2.	Étude de la viabilité et l'adhérence cellulaire .....	138
	a) L'absence d'ACOX1 diminue la viabilité cellulaire .....	138
	b) L'absence d'ACOX1 diminue l'adhérence cellulaire .....	138
3.	La production de NO est fortement diminuée dans les cellules BV-2 déficiente en ACOX1.....	139
4.	La déficience en ACOX1 et la production des cytokines inflammatoires.....	140
5.	La déficience en ACOX1 augmente l'activité de la catalase des cellules BV-2 .....	142
6.	L'activité palmitoyl-CoA oxydase est absente dans les cellules BV-2 déficientes en ACOX1. ....	143
7.	Évaluation de l'expression de la protéine ACOX 1 et Catalase.....	144
8.	Déficience en ACOX1 et variations de l'expression génique.....	145
	a) Évaluation du taux d'expression des gènes codant pour protéines peroxysomales liées à la $\beta$ -oxydation peroxysomale .....	146

b) Évaluation du taux d'expression des gènes codant pour protéines intervenant dans la biogenèse mitochondriale et métabolisme énergétique .....	147
c) Évaluation du taux d'expression des gènes codant pour les gènes de stress oxydant.....	148
d) Évaluation du taux d'expression des gènes codant pour les cytokines inflammatoires et les gènes de la neuroinflammation .....	148
<b><i>Analyses par fractionnement subcellulaire et ultracentrifugation en gradient Nycodenz des cellules BV-2 déficientes en Acyl-CoA oxydase 1 peroxysomale.....</i></b>	<b>161</b>
<b>A. Introduction.....</b>	<b>162</b>
<b>B. Introduction.....</b>	<b>162</b>
<b>C. Protocole de fractionnement subcellulaire des cellules BV-2 .....</b>	<b>163</b>
1. Principe du fractionnement subcellulaire.....	163
<b>D. Mesure de l'activité de la Catalase avec le KMnO<sub>4</sub> .....</b>	<b>166</b>
1. Introduction.....	166
2. Mise au point de la méthode de détermination de l'activité Catalase.....	168
a) Principe et méthode.....	168
b) Vérification de la linéarité de la méthode .....	168
<b>E. Déficience en ACOX1 et distribution d'organites subcellulaires dans les cellules BV-2.....</b>	<b>172</b>
<b><i>Discussion Générale .....</i></b>	<b>186</b>
<b><i>V. Discussion .....</i></b>	<b>187</b>
<b><i>Conclusions &amp; Perspectives .....</i></b>	<b>194</b>
<b><i>I. Conclusion.....</i></b>	<b>195</b>
<b><i>II. Perspectives.....</i></b>	<b>196</b>
<b><i>Références Bibliographiques.....</i></b>	<b>198</b>
<b><i>Annexes .....</i></b>	<b>220</b>

# *Liste des figures*

---

<i>Figure 1 : Visualisation des peroxysomes de Foie de rat par microscopie électronique. ....</i>	<i>39</i>
<i>Figure 2: Les principales voies de la biogenèse des peroxysomes et la contribution du RE dans ce processus. ....</i>	<i>40</i>
<i>Figure 3: Modèle globale du processus de la biogenèse, la prolifération et la division des peroxysomes. ....</i>	<i>42</i>
<i>Figure 4: schéma de la voie de l' <math>\alpha</math> -oxydation de l'acide phytanique chez les mammifères. ..</i>	<i>44</i>
<i>Figure 5: Schéma des différentes étapes de la voie de biosynthèse des plasmalogènes et implication des peroxysomes et du Réticulum endoplasmiques. ....</i>	<i>45</i>
<i>Figure 6: Schéma récapitulatif des étapes de la synthèse de l'acide docosahexaénoïque (DHA, C22:6). ....</i>	<i>46</i>
<i>Figure 7: Schéma générale de la voie de la <math>\beta</math> -oxydation peroxysomale chez l'Homme. ....</i>	<i>49</i>
<i>Figure 8: Schéma des principales voies métaboliques assurées par les peroxysomes. ....</i>	<i>51</i>
<i>Figure 9: Vue schématique de la relation entre les peroxysomes et les mitochondries. ....</i>	<i>71</i>
<i>Figure 10: Aperçu schématique du stress oxydatif du peroxysome et de son effet sur les mitochondries. ....</i>	<i>72</i>
<i>Figure 11: Photo de la plante d'Opuntia ficus indica. ....</i>	<i>75</i>
<i>Figure 12: Figure montrant les différentes étapes de préparation des différents extraits de la raquette de cactus. ....</i>	<i>87</i>
<i>Figure 13: Figure montrant l'un des mécanismes proposés pour l'oxydation de la N-hydroxyarginine (NOHA) menant à la libération de NO par les NOS. ....</i>	<i>90</i>
<i>Figure 14: Figure qui montre en (A) la structure de Nycodenz, dérivé de l'acide tri-iodobenzoïque. (B) images des fractions dans un tube à centrifuger après centrifugation. ....</i>	<i>93</i>
<i>Figure 15: Schéma explicatif des différentes étapes de fractionnement complet des cellules BV-2. ....</i>	<i>97</i>
<i>Figure 16: La réaction enzymatique utilisée pour mesurer l'activité de l'ACOX1 en présence d'acide homovanillique et de peroxydase. ....</i>	<i>98</i>
<i>Figure 17: La réaction enzymatique de la dismutation de l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> catalysée par la catalase. ....</i>	<i>100</i>
<i>Figure 18: la réaction enzymatique de l'oxydation de KMnO<sub>4</sub> par le H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ....</i>	<i>100</i>

<i>Figure 20: La réaction enzymatique de l'oxydation du cytochrome C .....</i>	<i>102</i>
<i>Figure 21: Le taux de sécrétion des cytokines (IL-6 et TNF<math>\alpha</math>) dans le milieu de culture des cellules BV-2. ....</i>	<i>115</i>
<i>Figure 22: Les différentes formes des cellules BV-2.....</i>	<i>134</i>
<i>Figure 23 : Résultats de l'étude morphologiques des cellules BV-2 Wt et ACOX1(-/-) présentant les proportions des différentes formes cellulaires des cellules BV2 en fonction du temps.....</i>	<i>135</i>
<i>Figure 24: Cinétique de croissance des cellules BV-2 (Wt — ) et BV-2(ACOX1(-/-) — ). ....</i>	<i>137</i>
<i>Figure 25: Viabilité des cellules BV-2 (Wt) et (ACOX1(-/-)) évaluée par la mesure du niveau de l'activité de la succinate déshydrogénase mitochondriale (Test MTT). ....</i>	<i>138</i>
<i>Figure 26 : Adhésion des cellules BV-2 (Wt) et (ACOX1(-/-)) mesurée par marquage au cristal violet.....</i>	<i>139</i>
<i>Figure 27: niveau de production de NO par les cellules BV-2 Wt et ACOX1(-/-).....</i>	<i>140</i>
<i>Figure 28: Figure montrant le niveau de l'expression des cytokines inflammatoires par les cellules BV-2 Wt et ACOX1(-/-).....</i>	<i>141</i>
<i>Figure 29: Figure montrant le niveau de l'expression des cytokines inflammatoires par les cellules BV-2 Wt et ACOX1(-/-).....</i>	<i>142</i>
<i>Figure 30: Figure montrant l'activité spécifique de la catalase des cellules BV-2 Wt et ACOX1(-/-).....</i>	<i>143</i>
<i>Figure 31: Figure montrant l'activité de l'oxydation du Palmitoyl- CoA des cellules BV-2 Wt et ACOX1(-/-).....</i>	<i>144</i>
<i>Figure 32: Figure montrant expression protéique de l'ACOX1 et de la Catalase par Western blot dans les cellules BV-2 Wt et ACOX1(-/-).....</i>	<i>145</i>
<i>Figure 33: évaluation du taux d'ARNm des gènes codant pour les enzymes de la peroxydomaux <math>\beta</math>-oxydation peroxydomale dans les cellules BV-2 Wt et ACOX1(-/-).....</i>	<i>146</i>
<i>Figure 34: Évaluation du taux d'ARNm des gènes codant pour les enzymes de la biogenèse des mitochondries et métabolisme énergétique dans les cellules BV-2 Wt et ACOX1(-/-). ...</i>	<i>147</i>
<i>Figure 35:Évaluation du taux d'ARNm du gène codant pour une protéine impliqué dans le stress oxydant dans les cellules BV-2 Wt et ACOX1(-/-).....</i>	<i>148</i>
<i>Figure 36: Evaluation du taux d'ARNm des gènes codant pour les cytokines pro-inflammatoires dans les cellules BV-2 Wt et ACOX1(-/-). ....</i>	<i>149</i>
<i>Figure 37: Évaluation du taux d'ARNm des gènes codant pour les cytokines anti-inflammatoires dans les cellules BV-2 Wt et ACOX1(-/-). ....</i>	<i>149</i>

<i>Figure 38: Évaluation du taux d'ARNm des gènes codant pour les gènes impliqués dans la neuroinflammation dans les cellules BV-2 Wt et ACOX1(-/-).</i> .....	150
<i>Figure 39 : L'activité spécifique relative de la <math>\beta</math>-galactosidase dans les fractions N, MLP et S des cellules BV-2 Wt après une homogénéisation avec 6 passages en Dounce.</i> .....	164
<i>Figure 40: L'activité spécifique relative de la <math>\beta</math>-galactosidase dans les fractions N, MLP et S des cellules BV-2 Wt après une homogénéisation avec 6 passages avec « le système de Blach».</i> .....	164
<i>Figure 41 : L'activité spécifique relative de la <math>\beta</math>-galactosidase dans les fractions N, MLP et S des cellules BV-2 Wt après une homogénéisation avec 20 passages à la Dounce.</i> .....	165
<i>Figure 42: Figure montrant la Structure de Nycodenz .</i> .....	166
<i>Figure 43: Figure montrant le spectre d'absorption de Nycodenz.....</i>	167
<i>Figure 44: La réaction enzymatique de l'oxydation de <math>KMnO_4</math> par le <math>H_2O_2</math>.....</i>	168
<i>Figure 45: Figure montrant la cinétique de la décomposition de <math>H_2O_2</math> par l'homogénat de foie de souris.</i> .....	169
<i>Figure 46 : Figure montrant la courbe dose-activité de la décomposition de <math>H_2O_2</math> par l'homogénat de foie de souris</i> .....	169
<i>Figure 47 : Figure montrant les taux d'oxydation de <math>KMnO_4</math> par les différentes concentrations de <math>H_2O_2</math>.</i> .....	170
<i>Figure 48 : Figure montrant les taux d'oxydation de <math>KMnO_4</math> par les différentes concentrations de <math>H_2O_2</math> en présence de la solution de Nycodenz à 0.25%.....</i>	171
<i>Figure 49: distribution des différentes enzymes caractéristiques des organites cellulaires dans les cellules BV-2 Wt et Acox1-/- après fractionnement subcellulaire.</i> .....	173
<i>Figure 49: distribution des différentes enzymes caractéristiques des organites cellulaires dans les cellules BV-2 Wt et Acox1-/- après fractionnement subcellulaire.</i> .....	174
<i>Figure 50: Distribution des différentes enzymes caractéristiques des organites cellulaires dans les cellules BV-2 Wt et Acox1-/- après fractionnement subcellulaire.</i> .....	175
<i>Figure 51: Distribution des différentes enzymes caractéristiques des organites cellulaires dans les cellules BV-2 Wt et Acox1-/- après fractionnement subcellulaire.</i> .....	176
<i>Figure 52: Distribution des différentes enzymes caractéristiques des organites cellulaires dans les cellules BV-2 Wt et Acox1-/- après fractionnement subcellulaire.</i> .....	177
<i>Figure 53: Distribution des différentes enzymes caractéristiques des organites cellulaires dans les cellules BV-2 Wt et Acox1-/- après fractionnement subcellulaire.</i> .....	179
<i>Figure 54: La distribution de la protéine ACOX1 dans les cellules BV-2 Wt et Acox1 -/- après le fractionnement subcellulaire complet.</i> .....	180

*Figure 55: La distribution de la protéine Catalase dans les cellules BV-2 Wt et Acox1 -/- après le fractionnement subcellulaire complet. ....181*

*Figure 56: Distribution des enzymes dans la fraction L après la centrifugation dans le gradient de densité différentielle de Nycodenz. ....183*

*Figure 57: Distribution des enzymes dans la fraction L après la centrifugation dans le gradient de densité différentielle de Nycodenz. ....184*

*Figure 58: Distribution des enzymes dans la fraction L après la centrifugation dans le gradient de densité différentielle de Nycodenz. ....185*

# Liste des tableaux

---



<i>Tableau 1: Classification des principales maladies et altérations peroxysomales. ....</i>	<i>55</i>
<i>Tableau 2: Altération des paramètres du bilan Biologique peroxysomales.....</i>	<i>56</i>
<i>Tableau 3: Les enzymes peroxysomales contribuant à la production des ROS au cours de leurs réactions qui les catalysent chez les mammifères. ....</i>	<i>68</i>
<i>Tableau 4: Distribution des composés phénoliques dans les différentes parties du cactus (Opuntia ficus indica).....</i>	<i>77</i>
<i>Tableau 5: Composition en acides gras d'Opuntia ficus indica dans la cladode et l'huile de graine de cactus. ....</i>	<i>78</i>
<i>Tableau 6: Distribution du contenu vitaminique dans les différentes parties du cactus (Opuntia ficus indica).....</i>	<i>79</i>
<i>Tableau 7: Distribution des stérols dans les différentes parties du cactus (Opuntia ficus indica).....</i>	<i>80</i>
<i>Tableau 8: Composition minérale des différentes parties du cactus (Opuntia ficus indica). ..</i>	<i>81</i>
<i>Tableau 9: Composition et distribution des acides aminés dans les différentes parties du cactus (Opuntia ficus indica). ....</i>	<i>81</i>
<i>Tableau 11: Le temps de Centrifugation de la suspension cellulaire à 1000g en fonction de son volume. ....</i>	<i>95</i>
<i>Tableau 12: Le temps de centrifugation nécessaire à chaque volume de fraction aux différentes vitesses de centrifugation.....</i>	<i>95</i>

# *Abréviations*

---

## A

AADHAP-R : Acyl/Alkyl-dihydroxyacétone phosphate réductase  
ABC : « ATP-binding cassette »  
ABCD1 : « ATP binding cassette » de la sous famille D  
ACOX1 : Acyl-CoA oxydase 1  
ADHAP-S : Alkyl-dihydroxyacétone phosphate synthase  
ADN : Acide désoxyribonucléique  
ADNc : ADN complémentaire  
AGAT : Alanine/glyoxylate aminotransférase  
AG : Acides Gras  
AGLC : Acide gras à longue chaîne  
AGTLC : Acides Gras à Très Longue Chaîne  
AGPI : Acide Gras Polyinsaturé  
ALDP : « Adrenoleukodystrophy protein »  
AMN : « Adult cerebral adrenomyeloneuropathy »  
AMP : Adénosine monophosphate  
AMPc : Adénosine monophosphate cyclique  
AMPK : « Adénosine monophosphate-activated protein kinase »  
ANT : Adénine Nucléotide Translocase  
ARNm : ARN messenger  
ATP : Adénosine triphosphate

## B

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

## C

CCL : « Chemokine (C-C motif) ligand »  
CDCA : Acide Chénodoxocholique  
CoA : Co-enzyme A  
COX : Cytochrome Oxydase  
CPT-I : Carnitine palmitoyl transférase I  
CPT-II : Carnitine palmitoyl transférase II  
CRAT : Carnitine acétyltransférase  
CRE : « CREB Response Element »  
CREB : « cAMP response element Binding protein »  
CROT : Carnitine octanoyltransférase  
Ct : « Threshold cycle »  
Cu-SOD : Superoxyde dismutase à cuivre  
Cyt c : Cytochrome c

## D

DAB : Di-Amino-benzidine  
DHA : Acide Docohexaénoïque  
DHAP : Dihydroxyacétone phosphate

DHAP-AT : Dihydroxyacétone phosphate acyltransférase  
DHCA : Acide Dihydroxycholestanoïque  
DLP-1 : « Dynamin-Like Protein 1 »  
DMEM : « Dulbecco's modified Eagle medium »  
DMSO : Diméthylsulfoxyde  
Dnmp1 : « DRP-mediated peroxisomal fission »  
D-PBE : D-peroxisomal bifunctional enzyme  
DPBS : D-phosphate Buffer saline  
DRP : « Dynamin-Related Protein »  
DTNB : Acide 5, 5' dithiobis 2-nitrobenzoïque  
DTT : Dithiothréitol

## E

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

## F

FAD : Flavine adénine dinucléotide  
Fis1 : « Mitochondrial fission 1 protein »  
FMN : Flavine mononucleotide

## G

GNPAT : Glycerone phosphate acyltransferase  
GTP : Guanidine triphosphate

## H

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> : Peroxyde d'hydrogène  
HMG : « High mobility group »  
HMGB : « High mobility group box »  
HNF4α : « Hepatic nuclear factor 4 alpha »  
HRP : « Horse Raddish Peroxidase »  
HSP : « Heavy strand promotor »  
HA : huile d'argane  
HC : huile de colza  
HO : huile d'olive  
HGC : huile de graine de cactus

## I

iNOS : « Inducible nitric oxide synthase »

## K

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

## L

LCACS : Acyl-CoA synthétase à longue chaîne

L-PBE :« L-peroxisomal Bifunctional Enzyme »  
LTB4 : Leucotriènes B4

## **M**

MAPL : « Mitochondria-anchored Protein ligase »  
MDVs : Vésicules dérivés de la mitochondrie  
MIM : Membrane Interne Mitochondriale  
mPTS :« Membrane peroxisomal targeting signal »

## **N**

NaCl : Chlorure de sodium  
NAD : Nicotinamide adenine dinucleotide  
NO :Monoxyde d'azote  
NP40 : Nonidet P40  
NRF :« Nuclear Respiratory Factor »

## **P**

PKA : Protein Kinase A  
PMP : Proteine membranaire peroxysomale  
P-NALD : Pseudo-NeonatalAdrenoleukodystrophy  
PP : proliférateurs de peroxysomes  
PPAR $\alpha$  :« Peroxisome Proliferator Activated Receptor  $\alpha$  »  
PRC: poudre de raquette de cactus  
pTH1 :Peroxisome thiolase 1  
PTS :« Peroxisomal Targetting Signal »  
PVDF :« Polyvinylidene fluoride »

PBD :« Peroxisomal biogenesis disorder »  
PEPCK :Phosphoenolpyruvate carboxykinase  
PEX :Peroxine  
PGC: poudre de graine de cactus  
PHYT : Acide phytanique

## **Q**

qPCR : PCR quantitative

## **R**

RE : Réticulum endoplasmique

## **S**

SCP :« Sterol Carrier Protein »  
SCPx : « Sterol Carrier protein x »

# *Introduction*

---

## I. Introduction

Les peroxysomes sont des organites de petite taille qui interviennent dans de nombreuses voies métaboliques et participent au bon fonctionnement cellulaire dans l'organisme grâce à leur contenu comprenant de nombreuses enzymes clés. À l'exemple de la catalase, la plus connue des enzymes peroxysomales, qui a permis à de Duve de découvrir et de définir le peroxysome comme un nouveau compartiment cellulaire. Cette enzyme assure la décomposition de  $H_2O_2$  en  $H_2O$  et  $O_2$ , dont la déficience ou tout défaut en cette enzyme provoque un stress oxydatif. Cependant, d'autres enzymes que la catalase caractérisent également le peroxysome. Parmi les nombreuses oxydases peroxysomales, l'Acyl-CoA oxydase 1 (ACOX1) est une enzyme clé de la voie de la  $\beta$ -oxydation des acides gras à très longue chaîne (AGTLC), assurant au niveau cellulaire la première étape limitante de cette voie métabolique. La déficience en ACOX1 mène à une accumulation des AGTLC au niveau plasmatique et tissulaire, une neuroinflammation et un stress oxydant provoquant ainsi le développement d'une maladie neurodégénérative rare et sévère : la pseudo-adrénoleucodystrophie néonatale (P-NALD). Les mécanismes de cette pathogenèse restent à élucider et actuellement il n'existe pas de traitement pour ce type de maladies neurodégénératives peroxysomales.

Aujourd'hui, certains produits naturels occupent une place importante comme source de micronutriments qui pourraient protéger ou ralentir les dysfonctionnements impliqués dans de nombreuses maladies qu'elles soient neurodégénératives, cardiovasculaires, ou métaboliques. De ce fait, de nombreuses recherches s'intéressent à la caractérisation de molécules naturelles issues, entre autres, de l'arganier (*Argania spinosa*) ou du cactus (*Opuntia-ficus indica*) et ayant potentiellement des pouvoirs antioxydants et anti-inflammatoires protecteurs vis-à-vis du stress oxydant et de l'inflammation.

Depuis plusieurs années, les laboratoires de Biochimie et Neurosciences (à Settat) et BioPeroXIL (à Dijon) mènent des recherches en étroite collaboration sur le cactus *Opuntia-ficus indica* une plante caractérisée par sa capacité d'adaptation aux conditions climatiques arides et semi-arides. Les études menées s'intéressent aux composés présents dans différentes parties de cette plante (polyphénols, vitamines, acides gras polyinsaturés ...etc), pour mieux caractériser ses propriétés bénéfiques pour la santé.

- Dans ce travail de thèse, le premier volet s'intéresse à l'évaluation des effets protecteurs des extraits de la raquette de cactus - *Opuntia ficus indica*- *in cellulo* sur les fonctions peroxysomales après une activation des cellules microgliales par les lipopolysaccharides.
- Le second volet consiste à caractériser et à analyser un modèle d'étude de la neuro-inflammation développé au laboratoire BioPeroXIL. C'est une nouvelle lignée cellulaire microgliale BV-2 présentant une déficience en Acyl-CoA oxydase 1 peroxysomale.

Pour présenter ces deux volets, ce manuscrit de thèse est organisé en cinq chapitres principaux :

- Un premier chapitre est consacré à une revue bibliographique où sont décrits : les peroxysomes ; leur voie de biogenèse ; leurs fonctions biochimiques et métaboliques (comme la voie de la  $\beta$ -oxydation) ; la déficience en ACOX1 et ses conséquences pathologiques ; un aperçu sur la relation entre les peroxysomes et les mitochondries. Cette revue présente aussi le cactus *Opuntia-ficus indica* en présentant ses principales caractéristiques physico-chimiques connues et ses effets bénéfiques pour la santé rapportées dans la littérature.
- Un second chapitre dédié aux Matériels et Méthodes, décrit les différentes méthodes expérimentales utilisées pour la réalisation de ce travail et les conditions de leur réalisation.
- Un troisième chapitre exposant les résultats obtenus à partir de l'étude des effets protecteurs des extraits de la raquette de cactus *Opuntia-ficus indica* sur les fonctions peroxysomales des cellules BV-2 microgliales activées par des lipopolysaccharides.
- Un quatrième chapitre vise à présenter les résultats de la caractérisation des cellules BV-2 déficientes en Acyl-CoA oxydase 1 peroxysomale. Il s'agit de travaux obtenus à partir d'une nouvelle lignée développée au laboratoire par Quentin Raas en utilisant la méthode d'édition génique CRISPR/Cas9. Ce nouveau modèle vise à étudier le rôle de la microglie dans développement de la neuroinflammation dans la déficience en ACOX1.
- Un cinquième chapitre présente les résultats des analyses par centrifugation différentielle et ultracentrifugation sur gradient Nycodenz pour la purification de peroxysomes à partir cellules BV-2 sauvage ou déficiente en ACOX1. Une mise au point du fractionnement des cellules microgliales BV-2 ainsi que l'adaptation d'une

méthode de mesure de l'activité catalase en présence de Nycodenz sont présentées au début de ce chapitre.

- Ce travail de thèse se termine par une partie consacrée à une discussion générale de l'ensemble des résultats présentés, des conclusions et des perspectives de ces travaux.



*Revue*

*Bibliographique*

---

## II. Les peroxysomes

### A. Découverte

Les peroxysomes ont été décrits originellement, par microscopie électronique, et appelés « microbodies » par Rhodin en 1954 en tant qu'organites cellulaires présents au niveau des tubules proximaux des cellules rénales murines. Ces organites se présentent sous forme des granules cytoplasmiques entourés d'une simple membrane contenant une matrice granulaire et un noyau cristallin n'impliquant aucune fonction biochimique connue à l'époque (Rhodin, 1954).

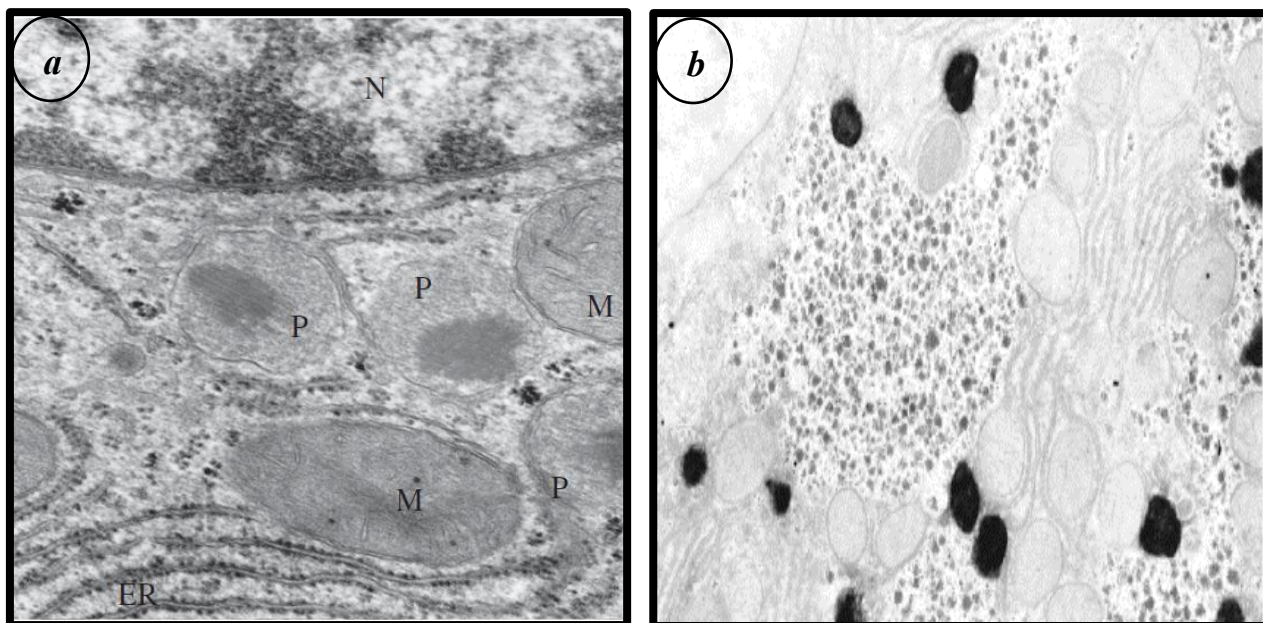
Par la suite, en 1956, l'équipe de Rouiller décrit la même structure dans les hépatocytes de rat (Rouiller et Bernhard, 1956). En 1965, l'équipe de De Duve montrera dans les sections de foie de rat que ces organites ou « microbodies » sont le siège de certaines activités enzymatique impliquant la catalase, l'uricase ou la D-aminoacide oxydase (Baudhuin, Beaufay, et de Duve, 1965). En 1966, après avoir purifié pour la première fois ces microbodies en utilisant des techniques de centrifugation différentielle et de gradient de densité, le terme peroxysome fut inventé par Christian de Duve et Pierre Baudhuin qui ont obtenu différentes fractions enrichies en lysosomes, en mitochondries et en peroxysomes (microbodies). Ainsi, ils découvrirent la première fonction de cet organite capable de décomposer le peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ) en eau ( $H_2O$ ) et en oxygène ( $O_2$ ) grâce à l'activité catalase. Cette découverte des lysosomes et des peroxysomes par De Duve et ses collaborateurs fut couronnée par le prix Noble de médecine attribué à De Duve en 1974.

Le terme « glyoxysome » désigne aussi des peroxysomes spécialisés présents chez les plantes dans les tissus de stockage des graines oléagineuses contenant les enzymes du cycle du glyoxylate capable de convertir les acides gras en glucides nécessaires pour la germination et la croissance des plantes. Ces glyoxysomes présents dans les tissus photosynthétiques réalisent les principales réactions de la photosynthèse (Tolbert et Essner, 1981; Huang, 1983).

Les peroxysomes, présents dans la plupart des cellules eucaryotes sauf dans les érythrocytes et absents chez les procaryotes (Hruban et coll., 1972); sont des organelles subcellulaires ubiquitaires, répondent instantanément aux signaux cellulaires en modifiant ainsi leurs taille, leur nombre, leur morphologie et certaines de leurs fonctions. Les études ultra-structurales ont montré que les peroxysomes se caractérisent morphologiquement comme des particules avec un diamètre allant de 0,1  $\mu m$  à 1,5  $\mu m$  et ils sont délimités par une membrane phospholipidique de 6 à 8 nm d'épaisseur, localisés à proximité du réseau vésiculaire du

réticulum endoplasmique. Chez les rongeurs, les peroxysomes sont des organites dont le corps dense aux électrons visualisés par microscopie électronique nommés « nucléoïde » correspond à l'urate oxydase (Afzelius, 1965 ; Shnitka, 1966). Cependant, dans certains types cellulaires comme l'intestin et le cerveau, le peroxysome est dépourvu de nucléoïde et sa taille ne dépasse pas 0,35  $\mu\text{m}$  méritant ainsi le nom de microperoxysome (Novikoff et Novikoff, 1982).

La caractérisation des peroxysomes a été facilitée par la mise au point d'une technique de coloration cytochimique en 1968 par l'équipe de Novikoff et Goldfisher en utilisant la diaminobenzadine (DAB) permettant dans un milieu à pH alcalin de visualiser ces organites sur la base de l'activité peroxydasique de la catalase (Novikoff et Goldfisher, 1969). Ainsi, Novikoff et son équipe ont observé un grand nombre de peroxysomes dans les tissus actifs dans le métabolisme des lipides tels que le foie, la muqueuse intestinale et le tissu adipeux (Figure 1). Dans ces deux derniers tissus, les peroxysomes sont de petite taille et situés au voisinage des gouttes lipidiques (Novikoff et Novikoff, 1982; Fahimi, 1968; Fahimi, 1969) Initialement, on pensait que la fonction principale des peroxysomes était uniquement représentée par l'activité de la catalase. Cependant, des études ultérieures ont montré que ces structures interviennent dans de nombreuses voies métaboliques à savoir la dégradation des acides gras à très longue chaîne via la voie de la  $\beta$ -oxydation peroxysomale, l' $\alpha$ -oxydation de l'acide phytanique, la participation à la synthèse de certains lipides comme les esters des phospholipides, les plasmalogènes et les acides biliaires (Schrader et Fahimi, 2008).



**Figure 1 : Visualisation des peroxysomes de Foie de rat par microscopie électronique.**

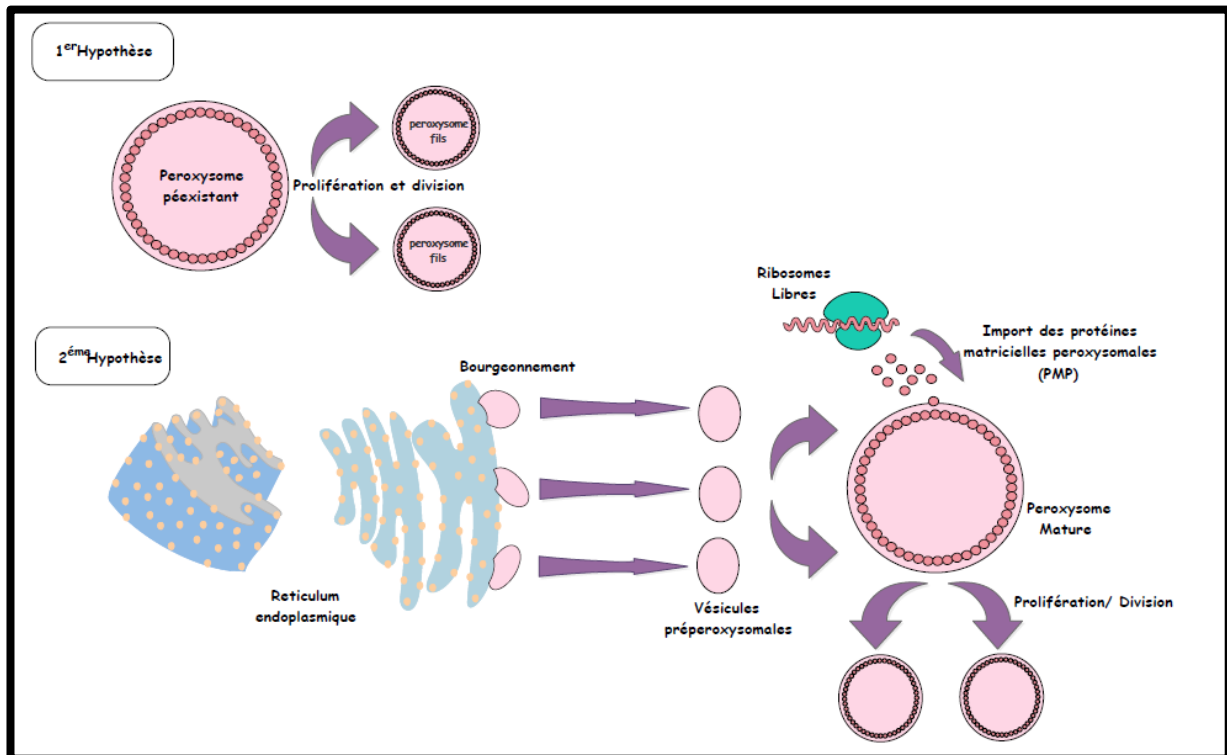
L'image montre une partie d'une cellule hépatique de foie de rat en (a). Les peroxysomes sont indiqués (P) au voisinage des autres organites cellulaires comme : le noyau (N), le réticulum endoplasmique (ER) et les mitochondries (M). D'après (Gabaldón, 2010). (b) image des peroxysomes obtenue par microscopie électronique montre le marquage des peroxysomes hépatiques de Rat avec la DAB (3,30 diamonobenzidine) mettant en évidence l'activité catalase au niveau des peroxysomes présentés sous forme des particules noires. D'après (Gondcaille et coll., 2005).

## B. La Biogenèse du peroxysome

Les peroxysomes sont les principaux acteurs du métabolisme cellulaire et la clé de certains processus physiologiques de tous les organismes vivants. Malgré deux décennies de recherches sur le processus de biogenèse des peroxysomes, l'origine de ces organites reste controversée (Dimitrov. et coll. 2013). Or, la réponse réside dans les processus biochimiques qui entraînent leurs biogenèses (Ma, Agrawal, et Coll., 2011). L'utilisation des levures et d'autres types cellulaires d'origine humaine comme les fibroblastes ont aidé à mieux comprendre la biogenèse et la formation des peroxysomes. Décrire les étapes de biogenèse ainsi qu'identifier l'origine de la membrane peroxysomale a pris plusieurs années de recherches afin de les définir (Geuze et coll., 2003).

La voie de biogenèse des peroxysomes avait été toujours expliquée à travers deux hypothèses : une première hypothèse qui décrivait que les peroxysomes proliféreraient par division des peroxysomes préexistants (Purdue & Lazarow, 2001; Lazarow & Fujiki, 1985), la deuxième hypothèse soutenait que ces organites avait pour origine le réticulum endoplasmique (Geuze et coll., 2003; Titorenko, 2001). Actuellement, le consensus sur les mécanismes de la

biogénèse des peroxysomes repose sur les deux processus, décrits dans les deux hypothèses précédentes, contribuant concomitamment à la croissance et à la prolifération des peroxysomes (Figure 2 (Ma et coll., 2011)).



**Figure 2: Les principales voies de la biogénèse des peroxysomes et la contribution du RE dans ce processus.**

Dans la 1<sup>ère</sup> hypothèse : les peroxysomes sont générés de manière autonome à partir de la division et la prolifération des peroxysomes préexistants. Dans la 2<sup>ème</sup> hypothèse : le processus implique un bourgeoisement du RE suivi de l'import des protéines matricielle peroxysomale pour former des peroxysomes matures et fonctionnels. Schéma adaptée d'après (Lodhi & Semenkovich, 2014).

Comme cis-mentionné, la biogénèse des peroxysomes s'appuyait sur les deux hypothèses : l'hypothèse de la croissance et la division des peroxysomes préexistants pour générer des peroxysomes néoformés ; qui a bénéficié du soutien de plusieurs études. Les preuves expérimentales confirmeraient la deuxième hypothèse montrant que le réticulum endoplasmique contribue à la biogénèse des peroxysomes. Nombre de ces études ont été réalisées chez la levure *Saccharomyces cerevisiae* (Hoepfner, et coll., 2005 ; Terlecky, Terlecky, & Giordano, 2012), qui a servi d'organisme modèle pour étudier les protéines impliquées dans l'élaboration de peroxysomes fonctionnels. (Elgersma & Tabak, 1996). Or, les mécanismes identifiés chez les levures ne sont probablement pas comparables à ceux existants dans les cellules humaines (Smith & Aitchison, 2009). Les premières observations en microscopie

électronique laissent supposer que ces structures seraient issues du bourgeonnement du RE (Tabak, et coll., 2003). Ajouter à cela, la description par Faber et coll., de l'existence d'un comportement vésiculaire pré-peroxysomale qui proviendrait de la membrane nucléaire (Faber, et coll., 2002).

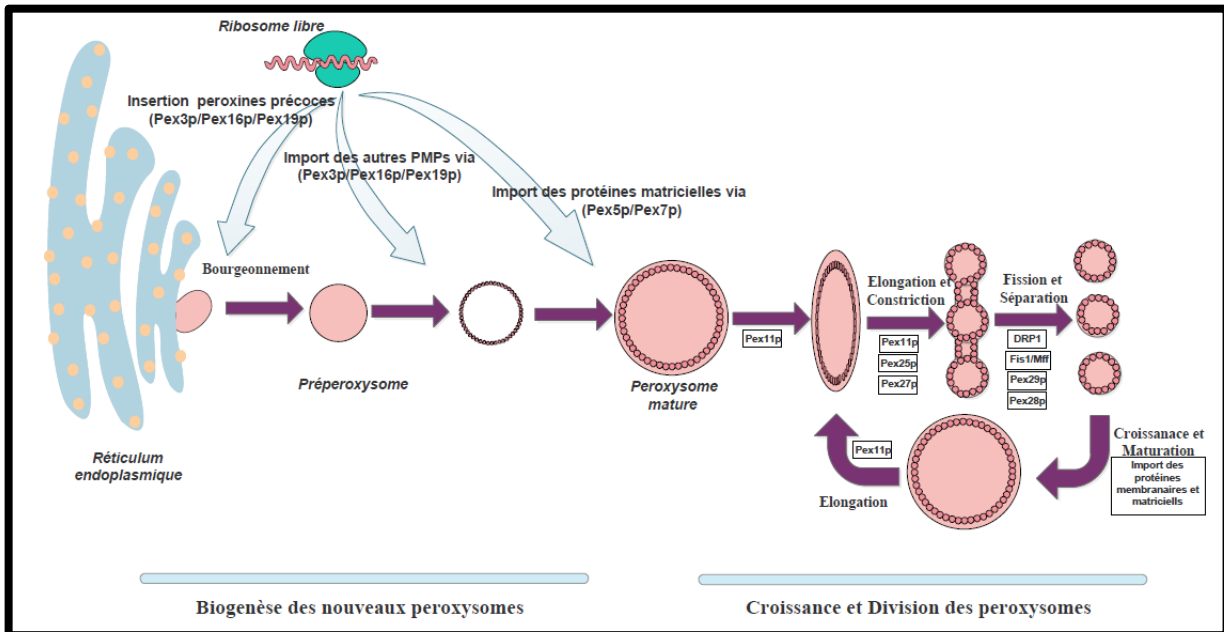
En 1964, l'équipe de Novikoff et Shin montrait déjà par microscopie électronique dans les cellules hépatiques du rat, que les peroxysomes se présentent à proximité du RE ( Novikoff & Shin, 1964). Plus tard, d'autres études montraient également que les peroxysomes seraient entourés du RE lisse et seraient en continuité avec celui-ci dans les cellules intestinales de porc et les cellules hépatiques murines (Novikoff & Novikoff, 1972 ; Hora, et coll., 1990). Ces premières observations confirmeraient donc la deuxième hypothèse.

Généralement, le processus de la biogenèse des peroxysomes implique des protéines spécialisées appelées peroxines. Actuellement, on dénombre 32 peroxines dont au moins 23 peroxines interviennent dans la régulation de la biogenèse des peroxysomes (Brown & Baker, 2008). Ces peroxines sont codées par les gènes dites PEX. Chez l'Homme, une simple déficience ou anomalie de certaines peroxines affectent la biogenèse des peroxysomes et provoques des maladies neurologiques très sévères classées dans la catégorie des désordres liés à la biogenèse du peroxysomes ou PBD « Peroxisome Biogenesis Disorders ».

Une partie des mécanismes impliqués dans la synthèse des nouveaux peroxysomes à partir de la division des peroxysomes déjà existants implique trois peroxines qui ont été caractérisées et identifiées et qui régulent ce phénomène : Pex11p, Pex25p et Pex27p. Alors que les autres étapes n'ont pas été complètement décryptées (Figure 3 (Koch, et coll., 2004)).

Généralement, chez la plupart des espèces étudiées, la peroxine Pex11p intervient dans le remodelage de la membrane peroxysomale et entraine l'élongation de celle-ci avant la fission du peroxysome (Opaliński, et coll., 2011 ;Orth et coll., 2007) (Yoshida, et coll., 2015). Chez les levures déficientes en Pex11p, chaque cellule contient un nombre limité des peroxysomes

de très grande taille tandis que, une surexpression de Pex11p aboutit à une prolifération peroxysomale (Marshall et coll., 1995).



**Figure 3: Modèle globale du processus de la biogenèse, la prolifération et la division des peroxysomes.**

Après un Bourgeonnement à partir des RE, les pré-peroxysomes, contenant les peroxines précoces Pex3p-Pex16p et Pex19p, importent des protéines membranaires peroxysomales via ces trois peroxines à partir du cytosol. La formation d'un peroxysome mature implique Pex5p et Pex7p pour importer des protéines matricielles. Les trois peroxines Pex11p, Pex25p et Pex27p sont les responsables d'un processus d'élongation et de constriction de ce peroxysome. Il subit ensuite une fission sous l'action de la dynamine DRP1 et le complexe Fis1/Mff. Enfin, ces nouveaux peroxysomes se séparent sous l'action de Pex28p et Pex29p. Schéma adapté d'après (Platta et coll., 2007) (Waterham, Ferdinandusse, & Wanders, 2016).

### C. Fonctions métaboliques et biochimiques des peroxysomes

Les peroxysomes contiennent plus de 50 activités enzymatiques différentes et qui sont essentielles aux différents stades de développement. Cependant, certaines de ces activités sont catalysées par des enzymes également présentes dans d'autres compartiments cellulaires (Wanders & Waterham, 2006a; van den Bosch, et coll., 1992). Les peroxysomes sont impliqués à la fois dans les voies métaboliques cataboliques comme : l' $\alpha$ -oxydation et la  $\beta$ -oxydation des acides gras ; et dans les voies anaboliques telles que : la biosynthèse des acides biliaires et de l'acide docosahexaénoïque (DHA).

De plus, les peroxysomes sont fortement impliqués dans le métabolisme des espèces réactives de l'oxygène ou de l'azote couplé en partie à d'autres voies métaboliques peroxysomales. (Wanders & Waterham, 2006a). Une des principales fonctions métaboliques



peroxysomales est le catabolisme des acides gras où la  $\beta$ -oxydation peroxysomale des AGTLC l'une des fonctions qui nous intéresse et qui sera présentée et discutée dans la partie suivante.

### 1. L' $\alpha$ -oxydation des acides gras

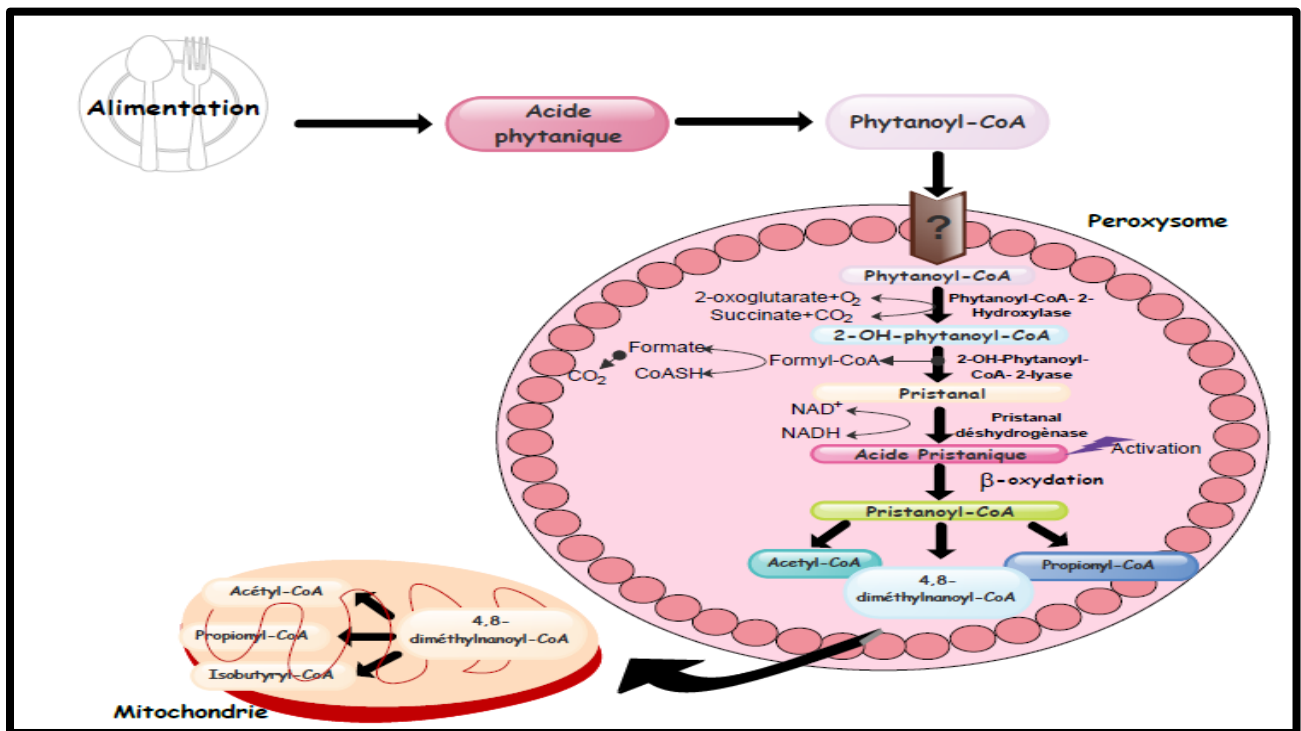
Chez la plupart des organismes, les acides gras contenant un groupe méthyl en position 3, y compris l'acide phytanique, nécessitent pour leur dégradation une  $\alpha$ -oxydation qui se déroule dans les peroxysomes. Ce processus implique ainsi un ensemble d'enzymes entraînant un raccourcissement de la chaîne d'un carbone pour produire un acide gras méthylé en position 2 et qui subit par la suite une dégradation par la voie de  $\beta$ -oxydation peroxysomale (Figure 4). (Van Veldhoven, 2010; Wanders, et coll, 2011)

L' $\alpha$ -oxydation des acides gras implique un mécanisme en 5 étapes qui comprend :

- 1- L'activation d'un acide gras en un acyl-CoA
- 2- L'hydroxylation de l'acyl-CoA en 2-hydroxyl-CoA
- 3- Le clivage du 2-hydroxyl-CoA en un ( $C_{n-1}$ ) aldéhyde plus une molécule de formyl-CoA
- 4- L'oxydation de l'aldéhyde en acide carboxylique correspondant
- 5- La formation d'un ester d'acyl-CoA

Bien que le processus enzymatique impliqué dans l' $\alpha$ -oxydation ait été décrit récemment, l'identification de certaines enzymes de cette voie reste encore à élucider. (Van Veldhoven, 2010)





**Figure 4:** schéma de la voie de l'  $\alpha$  -oxydation de l'acide phytanique chez les mammifères. Schéma adapté d'après (Wanders & Waterham, 2006b).

## 2. Métabolisme du glyoxylate peroxysomale

Les peroxysomes jouent un rôle crucial dans le métabolisme du glyoxylate produit principalement dans le foie humain. Cela est dû au fait que l'enzyme impliqué dans ce métabolisme qui est l'alanine glyoxylate aminotransférase exprimée au niveau hépatique et rénale (à plus faible niveau) (Salido, et coll., 2012).

## 3. Biosynthèse des éthers phospholipides

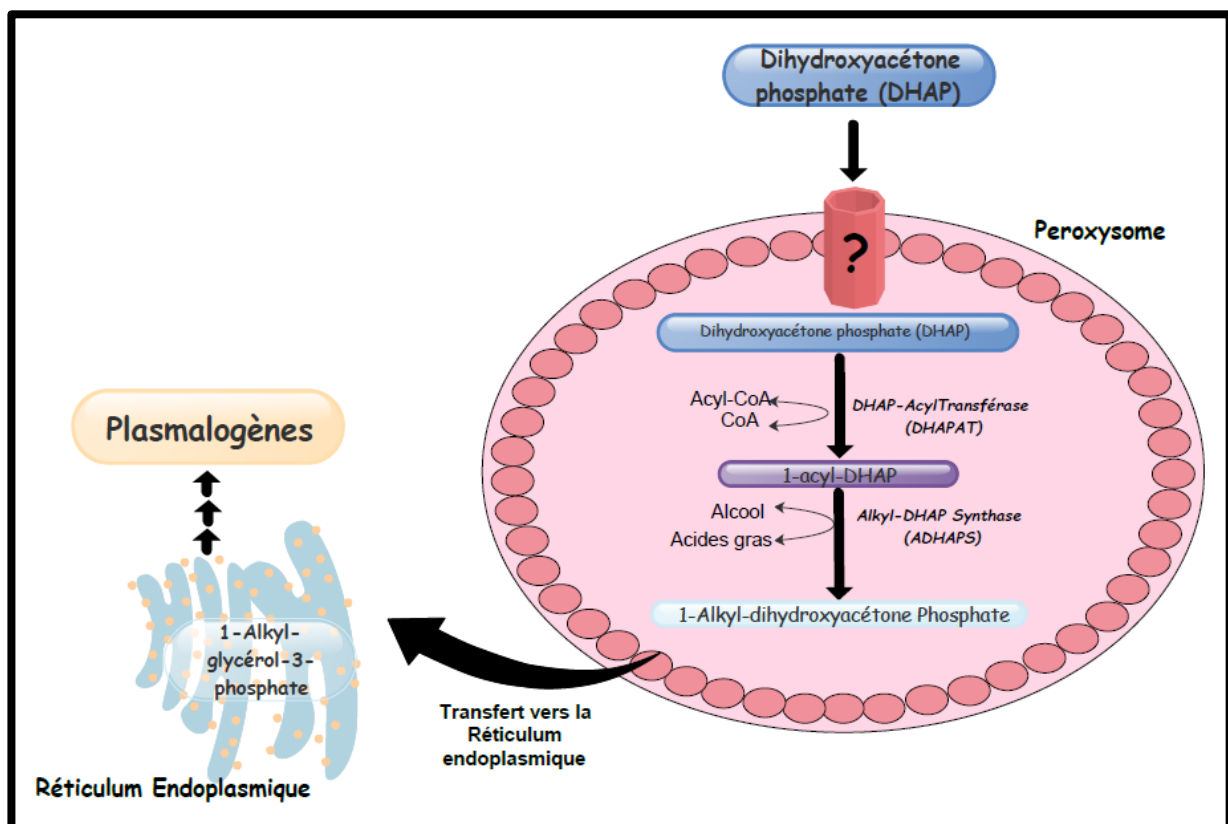
Les éthers phospholipides sont connus par leurs rôles dans l'intégrité de la membrane plasmique. Les plasmalogènes représentent un sous-groupe des éthers phospholipides caractérisées par le groupement vinyl-éther insaturé positionné en sn-1 du squelette glycérol au lieu de la liaison ester à cette même position dans les autres glycérophospholipides.

Les peroxysomes jouent un rôle primordial dans la synthèse des éther-phospholipides, les deux premières réactions sont exclusivement peroxysomales.

La première étape de la biosynthèse des plasmalogènes se fait à partir du dihydroxyacétone phosphate (DHAP) et un acyl-CoA à longue chaîne catalysé par la DHAP acyltransférase peroxysomale produisant un 1-acyl-DHAP (Figure 5). Ensuite, l'acyl gras en sn-

1du acyl DHAP est remplacé par un alcool gras a long chaîne par l'alkyl-dihydroxyacétone phosphate synthase ADHAPS donnant un 1-alkyl-DHAP (Brites, Waterham, & Wanders, 2004).

DHAPAT et ADHAPS forment un complexe lié à la face interne de la membrane peroxysomale. Les produits finaux de la réaction ADHAPS c'est-à-dire l'alkyl-DHAP, sont convertis en alkylglycérol-3P soit dans les peroxysomes soit sur la membrane du RE par une réductase. Toutes les réactions ultérieures de la biosynthèse des plasmalogènes sont catalysées par des enzymes du RE. (Wanders & Waterham, 2006a; Braverman & Moser, 2012; Buchert et coll., 2014).



**Figure 5: Schéma des différentes étapes de la voie de biosynthèse des plasmalogènes et implication des peroxysomes et du Réticulum endoplasmiques.**

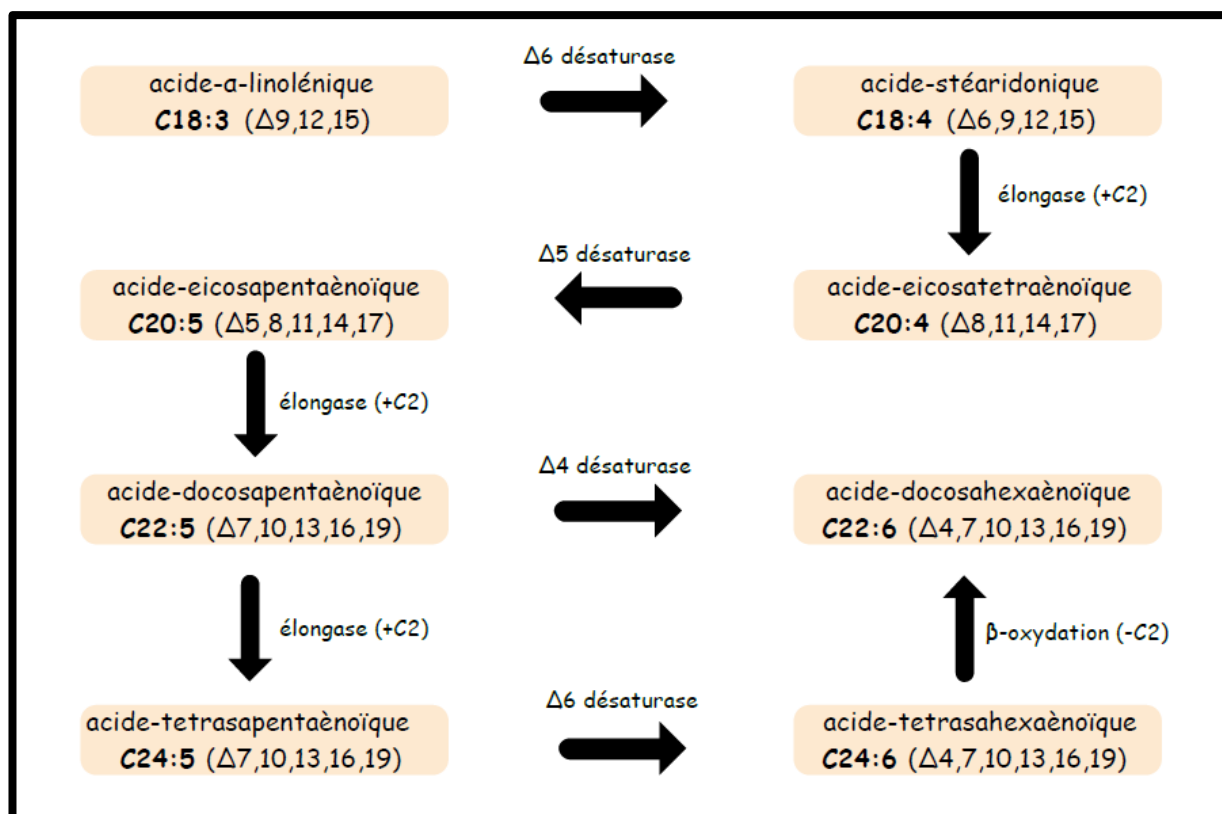
Schéma adapté d'après (Brites et coll., 2004).

#### 4. La biosynthèse de l'acide docosahéxaénoïque (DHA)

Les peroxysomes jouent un rôle primordial dans la biosynthèse de l'acide docosahéxaénoïque (DHA : C22 :6n-3), le membre le plus important dans la famille des acides gras polyinsaturé de la famille des omégas-3.

Le processus de biosynthèse commence par la  $\beta$ -oxydation de l'acide tétracosahéxaénoïque (C24 :6n-3) produit par des réactions successives d'élongation et de désaturation à partir de l'acide linoléique (C18 :3n-3) (Figure 6).

Ce dernier, subit une désaturation et élongation au niveau du RE afin de générer le C24 :6n-3 ; lui-même transporté vers les peroxysomes pour être écourté de 2 atomes de carbone et donner le DHA. Cette dernière étape de la biosynthèse du DHA est catalysée par les enzymes de la voie de  $\beta$ -oxydation peroxysomale. (Wanders, et coll., 2010 ; Van Veldhoven, 2010 ; Ferdinandusse et coll., 2001).



**Figure 6: Schéma récapitulatif des étapes de la synthèse de l'acide docosahéxaénoïque (DHA, C22:6).**

Schéma adapté d'après (Pencreac'h et coll., 2004).

## 5. Métabolisme des éicosanoïdes :

Les éicosanoïdes constituent une grande famille de dérivés d'oxydation des acides gras polyinsaturés ayant 20 atomes de carbones, comme l'acide arachidonique. Ces éicosanoïdes sont des médiateurs de la signalisation cellulaire, connus pour leur rôle dans la régulation du métabolisme cellulaires, et ils sont considérés comme des hormones.

On distingue deux grandes familles des éicosanoïdes : les prostanoïdes qui comprennent les prostaglandines et les thromboxanes et une deuxième famille des leucotriènes comprennent les LTB<sub>4</sub>, synthétisé par les leucocytes et les macrophages (Mayatepek et coll., 1993). Le LTB<sub>4</sub> est d'abord transformé en  $\omega$ -carboxyle-LTE<sub>4</sub> par la voie de  $\omega$ -oxydation microsomiale. Ensuite, ce produit est dégradé par la  $\beta$ -oxydation peroxysomale en  $\omega$ -carboxyle-tétranoir-LTE<sub>3</sub> et enfin, ce dernier est éliminé par les voies biliaire et urinaire. (Ferdinandusse, et coll., 2002)

### D. La $\beta$ -oxydation peroxysomale des acides gras à très longue chaîne AGTLC

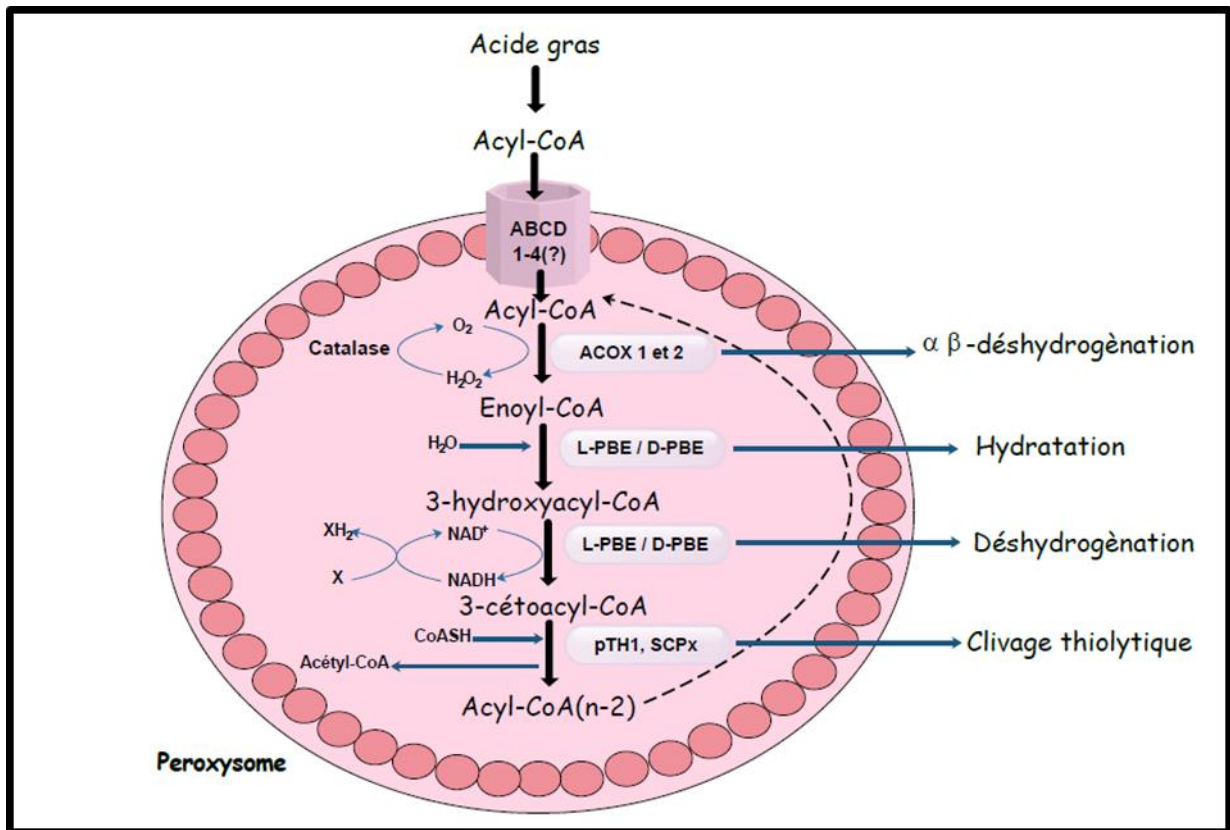
Les peroxysomes jouent un rôle important pour le maintien de l'homéostasie cellulaire par les nombreuses fonctions qu'ils assurent. Parmi lesquelles figure la  $\beta$ -oxydation des acides gras. Chez tous la plupart des organismes, la  $\beta$ -oxydation des acides gras se déroule au niveau mitochondrial. Cependant, chez les mammifères, 20% de ce processus sont assurés par les peroxysomes (Poirier, et coll., 2006). Depuis la mise en évidence de la  $\beta$ -oxydation par l'équipe de De Duve en 1976, de nombreuses avancées ont été réalisées pour la compréhension des mécanismes impliqués dans ce processus oxydatif (Lazarow & De Duve, 1976).

La mitochondrie et le peroxysome jouent chacun un rôle fonctionnellement différent avec une grande complémentarité dans les cellules eucaryotes. En particulier, les peroxysomes permettent l'oxydation des acides gras que les mitochondries ne peuvent pas prendre en charge comme les AGTLC à l'exemple de l'acide lignocérique (C<sub>24</sub>:0) et l'acide cérotique (C<sub>26</sub>:0). Le système de  $\beta$ -oxydation peroxysomale métabolise les AGTLC mais également les acides dicarboxyliques à longue chaîne, les éicosanoïdes, les précurseurs des acides biliaires et certains dérivés des xénobiotiques ( Wanders & Waterham, 2006a; Reddy & Mannaerts, 1994). Les AGTLC subissent plusieurs cycles de la  $\beta$ -oxydation, chaque cycle comprend 4 étapes menant à un raccourcissement de la chaîne de 2 atomes de carbones avec une libération d'une molécule d'acétyl-CoA.

Il faut noter que les AG à courte chaîne ( $C < 6$ ), à chaîne moyenne ( $6 < C < 12$ ) et à longue chaîne ( $12 < C < 22$ ) sont principalement oxydés dans la mitochondrie tandis que les AGTLC ( $C > 22$ ) saturés ou insaturés sont métabolisés exclusivement dans les peroxysomes (Chu et coll., 1995). Les études ont montré que la  $\beta$ -oxydation peroxysomale ne prend pas en charge les acides gras à 8 atomes de carbone et ils sont donc exportés vers la mitochondrie pour subir une  $\beta$ -oxydation complète. (Reddy & Hashimoto, 2001)

La  $\beta$ -oxydation peroxysomale des AGTLC nécessite, après leur activation, le transfert des AGTLC du cytosol vers le peroxysome. La réaction d'activation consiste en la transformation des AGTLC en acyl-CoA et elle est catalysée par une acyl-CoA synthétase.

Une fois activé, l'acyl-CoA est transporté vers le peroxysome via les transporteurs ABC (ATP Binding cassette) de la famille D afin de rejoindre la matrice peroxysomale (Morita & Imanaka, 2012; Kemp, Berger, & Aubourg, 2012). Trois transporteurs ABCD assurent chacun cette translocation grâce à la fixation et l'hydrolyse d'une molécule l'ATP (Roermund, et coll., 2011; Rottensteiner & Theodoulou, 2006). Chez l'Homme, il existe 3 types des transporteurs membranaires peroxysomaux : ABCD1 (ALDP : Adréno-leucodystrophie Protein), ABCD2 et ABCD3 (PMP70) ; qui ont été considérés comme indispensables pour ce transfert des AGTLC (Rottensteiner & Theodoulou, 2006). Le mécanisme de la  $\beta$ -oxydation peroxysomale des AGTLC implique la même série des réactions que la  $\beta$ -oxydation mitochondriale ; réactions catalysées par 3 enzymes : l'acyl-CoA oxydase 1, l'enzyme bifonctionnelle et les thiolases (Figure 7).



**Figure 7: Schéma générale de la voie de la  $\beta$ -oxydation peroxysomale chez l'Homme.**

L'acyl-CoA est écourté de deux atomes des carbones grâce à la présence de 4 enzymes : la famille des ACOXs catalysent la réaction de  $\alpha,\beta$ -déshydrogénation, l'enzyme Bifonctionnelle (L-PBE/D-PBE) catalysent la deuxième et la troisième réactions de cette voie, enfin, les thiolases (SPCx et pTH1) nécessaires pour le clivage thiolique de l'acyl-CoA. L'acyl-CoA ( $C_{n-2}$ ) repasse dans le cycle de la  $\beta$ -oxydation ou quitte le peroxysome vers la mitochondrie pour sa dégradation complète. Schéma adapté d'après (Wanders & Waterham, 2006b).

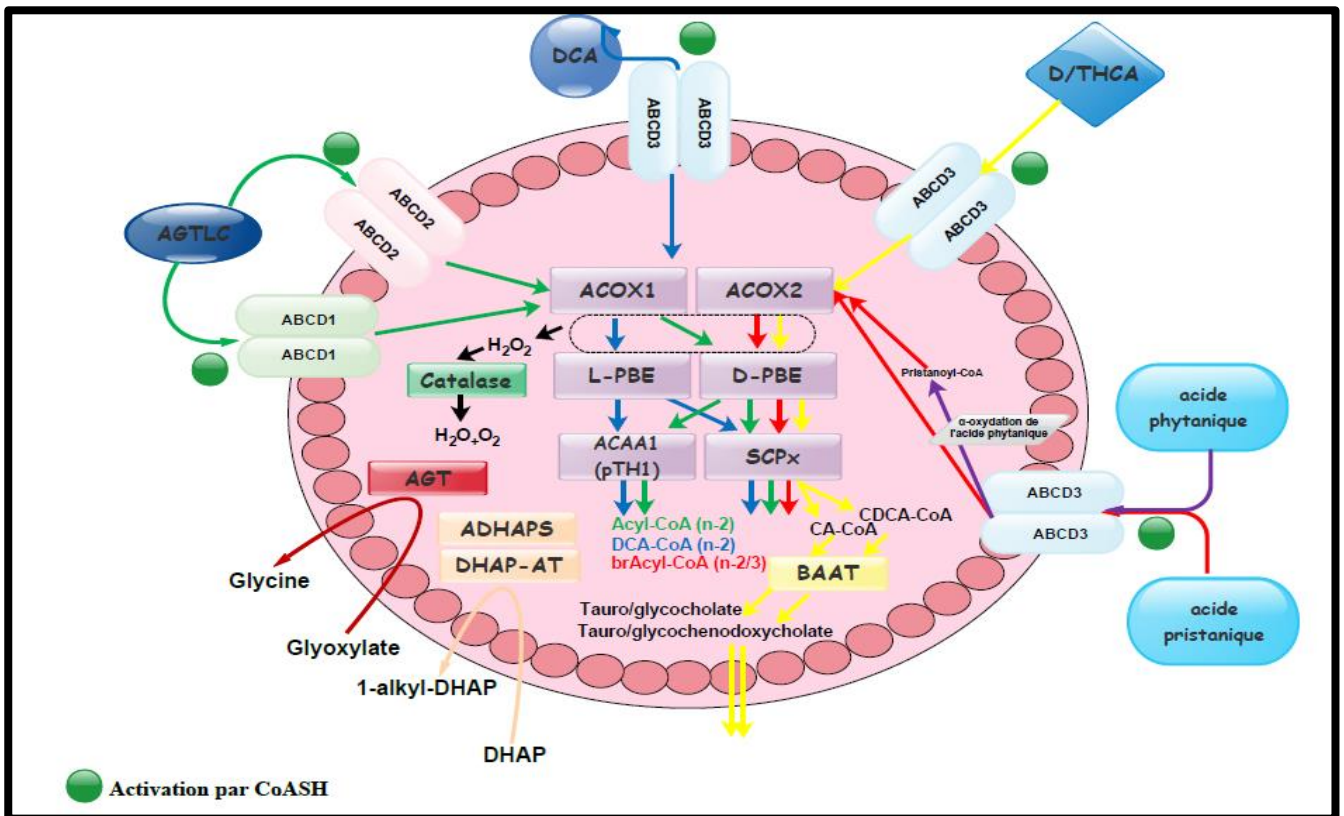
La 1<sup>ère</sup> réaction de ce processus est la déshydrogénation d'acyl-CoA catalysée par l'acyl-CoA oxydase 1, enzyme clé de cette voie de dégradation. La réaction consiste en la transformation de l'acyl-CoA en 2 trans-énoyl-CoA. Dans cette réaction, les électrons de FAD sont directement transférés vers l'oxygène moléculaire générant un peroxyde d'hydrogène. Le  $H_2O_2$  produit au cours de cette réaction sera neutralisé par la suite grâce à l'activité de la catalase.

Ensuite, le 2 trans-énoyl-CoA sera hydraté en 3-hydroxyacyl-CoA, avec 2 configurations L ou D, via respectivement l'une des deux protéines Bifonctionnelles : L-PBE ou D-PBE qui catalysent également la 3<sup>ème</sup> réaction de déshydrogénation (réaction d'oxydo-réduction) permettant la conversion du (D/L)-3hydroxyacyl-CoA en 3-cétoacyl-CoA.

La dernière étape de cette voie consiste à cliver le 3-cétoacyl-CoA par des thiolases peroxysonale afin de libérer une molécule d'acétyl-CoA un acyl-CoA raccourci de 2 atomes de carbones.

Le produit final de la  $\beta$ -oxydation peroxysonale, l'octanoyl-CoA ( $C_8$ ), est transformé en octanoylcarnitine avant de quitter le peroxysonne grâce à la carnitine octanoyl-transférase peroxysonale pour terminer son cycle de  $\beta$ -oxydation au niveau de la mitochondrie. Les acétyl-CoAs seraient ensuite convertis en ester de carnitine par la carnitine acétyl-transférase peroxysonale, leur permettant ainsi d'être ensuite exportés du peroxysonne vers la mitochondrie pour être utilisés dans le cycle de Krebs Contrairement à la  $\beta$ -oxydation mitochondriale qui est directement couplée à la production d'ATP, l'énergie issue des réactions de la  $\beta$ -oxydation peroxysonale des acides gras est dissipée sous forme de chaleur (Wanders & Waterham, 2006a).





**Figure 8: Schéma des principales voies métaboliques assurées par les peroxysomes.**

Ce schéma représente (1) les principales enzymes impliquées dans la voie de  $\beta$ -oxydation peroxysomale des acides gras qui métabolise différents substrats : les acides gras à très longue chaîne (AGTLC), acides dicarboxyliques (DCA) et de l'acide pristanique, qui sont importés dans les peroxysomes par les différents transporteurs de la famille ABCD. (2) l' $\alpha$ -oxydation de l'acide phytanique. (3) Les enzymes impliquées dans la synthèse des plasmalogènes. (4) Les enzymes impliquées dans la synthèse des acides biliaires. (5) L'enzyme peroxysomale impliquée dans la détoxification du glyoxylate et (6) la catalase nécessaire à la dégradation de l' $H_2O_2$ . Schéma adapté d'après (Waterham et coll., 2016).



## E. Aperçu générale sur les enzymes impliquées dans la voie de la $\beta$ -oxydation peroxysomale

### 1. Les Acyl-CoA oxydases

Il existe plusieurs acyl-CoA oxydases désignées différemment selon les espèces. Chez les rongeurs, rat et souris, l'ACOX1 correspondant la palmitoyl-CoA oxydase, l'ACOX2 à la cholestanoyl-CoA oxydase 1 et l'ACOX3 à la pristanoyl-CoA oxydase. De plus, les deux isoformes issues de l'épissage alternatif de l'exon 3a et 3b du gène codant pour l'ACOX1 sont désignées ACO-I et ACO-II.

L'acyl CoA oxydase 1 (ACOX1) est l'enzyme qui catalyse l'étape initiale et limitante de la voie de la  $\beta$ -oxydation peroxysomale. C'est une flavoenzyme homodimérique (Inestrosa, et coll., 1979), composée de deux chaînes polypeptidiques distinctes et chaque sous unités contient une molécule de la flavine adénine dinucléotide (FAD) liée de manière non covalente au polypeptide. ACOX1 appartient à la même famille que les acyl-CoA déshydrogénases mitochondriales. L'absence de l'activité ACOX1 est associée à une maladie peroxysomale sévère la pseudo-adrénoleucodystrophie néonatale (PNALD). (Bhaumik, et coll., 2005)

Chez l'Homme, les acyl-CoA oxydases sont nommées ACOX1 et ACOX2, avec l'ACOX1 qui est présente en 2 isoformes : ACOX1a et ACOX1b résultant d'un épissage alternatif des exons 3a et 3b à partir du même pré-ARNm (Setoyama, et coll., 1995). Parmi toutes ces ACOXs, seule l'ACOX1 est inductible par les proliférateurs de peroxysomes chez les rongeurs. Chez l'Homme, le gène *ACOX1* est localisé au niveau du chromosome 17 sur le bras court au niveau du locus 25 (Varanasi et coll., 1994) . C'est un gène qui s'étend sur 33 Kb avec 15 exons dont 2 exons 3a et 3b et 14 introns.

Différentes études ont montré l'existence de substrats spécifiques à chaque membre de ces ACOXs :

ACOX1 : prend en charge les ester-CoAs linéaires des AGTLC, des xénobiotiques, des éicosanoïdes et des acides dicarboxyliques. (Osumi, et coll., 1980; Vamecq & Draye, 1989)

ACOX2 : réagit avec les intermédiaires des acides biliaires : THCA et DHCA (Casteels, et coll., 1990; Van Veldhoven, et coll., 1992).

ACOX3 : réagit avec les AG ramifiés, acyl-CoA linéaire à longue chaîne (Wanders & Tager, 1998).

Les études menées par Chu et ses collaborateurs ont montré, suite à l'expression de l'ACOX1 humaine dans des cellules d'insecte *Spodoptera frugiperda*, des activités maximales vis-à-vis des AG saturé à longue chaîne allant de C12 jusqu'à C18 mais sans aucune précision sur la nature de l'isoforme concernée (Chu et coll., 1995). En 2007, une étude réalisée dans notre laboratoire a montré une activité optimale de chaque isoformes vis-à-vis du lauroyl-CoA (C12 :0). Les activités de l'ACOX1a sont extrêmement faibles vis-à-vis des AGTLC alors que l'ACOX1b montre une activité vis-à-vis d'un plus large panel de substrats par rapport à l'ACOX1b (Oaxaca-Castillo et coll., 2007).

## 2. Les protéines bifonctionnelles

Deux enzymes bifonctionnelles distinctes sont présentes au niveau du peroxyosome catalysant la 2<sup>ème</sup> et la 3<sup>ème</sup> réactions de la  $\beta$ -oxydation peroxyosomale : la L-PBE spécifique de l'énantiomère L et D-PBE spécifique de l'énantiomère D du 3-hydroxyacyl-CoA. La L-PBE est une protéine de 79 KDa inductible par les proliférateurs de peroxyosome, la D-PBE est une protéine de 77 KDa (Caira, et coll., 1995; Mori, et coll., 1991; Möller et coll., 1999). Les deux enzymes prennent en charge les énoyl-CoAs avec une chaîne linéaire, tandis que la D-PBE prend en charge aussi bien l'énoyl-CoA de l'acide pristanique et les intermédiaires des acides biliaires. (Caira et coll., 1998; Dieuaide-Noubhani, et coll., 1997; Dieuaide-Noubhani et coll., 1996; Jiang, et coll., 1997; Qin et coll., 1997).

## 3. Les thiolases

Les thiolases sont des enzymes responsables de la dernière étape de la  $\beta$ -oxydation peroxyosomale des AGTLC responsable du clivage du 3-cétoacyl-CoA avec la libération d'un acyl-CoA écourté de 2 atomes de carbones et d'un acétyl-CoA.

Chez l'Homme, deux thiolases existent :

pTH1 : est une protéine de 41 KDa spécifique de 3-cétoacyl-CoA à chaîne linéaire et inductible par les proliférateurs de peroxyosome (Hashimoto, 1996).

pTH2 : dite aussi SCPx, est une protéine de 58 KDa spécifique de 3-cétoacyl-CoA à chaîne linéaire ramifiée, du THCA et du DHCA et non-inductible par les proliférateurs de peroxyosome. (Busquets et coll., 1998)

## F. Les pathologies liées aux fonctions peroxysomales

Les peroxysomes sont des organites d'une grande importance au sein de la machinerie cellulaire. Ils sont indispensables pour le maintien d'une vie normale.

Les fonctions qu'ils leur assurent telles que : la  $\beta$ -oxydation des AGTLC, l' $\alpha$ -oxydation et la biosynthèse des plasmalogènes et les intermédiaires des acides biliaires leur confèrent des propriétés uniques qui soulignent le rôle essentiel de cet organite cellulaire.

Ce rôle est révélé par les défauts de formation des peroxysomes ou par l'altération de ses fonctions enzymatiques et biochimiques générant de nombreuses pathologies. Ces maladies pouvant être classées en 2 classes principales en fonction de la déficience associée (Tableau 1 et Tableau 2) on distingue ainsi :

- Les pathologies liées aux déficiences enzymatiques peroxysomales.
- Les pathologies liées aux troubles de la biogenèse des peroxysomes.

**Tableau 1: Classification des principales maladies et altérations peroxysomales.**

Tableau adapté d'après (Ronald J. A. Wanders, 2013) (Astudillo, Sabourdy, Touati, & Levade, 2016).

Type de la maladie	Nom de la maladie	Abréviation	MIM	Mode de transmission	Gène(s) muté(s)	Fonction de la protéine en cause
Défauts de la biogenèse	Syndrome de Zellweger	<b>ZS</b>	214100	Autosomique Récessif	<b>PEX1 à3, PEX 5-6, PEX10 à 14, PEX 16, PEX19, PEX26</b>	Import des protéines peroxysomales et la biogenèse des peroxysomes
	Adrénoleucodystrophie néonatale	<b>NALD</b>	214110			
	Maladie de Refsum infantile	<b>IRD</b>	202370			
	Chondrodysplasie ponctuée rhizomélique de type 1	<b>RCDP-1</b>	215100			
Défauts isolés	Adrénoleucodystrophie liée à l'X	<b>X-ALD</b>	300100	Lié à l'X	<b>ABCD1</b>	Transport des AGTLC dans le peroxysome
	Déficit en acyl-CoA oxydase	<b>Déficience en ACOX</b>	264470	Autosomique Récessif	<b>ACOX1</b>	$\beta$ -oxydation peroxysomale (1 <sup>er</sup> réaction)
	Déficit en protéine D-Bifonctionnelle	<b>Déficience en D-PBE</b>	261515		<b>HSD17B4</b>	$\beta$ -oxydation peroxysomale (2,3 <sup>ème</sup> réaction)
	Maladie de Refsum	<b>ARD/CRD</b>	266500		<b>PHYH/PEX7</b>	Hydroxylation de l'acide phytanoyl-CoA ( $\alpha$ -oxydation)
	Déficit en 2-méthylacyl-CoA racémase	<b>Déficience AMACR</b>	604489		<b>AMACR</b>	Conversion des stéréoisomères R des AG ramifiés et des précurseurs des acides biliaires en stéréoisomères S
	Déficit en thiolase des acyl-CoA ramifiés	<b>LKDMN</b>	613724		<b>SCP2</b>	$\beta$ -oxydation peroxysomale (4 <sup>ème</sup> réaction)
	Chondrodysplasie ponctuée rhizomélique de type 2	<b>RCDP-2</b>	222765		<b>GNPAT</b>	Biosynthèse des plasmalogènes (1 <sup>er</sup> réaction)
	Chondrodysplasie ponctuée rhizomélique de type 3	<b>RCDP-3</b>	600121		<b>AGPS</b>	Biosynthèse des plasmalogènes (2 <sup>ème</sup> réaction)
	Hyperxalurie de type 1	<b>PH-1</b>	259900		<b>AGXT</b>	Transaminastion du glyoxylate
	Acatalasémie	<b>*****</b>	115500		<b>CAT</b>	Dégradation du peroxyde d'hydrogène
	Hypercholanémie	<b>Déficience BAAT</b>	607748		<b>BAAT</b>	Conjugaison des acides biliaires à la glycine ou la taurine

**Tableau 2: Altération des paramètres du bilan Biologique peroxysomales.**

Le tableau montre les conséquences touchant certaines paramètres biologiques. Abréviations : N : taux normale ; ↗ : taux augmenté ; N-↗ : taux normal a augmenté; \*\*\*↗ : taux pas augmenté chez tous les patients ; ↘ : taux diminué. À noter que les paramètres présentés dans ce tableau sont normaux chez les patients atteints de l'hyperoxalurie et l'Acatalémie. D'après (Astudillo et coll., 2016).

Paramètres Biologiques	Défauts de la Biogenèse des peroxysomes				Défauts isolés	
	MALADIE	Spectre du syndrome de Zellweger	Déficit en Acyl-CoA oxydase	Déficit en protéine bifonctionnelle	Chondrodysplasie ponctuée rhizomélique de type 1	Adrénoleuco-dystrophie liée à l'X
AGTLC plasmatique	↗	↗	↗	N	↗	N
Acide pristanique plasmatique	N-↗	N	N-↗	N	N	N
Acide phytanique plasmatique	N-↗	N	N-↗	N-↗	N	↗
DHCA et THCA plasmatique	↗	N	***↗	N	N	N
Plasmalogènes érythrocytaires	↘	N	N	↘	N	N
Peroxisomes	Absents	Anormaux	Anormaux	Présents	Présents	Présents

### 1. Les pathologies liées aux déficiences enzymatiques peroxysomales

Ce sont des maladies causées par l'altération de la fonction d'une protéine/enzyme peroxysomale, on distingue :

- Maladies de la  $\beta$ -oxydation peroxysomale des acides gras
- Maladies de l' $\alpha$ -oxydation peroxysomale des acides gras
- Maladies du métabolisme peroxysomal du glyoxylate
- Maladies de la biosynthèse des éthers phospholipidiques
- Maladies de la synthèse des acides biliaires

a) *Maladies de la  $\beta$ -oxydation peroxysomale des acides gras*

(1) *Adrénoleucodystrophie lié à l'X (X-ALD)*

L'X-ALD est causée par des mutations du gène ABCD1 codant pour le transporteur ABC (ATP Binding Cassette) de la famille D qui prend en charge l'import des acyl-CoA des AGTLC au niveau du peroxysome. L'X-ALD est la maladie peroxysomale la plus fréquente dont la prévalence est de 1 pour 17000 naissances. Elle est liée à l'X touchant donc principalement les hommes, bien que les femmes développent des symptômes cliniques (Kemp et coll., 2012; Engelen, et coll., 2014; Engelen, et coll., 2014).

Les patients X-ALD expriment une protéine ABCD1 non fonctionnelle, ne pouvant pas importer les AGTLC et permettre leur oxydation par la suite dans le peroxysome. Ceci se traduit par l'augmentation du taux des AGTLC au niveau plasmatique (Ofman et coll., 2010; Schackmann, et coll., 2015). Deux phénotypes principaux de l'X-ALD sont décrits :

- 1- La forme cérébrale démyélinisante (dite adrénoleucodystrophie) : c'est la forme la plus fréquente chez les enfants en bas âge entre 5 et 12 ans mais qui peut toucher 35% des adultes (Engelen et coll., 2012; Kemp et coll., 2012). Cette forme de l'X-ALD est associée à une inflammation de la substance blanche cérébrale avec une insuffisance corticosurrénale et une atteinte neurologique. Les patients atteints de cette maladie présentent des troubles de comportement en rapport avec l'attention et les émotions. Chez 80% des patients les lésions démyélinisantes touchent la substance blanche des lobes frontaux, avec une atrophie corticale et le développement d'une neuro-inflammation (Poll-The & Gärtner, 2012).
- 2- La forme limitée à la moelle épinière (dite adrénomyéloneuropathie ou AMN) : C'est la forme la plus fréquente chez l'adulte dont les symptômes apparaissent entre l'âge de 20 à 50 ans. Les patients atteints de l'AMN ont des troubles d'équilibre, avec une atteinte cérébrale démyélinisante caractérisée par une neuropathie périphérique et cérébrale et le développement des troubles de la mobilité et de la parole. Elle s'accompagne d'une insuffisance corticosurrénale (Poll-The & Gärtner, 2012). Les femmes porteuses peuvent développer une myélopathie progressive et une neuropathie périphérique mais à un âge plus avancé que les hommes (Engelen, et coll., 2014).

L'X-ALD reste l'une des rares maladies pour laquelle une thérapie est disponible à savoir une greffe allogénique des cellules souches hématopoïétiques à un stade précoce qui

prévient la progression de la maladie tandis que cette approche n'est pas valable chez les patients atteints de l'AMN (Cartier et coll., 2009) .

### (2) Déficience en acyl-CoA oxydase 1

La déficience en ACOX1 (OMIM #264470) anciennement appelée pseudo-adrénoleucodystrophie néonatale est l'un des plus rares déficits peroxysomaux avec seulement 30 patients identifiés et décrits dans le monde (Carrozzo et coll., 2008). Elle est provoquée par des mutations du gène *ACOX1* codant pour acyl-CoA oxydase peroxysomale. ACOX1 étant impliqué dans le processus de la  $\beta$ -oxydation des AGTLC linéaires. Cette déficience provoque une augmentation des taux des AGTLC dans le plasma, les cellules et les tissus avec une diminution du nombre des peroxysomes fonctionnels dans les tissus. Les patients atteints de cette déficience présentent des symptômes cliniques variable, allant de l'apparition d'une hypotonie musculaire néonatale, des lésions de la substance blanche, une hépatomégalie avec une perte neurosensorielle et une insuffisance rénales (Ferdinandusse et coll., 2007; Wanders, et coll., 1993; Ferdinandusse et coll., 2010).

### (3) Déficience en enzyme D-bifonctionnelle

La déficience en protéine D-bifonctionnelle (OMIM #261515) est causée par des mutations du gène *HSD17B4* codant pour la 17- $\beta$ -estradiol déshydrogénase, l'enzyme qui catalyse la 2<sup>ème</sup> et la 3<sup>ème</sup> réactions de  $\beta$ -oxydation (Wanders,et coll., 1992). Un défaut de la D-PBE provoque une augmentation du taux des AGTLC, l'acide pristanique et des acides biliaires au niveau plasmatique (McMillan et coll., 2012). Cette déficience provoque une maladie autosomique récessive sévère et la plupart des patients décèdent avant l'âge de 2 ans. Ces patients présentent cliniquement un retard psychomoteur, une dysmorphie carniofaciale, des troubles visuels avec une démyélinisation cérébrale (Ferdinandusse et coll., 2006; Lines et coll., 2014). Récemment, plusieurs patients adultes ont été identifiés grâce au séquençage complet des exons codant pour cette enzyme (Lines et coll., 2014; Lieber et coll., 2014).

### (4) Déficit des activités thiolases

Une mutation au niveau du gène *SCP2* (MIM #613724) qui code pour l'une des thiolases qui catalysent la dernière réaction de la  $\beta$ -oxydation peroxysomale. Une déficience de ces thiolases contribue à la présence des taux élevés de l'acide pristanique et des acides biliaires dans le plasma, sans variation du taux des AGTLC linéaires. Un seul patient a été décrit avec cette déficience apparu tardivement. Cette déficience se traduit par une encéphalopathie et neuropathie motrice et périphérique (Ferdinandusse et coll., 2006).

## G. Conséquences physiopathologiques de la déficience en Acyl-CoA oxydase 1

### 1. Chez l'homme

L'histoire de la P-NALD remonte à 1988 quand Poll-The et ses collaborateurs ont décrit pour la première fois cette maladie chez deux patients : frère et sœur nés des parents consanguins souffrant d'hypotonie musculaire, de retards mental et psychomoteur ainsi que des troubles de la vision et de l'ouïe. Généralement, les patients décèdent vers l'âge de 5 ans. Chez ces patients une délétion d'environ 17Kb du gène ACOX1 a été démontrée par analyse d'ADN génomique en Southern blot ( Poll-The et coll., 1988).

Une étude réalisée par l'équipe de Suzuki en 2002 chez trois patients japonais présentant cette déficience a permis d'identifier, après des analyses moléculaires, deux nouvelles mutations faux sens : Met278Val et Gly178Cys (Suzuki et coll., 2002). Les mutations détectées chez les patients qui ont été décrits au niveau de l'ACOX1 affectent généralement le site de liaison de l'ACOX1 avec son Cofacteur FAD ou bien des délétions portant sur de large partie du gène (Funato et coll., 2006). Des études au niveau cérébral chez les patients déficients en ACOX1 montreraient une réduction du nombre de neurones et une atrophie cérébrale sans démyélinisation. De plus, la présence de calculs rénaux d'oxalate de calcium pourrait être à l'origine d'une insuffisance surrénalienne (Poll-The et coll., 2004).

Une autre étude menée par Carrozo et son équipe sur un enfant présentant un déficit en ACOX1 a identifié une délétion homozygote de 15,5Kb dans ce gène. Né de parents italiens consanguins, ce patient montrait un phénotype sévère avec une absence de développement de la motricité, des crises épileptiques, une tétraplégie spastique, un retard mental sévère et une atrophie optique (Carrozzo et coll., 2008).

Jusqu'en 2008, tous les patients décrits atteints de la déficience en ACOX1, avec différentes mutations au niveau du gène de l'ACOX1, présentent une symptomatologie commune : une démyélinisation de la matière blanche cérébrale avec une accumulation des AGTLC C26 :0 dans le plasma et les tissus avec un rapport de C26:0/C22 :0 ou C24:0/C22:0 très élevé. Ces patients montraient des pertes progressives des fonctions motrices à partir de 28 mois en moyenne et l'âge moyen de décès était de 5 ans avec une patiente qui a survécu jusqu'à l'âge de 19 ans. Cette maladie peut survenir également à tout âge, rester stable ou être progressive (Barth et coll., 2004).



## 2. Chez la souris

Le rôle biologique du système de  $\beta$ -oxydation peroxysomal des AGTLC a été étudié chez les souris *Acox1*<sup>-/-</sup> qui ne présentent pas l'expression de la protéine ACOX1. Ces souris sont viables avec un retard de croissance et une stérilité (infertilité), mais ne présentent pas d'atteinte cérébrale. Les souris *Acox1*<sup>-/-</sup> montrent une accumulation des AGTLC dans le plasma, résultat à la fois d'une synthèse accrue et d'une dégradation altérée (Fan et coll., 1996).

Les études menées chez les souris *Acox1*<sup>-/-</sup> ont montré qu'au cours des trois premiers mois, ces souris présentent au niveau hépatique une prolifération des peroxysomes avec des taux élevés des ARNm des gènes codants la thiolase ou l'enzyme Bifonctionnelle. Tandis qu'au cours du 3<sup>ème</sup> et 4<sup>ème</sup> mois, ces souris présentent une grave métamorphose graisseuse au niveau des hépatocytes avec peu ou pas de peroxysomes. Une stéatose hépatique sévère avec une régénération hépatocellulaire a été observée chez les souris âgées de 5 mois. Au cours du 6<sup>ème</sup> et 7<sup>ème</sup> mois de vie, les hépatocytes sont remplacés par des cellules stéatosiques avec une prolifération spontanée des peroxysomes (Fan et coll., 1996). Ces souris développent des adénomes et des carcinomes hépatiques en raison de l'activation prolongée du PPAR $\alpha$ . Cette hyperactivation du PPAR $\alpha$  augmente la sévérité de stéatoses hépatiques (Hashimoto et coll., 1999; Fan et coll., 1998).

D'autres études ont montré également que les souris déficientes en *Acox1*<sup>-/-</sup> présentent une accumulation des AGTLC (C24:0) et (C26:0), une stéatohépatite avec une augmentation des taux hépatiques de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> et une régénération hépatocellulaire accompagnée d'une prolifération massive des peroxysomes. Ceci déclenche un stress du RE et un dysfonctionnement métabolique de ce compartiment cellulaire (Huang et coll., 2011).

### H. Déficience en ACOX1 et inflammation

Les deux maladies neurodégénératives peroxysomales déficience en ACOX1 et X-ALD se caractérisent par l'accumulation des AGTLC (C24:0 et C26:0) dans le plasma et dans les tissus. La démyélinisation de la matière blanche cérébrale au niveau du système nerveux centrale est un processus qui se développe dans les deux maladies. Actuellement, les mécanismes de la pathogenèse de ces leucodystrophies peroxysomales associent une accumulation importante d'AGTLC avec un processus plus ou moins rapide de démyélinisation menant à des retards du développement. Plusieurs travaux ont permis d'éclaircir ce processus qui est caractérisé par une infiltration majeure de lymphocytes TCD8<sup>+</sup>, de lymphocytes B et des macrophages vers des zones de démyélinisation suite à la rupture de la barrière hémato-

méningée. Powers et ses collaborateurs ont mis en évidence la présence de macrophages et des astrocytes dans les zones actives de démyélinisation ainsi que les lymphocytes T présents autour des vaisseaux à l'intérieure de la zone de la démyélinisation (Powers, et coll., 1992). D'autres études suggèrent que l'accumulation des AGTLC stimule les astrocytes et les macrophages qui secréteraient du TNF $\alpha$  et des cytokines conduisant à la destruction de la myéline par les lymphocytes T et B (Ito et coll., 2001).

Les travaux menés par McGuinness et ses collaborateurs et l'équipe de Singh sur des lésions cérébrales de patients atteints d'X-ALD, par des analyses par puce à ADN et par RT-PCR, ont montré une augmentation de l'expression de TNF $\alpha$ , des interleukines IL-1 $\alpha$ , IL-6 et IL-12 et des chimiokines CCL2, CCL4, CCL7, CCL11, CCL16 et CCL21 ainsi que leurs récepteur CXCL1 et CXCL3. Il a été également noté une hypertrophie et une hyperplasie des astrocytes au niveau des lésions cérébrales ainsi qu'une augmentation du taux des esters de cholestérol et une diminution du taux de cholestérol libre et des sphingomyélines. Ceci suggère une altération des radeaux lipidiques (rafts) composés des sphingomyélines et du cholestérol. Il en résulte une déstabilisation des membranes aboutissant au relargage des fragments myéliniques anormaux contenant des AGTLC. Ces derniers activeraient les astrocytes et la microglie qui secréteraient des cytokines et des chimiokines déclenchant ainsi une réponse inflammatoire permettant l'infiltration des leucocytes dans la matière blanche cérébrale (McGuinness et coll., 1997; Paintlia et coll., 2003). Eicher et son groupe ont montré que dans la phase précoce de l'évolution des lésions cérébrales l'existence de cellules microgliales en apoptose dans la zone adjacente à la zone de démyélinisation diminuerait leurs capacités de neuro-protection et provoquerait des dommages au niveau des oligodendrocytes (Eichler et coll., 2008).

De nombreuses études ont montré l'implication des cytokines dans les désordres neurologiques, en particulier dans le cas de l'X-ALD. L'augmentation des niveaux d'AGTLC précède largement la démyélinisation de la substance blanche dans la P-NALD et la réponse neuro-inflammatoire dans l'X-ALD. Même s'il est bien connu que les deux maladies P-NALD et X-ALD sont associées à l'accumulation des AGTLC, le rôle direct des AGTLC dans l'induction de processus inflammatoire est toujours hypothétique. Pour essayer de comprendre cette relation El Hajj et collaborateurs ont montré que des fibroblastes témoins traités avec l'acide cérotique C26:0 présentaient une évolution de l'expression des cytokines (IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$  et IL-6) en fonction du temps (El Hajj et coll., 2012). Une induction de l'expression de l'ARNm codant les cytokines, IL-1 $\alpha$  et IL-1 $\beta$ , était déjà présente entre 6h et 12h de traitement.

En revanche, 6h plus tard, les niveaux d'expression d'ARNm de l'IL-1 $\beta$  revenaient à la normale. Ainsi, le C26:0 semble réguler simultanément et séquentiellement le taux d'ARNm de cytokines. Cette régulation dans les fibroblastes est probablement liée au fait que les cytokines comme l'IL-1 $\beta$  sont en mesure d'accroître l'accumulation des AGTLC par inhibition de la  $\beta$ -oxydation peroxysomale du C26:0 par un mécanisme inconnu. Cela peut provoquer un cercle vicieux dans lequel l'acide cérotique C26:0 déclenche plus tôt l'expression des ARNm codant ces cytokines qui régule à la baisse la  $\beta$ -oxydation peroxysomale conduisant à l'accumulation des AGTLC ; Ceux-ci à leur tour favorisent la ré-induction des transcrits de cytokines au cours d'une deuxième phase tardive.

L'effet de l'accumulation des AGTLC dans la démyélinisation liée à la déficience en ACOX1 reste à déterminer, ainsi que leur capacité à induire une réponse de la  $\beta$ -oxydation peroxysomale dans l'homéostasie cellulaire. Les résultats de l'étude d' El Hajj et coll. montrent que la déficience en ACOX1 dans la P-NALD est associée à des modifications significatives de la réponse inflammatoire conduisant à l'activation de la voie de IL-1 $\beta$  (El Hajj et coll., 2012).

## I. Rôle de la microglie dans le cerveau et le processus inflammatoire

Le cerveau se compose principalement de deux grandes catégories de cellules : les neurones et les cellules gliales « également connues sous le nom de glie ou névroglie ». Ces cellules gliales composent entre 5% et 10 % des cellules du système nerveux central. Elles existent en plusieurs types assurant plusieurs fonctions critiques, comme le soutien structural, le soutien métabolique et la protection des neurones. On divise les cellules gliales en deux types : la microglie et la macroglie (astrocyte, oligodendrocyte ...)(Kettenmann, et coll., 2011).

Les cellules gliales dont fait partie la microglie furent décrites pour la première fois en 1846 par Rudolf Virchow comme étant une substance adhésive liant les neurones. Cependant, il faudra attendre le développement de nouvelle méthode de fixation et d'imprégnation du cerveau pour découvrir et à terme différencier les cellules gliales telles que nous les connaissons aujourd'hui (Tremblay, et coll., 2015). Grâce à la technique de marquage à base des tanins et de nitrate d'argent ammoniacal, il a été possible de décrire et de différencier deux types cellulaires parmi la microglie : les cellules allongés phagocytes non fibreux, adipeux et granulaire et des cellules étoilées fibreuses et pourvue de terminaisons au niveau de vaisseaux sanguins qui correspondent aujourd'hui respectivement aux microglies et aux astrocytes. Dès lors, il a été admis que des dysfonctions gliales pourraient être à l'origine de maladies cérébrales, opposant ainsi les notions de gliopathie et de neuropathie (Achucarro, 1913).

La microglie est capable d'adapter sa morphologie aux structures nerveuses qui l'entourent, ce qui suggère une capacité migratoire et une structure dynamique. C'est dans la pathologie que la microglie joue son rôle en passant d'une forme sédentaires ramifiée (en repos) à une forme amiboïde activée capable de migrer et de phagocyté des débris cellulaires (active).

Durant plusieurs années, l'activation microgliales dans les différentes conditions pathologiques ou après induction artificielle a été étudiée en suivant le concept « d'état de repos » et « d'état activé » (Kettenmann et coll., 2011). De nombreuse molécules et conditions peuvent induire l'activation microgliales qui sont capables d'altérer l'intégrité structurelle et fonctionnelle du SNC. Ces cellules sont capables de reconnaître et de réagir à une grande variété de signaux témoins de l'homéostasie de son environnement (Block, et coll., 2007).

Les signaux d'activation sont les témoins d'une agression du SNC, infection ou lésion. Par exemple, les lipopolysaccharides, endotoxine essentielle de la membrane externe des bactéries gram négative, est un agoniste du récepteur TLR4 et sert de modèle commun dans l'étude de l'activation microgliales. D'autre part il existe des signaux avec un effet d'inactivation ou « OFF » de l'état d'activation de la microglie, comme les neurotransmetteurs (Färber & Kettenmann, 2006).

Soumises aux différents signaux d'activation, les cellules microgliales changent leur morphologie, leur nombre ainsi leurs déformation et l'augmentation du volume cellulaire. Ces paramètres permettent de distinguer différents phénotypes et formes de la microglie associées aux stades d'activation : ramifiée, amorcée, réactive et amiboïdes (Kreutzberg, 1996; Soltys, et coll., 2001).

Le changement de la morphologie et de la forme permet à la cellule microgliale de devenir pleinement mobiles et de jouer son rôle crucial, apparenté aux macrophages résidants du système nerveux central, qui est de phagocyter les débris cellulaires issus de la mort neuronale. Comme dans le cas des maladies neurodégénératives ou d'invasion tumorale où la microglie recrutée sur le site d'agression en médiation avec des phénomènes de migration et de prolifération (Walker et coll., 2014) .

À côté du changement morphologique, la microglie subit des changements de propriétés de la membrane au cours de son activation, même s'il ne s'agit pas d'une cellule électriquement excitable comme les neurones. Les microglies sont des cellules qui expriment plusieurs canaux ioniques qui lui confèrent des propriétés électrophysiologies caractéristiques (Kettenmann et coll., 2011).

En effet, l'activation de la microglie s'accompagne de nombreux changements de l'expression génique générant une production de nombreuses molécules telles que des

molécules pro ou anti-inflammatoires, des chimiokines, des facteurs de croissances, des molécules neurotoxiques et des enzymes : l'état d'activation de ces cellules correspond à un spectre de réponse dépendant du type, d'intensité et la durée de stimulus déclencheur de l'activation (Block et coll., 2007).

L'activation peut contribuer à un phénotypes phagocytaires associé à une activation transcriptionnelles de NFκB menant à la production et la libération des cytokines pro-inflammatoire comme les IL-1β, IL-6, IL-23 et TNFα, mais aussi les ROS et le NO.

Les microglies activées sont observées dans toutes les maladies neurologiques, incluant des maladies neurodégénératives comme la maladie d'Alzheimer, Parkinson ou encore les maladies inflammatoires (Mosser & Edwards, 2008).

Dans ces conditions pathologiques, la microglie assure plusieurs fonctions comme :

- La phagocytose : après son activation, la microglie permet l'élimination des pathogènes et débris cellulaires qui permet perturber le fonctionnement cérébral. Ce processus est majoritairement bénéfique (Napoli & Neumann, 2009).
- Le *stripping* des synapses : les microglies peuvent interagir physiquement avec les neurones lésés mais agir plus subtilement en supprimant uniquement des synapses. On parle de stripping ou de « déshabillage synaptique » (Blinzinger & Kreutzberg, 1968).
- La libération de facteurs : la microglie activée libère un grand nombre des molécules qui ont un effet positif ou délétères comme les molécules pro-inflammatoires TNFα et IL-1β (McCoy & Tansey, 2008; Kaushal & Schlichter, 2008).
- La modulation de l'activité synaptique : ces cellules agissent directement sur l'activité synaptique neuronale. Des études ont montré que l'activation de la microglie par le LPS augmente la fréquence de courants post-synaptique excitateurs au niveau de l'hippocampe (Pascual, et coll., 2012).

Les microglies sont des cellules apparentées aux macrophages qui résident dans le cerveau et la moelle épinière. Ces cellules agissent en tant que première et principale forme de défense immunitaire dans le système nerveux central (SNC). Les microglies éliminent les neurones endommagés et les agents infectieux.

Finalement, les cellules de la microglie sont considérées comme cellules très dynamique surveillant leur microenvironnement. Elles participent au cours des conditions

pathologiques, comme le cas des processus inflammatoires et neurodégénératives, à la défense du tissu cérébral et à la réaction inflammatoire en libérant plusieurs facteurs immunomodulateurs de ces réactions, d'où l'intérêt de leurs utilisations comme modèle cellulaire pour la compréhension de la physiopathologie de nombreuses maladies en raison de leur activation rapide en répondant aux nombreux stimuli.

## J. Peroxysome et stress oxydant

La découverte des peroxysomes décrivait ce compartiment cellulaire pour la première fois comme étant un organite cellulaire contenant la catalase capable de dégrader le peroxyde d'hydrogène. Cela indique que les peroxysomes génèrent des espèces réactives de l'oxygène (ROS) en tant que partie intégrante de leur métabolisme physiologique.

La cause principale endogène de l'augmentation de la production des ROS comprend principalement trois éléments qui sont : (i) l'inflammation, (ii) une concentration élevée de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> et (iii) un déséquilibre dans le transfert des électrons dans la chaîne respiratoire mitochondriale (Poljsak & Milisav, 2012), ce qui mènent à une contribution active des peroxysomes dans le maintien de l'équilibre cellulaire redox (Fransen, et coll., 2012).

Des études ont montré que les peroxysomes hépatiques consomment environ 20% d'oxygène et produisent 35% de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> au niveau cellulaire (Boveris, et coll., 1972; De Duve & Baudhuin, 1966). D'autres études indiquent que les peroxysomes peuvent être des générateurs du stress oxydant endogène suite à une activation continue du PPAR $\alpha$  qui induit une surproduction excessive de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sans augmentation concomitante de l'activité de la catalase (Reddy et coll., 1986).

## K. Peroxysome comme source importante productrice des ROS/RNS

Les peroxysomes contiennent diverses enzymes qui produisent ROS/RNS au cours des réactions qu'ils assurent (Tableau 3), à l'exemple de l'ACOX1.

- [ACOX1](#) : Cette enzyme de la  $\beta$ -oxydation peroxysomale des AG catalyse la réaction suivante (Van Veldhoven & Mannaerts, 1999) :



Une des propriétés de cette enzyme ACOX1 est l'induction de son expression via PPAR $\alpha$ , ce qui a pour conséquence l'accumulation de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Gonzalez, et coll., 1998; Rao & Reddy, 1987). Cette accumulation de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> conduit à l'activation du facteur de transcription NF- $\kappa$ B sensible ainsi aux réaction d'oxydoréduction intervenant aussi dans de nombreuses mécanismes notamment la croissance, la division cellulaire et l'inflammation (Li et coll., 2000).

D'autres enzymes peroxysomales produisent également du H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> :

- *D-amino acide oxydase* : cette flavoprotéine est présente dans le foie, les reins et le cerveau. Les études ont montré une hétérogénéité de la teneur de cette enzyme au niveau des organes qui la contiennent (Angermüller & Fahimi, 1988). Elle convertit les acides aminés D en leur alpha céto-acides avec libération d'ammoniac et de peroxyde d'hydrogène selon cette réaction :



- *D-aspartate oxydase* : cette flavoenzyme spécifique des acides aminés avec deux groupes carboxyliques tels que D-aspartate et D-glutamate qui ont des fonctions neuro-régulatrices importante dans le système nerveux centrale. Cette enzyme est présente dans les peroxysomes hépatiques, rénaux et cérébraux (Zaar et coll., 2002), elle produit le peroxyde d'hydrogène selon la réaction suivante :



- *L- $\alpha$ -Hydroxy-acide oxydase* : cette enzyme se présente sous deux isoformes : (i) l'isoforme a se trouve au niveau du foie qui oxyde principalement le glycolate et (ii) l'isoforme b dans les reins qui prend en charge l'oxydation hydroxybutyrate, des études cytochimiques et biochimiques sur des fractions purifiées de peroxysomes ont montré la spécificité de cette enzyme dans chaque organe qu'elle la contient (Angermüller, et coll., 1986; Angermüller, et coll., 1986) :





- *L-pipocolate acide oxydase* : une autre flavine oxydase qui se présente dans les peroxysomes humains, c'est une enzyme qui catalyse la réaction de conversion de l'acide pipécolique en 2,3,4,5-tetrahydropyridine-2-carboxylate et H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> selon la réaction suivante :



L'activité spécifique de la pipécolate oxydase peroxysomale est estimée de 20 à 50 fois plus forte dans les reins que dans le foie. L'absence ou la déficience en cette enzyme montre l'incapacité des peroxysomes à oxyder son substrat. L'augmentation de la concentration de l'acide pipécolique est observée chez les patients atteints du Syndrome de Zellweger (Zaar, et coll., 1986).

- *Urate oxydase* : c'est une enzyme qui catalyse l'oxydation de l'urate en présence d'oxygène produisant le H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> et allantoïne. Les humains ont un gène codant l'urate oxydase, mais qui n'est pas fonctionnel à cause des mutations non-sens se traduisant par l'absence de cette activité enzymatique chez l'Homme. L'urate oxydase se trouve dans presque tous les organismes, des bactéries aux mammifères. Il a été proposé que la perte de l'expression du gène de l'urate oxydase représente un avantage pour l'Homme, car l'acide urique est un puissant antioxydant et piègeur de l'oxygène singulet et des radicaux libres. Donc, sa présence protège l'organisme contre des maladies associées aux ROS comme le vieillissement. Cette enzyme génère le peroxyde d'hydrogène selon la réaction suivante (Ames, et coll., 1981; Yeldandi et coll., 1991):



- *Xanthine oxydase* : est une enzyme dimérique du métabolisme des purines, présente dans les peroxysomes du foie et des reins. Elle existe sous deux formes : la forme déshydrogénase (D) et la forme oxydase (O). Dans certaines conditions la forme D dépendante de NAD<sup>+</sup> est convertie en forme O, ce qui peut entraîner des graves lésions tissulaires dues à la génération d'O<sub>2</sub>, des radicaux superoxydes et du peroxyde d'hydrogène. Cette enzyme génère le peroxyde d'hydrogène selon la réaction suivante (Angermüller, et coll., 1987; Engerson et coll., 1987) :





- Oxyde nitrique synthase : l'oxyde nitrique est un radical libre généré par la NO synthase (NOS), cette enzyme est impliquée dans les processus de vasodilatation et de signalisation dans le cerveau, sa forme inductible iNOS est exprimée dans les conditions inflammatoires et cause des lésions tissulaire graves. L'induction de iNOS est associée à une réduction de l'activité catalase (Stolz et coll., 2002). La réaction globale que catalyse cette enzyme est la suivante :



**Tableau 3: Les enzymes peroxysomales contribuant à la production des ROS au cours de leurs réactions qui les catalysent chez les mammifères.**

Tableau adapté d'après (Schrader & Fahimi, 2004)

Enzyme	Substart	ROS produit
<b>Acyl-CoA oxydases</b>		
Palmitoyl-CoA oxydase	Acides gras à très longue chaîne	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>
Pristanoyl-CoA oxydase	Acides gras à chaîne ramifiée	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>
Trihydroxycoprostanoyl-CoA oxydase	Intermédiaires des acides biliaires	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>
<b>D-aminoacide oxydase</b>	D-Proline	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>
<b>D-aspartate oxydase</b>	D-Aspartate, N-méthyl-D-aspartate	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>
<b>α-hydroxyacide oxydase</b>	Glycolate , lactate	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>
<b>Acide pipécolique oxydase</b>	Acide Pipécolique	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>
<b>Polyamine oxydase</b>	Spermidine	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>
<b>Urate oxydase</b>	Acide urique	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>
<b>Xanthine oxydase</b>	Xanthine	O <sub>2</sub> <sup>-</sup>
<b>NO synthase</b>	L-arginine	NO

## L. Peroxysomes comme système de défense antioxydant

Les peroxysomes contiennent diverses enzymes qui métabolisent les ROS, afin de rétablir l'équilibre redox et maintenir l'homéostasie cellulaire. Parmi ces enzymes peroxysomales :

- Catalase : est largement utilisée comme marqueur peroxysomale. La catalase est l'une des protéines peroxysomales les plus abondantes dans les cellules des mammifères. Elle contient un signal de ciblage peroxysomale de type PTS1 (Purdue & Lazarow, 1996), son rôle prédominant est d'empêcher l'accumulation de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> toxique ; mais, elle peut agir comme une oxydase en utilisant O<sub>2</sub> lorsque H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> est absent ou il existe mais en faible concentration dans les cellules (Vetrano et coll., 2005). En effet, les souris déficientes en catalase se développent normalement mais leurs tissus présentent un

déficit de consommation du H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> extracellulaire (Ho, et coll., 2004). La catalase montre une faible affinité pour son substrat H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> et nécessite donc des concentrations élevées de ce substrat pour fonctionner efficacement. La catalase est une oxydoréductase héminique qui catalyse la dismutation du H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en eau et dioxygène selon la réaction suivante :



En plus de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, une variété de substrats tels que l'éthanol et le méthanol, les phénols et les nitrites peuvent être métabolisés par la catalase (Oshino, et coll., 1973). L'inhibition de l'action de la catalase peut avoir des effets néfastes sur la survie cellulaire surtout après une exposition à un stress oxydant. De plus, le taux de la catalase est significativement réduit dans le cas de la présence des tumeurs dans le foie ou dans d'autres organes, ainsi que dans diverses conditions pathologiques (Litwin, et coll., 1999).

- *Glutathion peroxydase* : une enzyme localisée au niveau du peroxysome dont la fonction biochimique est la réduction le peroxyde d'hydrogène libre en eau et donc protéger l'organisme contre les dommages oxydatifs via la réaction suivante :



L'intégrité des membranes cellulaires et subcellulaires dépendant fortement de la glutathion peroxydase, son système de protection antioxydant dépend fortement de la présence de sélénium (Singh, 1996).

- *Superoxyde dismutase* : constitue une défense antioxydante et prévient les dommages oxydatifs. La localisation de cette enzyme dans la matrice peroxysomale de fibroblastes a été rapportée pour la première fois en 1991. (Keller, et coll., 1991). Cette enzyme est présente dans la plupart des compartiments cellulaires notamment dans les mitochondries. Elle appartient aux métalloprotéines et se présente sous 3 isotypes qui diffèrent entre eux par la nature du métal présent au sein du groupe prothétique : Fe-SOD, Cu/Zn-SOD et Mn-SOD.
- *Peroxyrédoxine 1* : cette protéine antioxydante a une activité de peroxydase, à faible efficacité, dépendante de la thiorédoxine. Cette enzyme intervient également dans la signalisation cellulaire via le contrôle du taux de peroxyde induit par les cytokines et

intervient également dans le processus de différenciation cellulaire (Hofmann, et coll, 2002).

## M. Relations peroxysome-mitochondrie

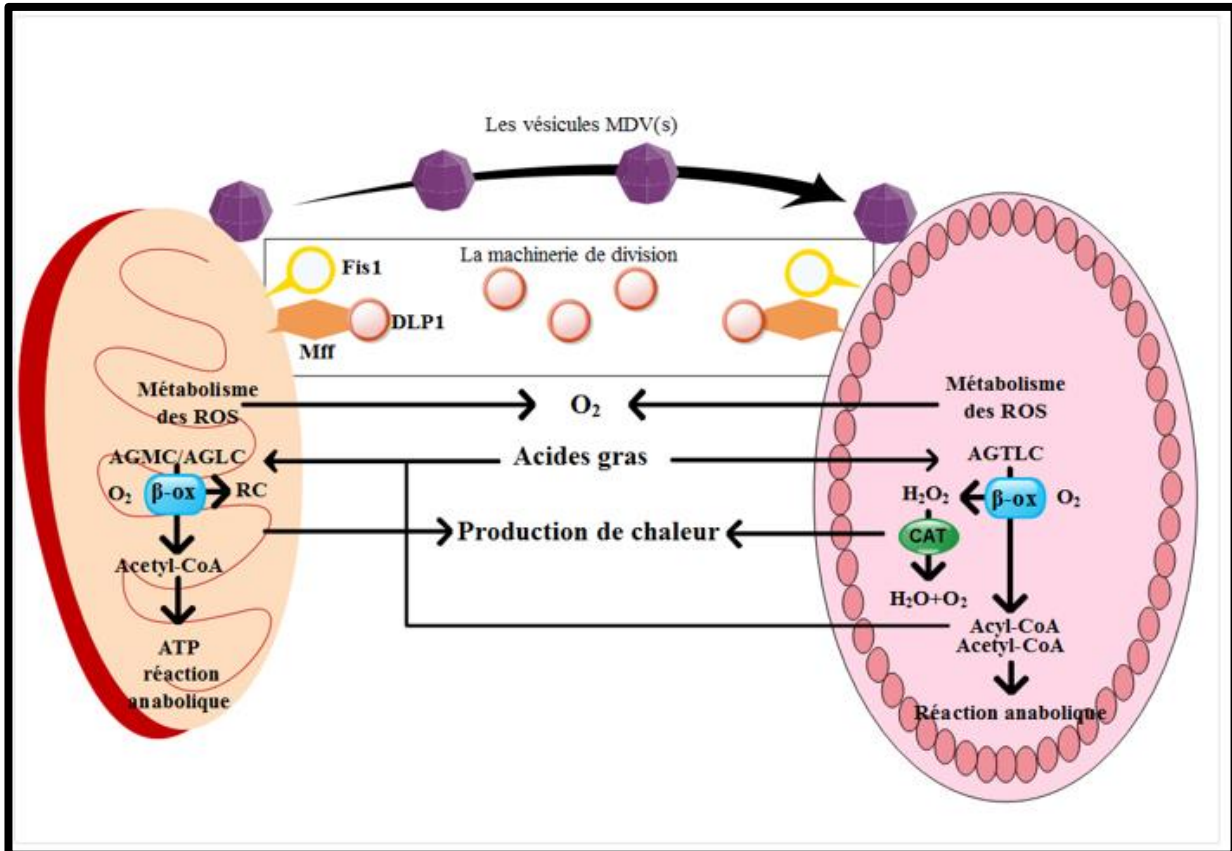
La cellule est composée de plusieurs compartiments (ou organites) qui communiquent entre eux pour assurer le bon fonctionnement cellulaire. Notamment, les peroxysomes et les mitochondries qui participent au maintien de l'homéostasie cellulaire. Les preuves des interactions physiques entre peroxysome et mitochondrie sont encore assez rares.

Ces dernières années, il est devenu évident que ces deux organites coopèrent entre eux pour remplir leurs fonctions physiologiques et assurer un ensemble de voies métaboliques différentes. L'exemple le plus connu est celui de leur collaboration dans la  $\beta$ -oxydation des acides gras (Figure 9).

Chez les mammifères, la mitochondrie et le peroxysome assurent ensemble le métabolisme des AG. Bien que les étapes biochimiques soient similaires, chaque organite recrutant des enzymes spécifiques. Pour les peroxysomes, cette réaction est assurée par l'ACOX1, l'enzyme bifonctionnelle, et les thiolases. Un processus qui débute au niveau peroxysomale générant des acides gras raccourcis et acheminés vers la mitochondrie pour une oxydation totale avec la production de l'ATP,  $\text{CO}_2$  et  $\text{H}_2\text{O}$  (Wanders & Waterham, 2006a). Contrairement aux mitochondries, les peroxysomes ne contiennent pas de complexes protéiques de la chaîne respiratoire mitochondriale. L'oxydation des AGTLC au niveau des peroxysomes produit le  $\text{H}_2\text{O}_2$ , bien évidemment qui est toxique pour la cellule mais qui sert également comme molécule signale dégradée par l'activité catalase (Fransen et coll., 2012; Bonekamp, et coll., 2009).

Des études réalisées chez un modèle de souris déficientes en catalase ont montré une réduction des capacités de la chaîne respiratoire mitochondriale au niveau du cerveau des souris (Ho et coll., 2004). Dans le même sens, d'autres études ont montré qu'une inhibition totale ou partielle de l'activité de la catalase altère l'équilibre Redox mitochondrial, l'activité de la chaîne respiratoire mitochondriale et le potentiel membranaire mitochondriale (Ivashchenko et coll., 2011; Walton & Pizzitelli, 2012; Hwang et coll., 2012). Chez les fibroblastes humains, l'activité de la catalase réduite entraîne une augmentation des taux des ROS avec une réduction concomitante de l'activité enzymatique mitochondriale (Koepke, et coll., 2008; Legakis et coll., 2002). Comme les peroxysomes, les mitochondries jouent un rôle dans la production et le métabolisme des ROS. La chaîne respiratoire mitochondriale est le siège principal de la

génération des radicaux libre avec un taux de production comparable à celui produit par les peroxysomes. Des anomalies dans la machinerie peroxysomale métabolisant ROS peut entraîner un dysfonctionnement mitochondriale qui mène à un dommage cellulaire (Figure 10) (Baumgart et coll., 2001; Dirkx et coll., 2005)



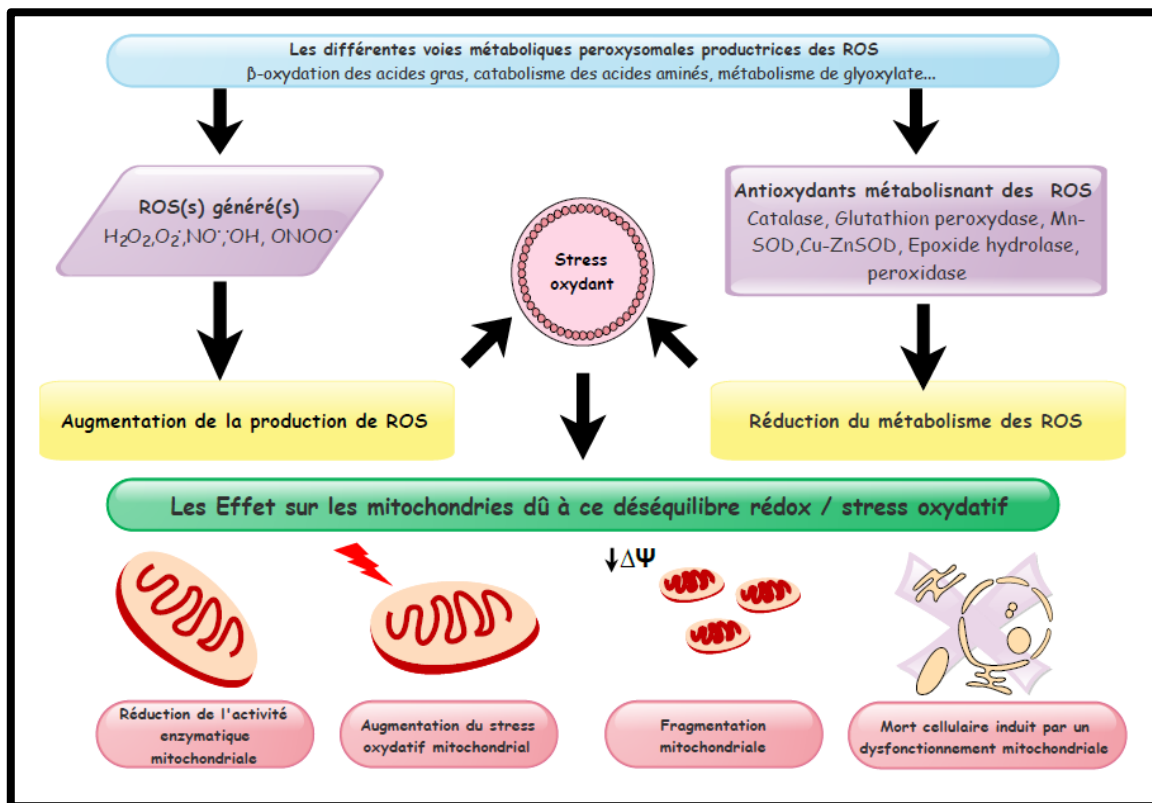
**Figure 9: Vue schématique de la relation entre les peroxysomes et les mitochondries.**

Le peroxysome et la mitochondrie présentent une coopération métabolique chez les mammifères. (1) la bêta-oxydation des acides gras, contribuant à la production de chaleur (2) les deux organites ont une relation sensible à l'équilibre redox. (3) Ils partagent des composants clés de leurs machines de division. En outre, de nouvelles voies de trafic allant des mitochondries aux peroxysomes impliquant des vésicules dérivées des mitochondries ont été rapportées. Schéma adapté d'après (Islinger, et coll., 2012). Avec CAT : catalase ;  $\beta$ -ox :  $\beta$ -oxydation ; RC : chaîne respiratoire ; AGLC : acide gras longue chaîne ; AGMC : acide gras moyenne chaîne.

Les peroxysomes sont capables de produire des ROS résultant de divers métabolismes tels que : l'oxydation les AG, le métabolisme du glyoxylate ou le métabolisme des acides aminées. Ainsi une perturbation de l'homéostasie redox peroxysomale peut affecter l'équilibre, la structure et la fonction des mitochondries et provoque une augmentation du stress mitochondriale. Au niveau peroxysomale, l'excès des ROS en particulier le  $H_2O_2$  peut s'échapper du peroxysome vers le cytosol, entraînant une surcharge pour les mitochondries

(Khan et coll., 2015; Sies, 2017). Ces ROS générés à l'intérieure des peroxysomes altèrent la respiration mitochondriale ce qui entraînent une fragmentation des mitochondries et par la suite une mort cellulaire (Wang et coll., 2013).

Par ailleurs, des altérations mitochondriales ont été observées chez les patients atteints du syndrome de Zellweger. Chez ces patients, présentant des mutations dans le gène codant pour Pex16p, une réduction de la fonction mitochondriale a été décrite (Baumgart et coll., 2001; Salpietro et coll., 2015).



**Figure 10: Aperçu schématique du stress oxydatif du peroxysome et de son effet sur les mitochondries.**

Les peroxysomes qui participent à plusieurs fonctions métaboliques. Plusieurs de ces fonctions et les enzymes impliquées dans ces voies sont responsables de la production de ROS peroxysomales. Une étroite collaboration entre les peroxysomes et les mitochondries dans la signalisation ROS est rapportée. Schéma adapté d'après (B. Wang et coll., 2013).

Des études réalisées chez les souris atteintes de la déficience en Pex5p, *Pex5p*<sup>-/-</sup>, montrent que l'absence de l'activité peroxysomale altère la production d'ATP mitochondriale. Ceci se traduit par l'activation du métabolisme des glucides. Par conséquent, les souris *Pex5*<sup>-/-</sup> perdent leur poids malgré l'augmentation de la prise alimentaire (Peeters et coll., 2011).

D'autres études réalisées chez ces mêmes souris *Pex5*<sup>-/-</sup> ont montré des troubles dans la fonction mitochondriale qui se traduit par des déficits des complexes respiratoires I, III et IV

(Peeters et coll., 2015). La communication entre le peroxysome et la mitochondrie consisterait dans le transport de solutés très variés qui impliquerait au niveau de la membrane peroxysomale un système de pores protéiques formés par la PMP22 (Antonikov & Hiltunen, 2012). Cependant, une voie de trafic vésiculaire mitochondriale dite MDV porteuse du ligand MAPL, ancrée dans la mitochondrie et ciblant le peroxysome a été également rapportée. Ces MDVs peuvent se former à partir des mitochondries et se retrouvent avec une sous-population de peroxysomes (Neuspiel et coll., 2008).

La découverte d'une biogenèse coordonnée des peroxysomes et des mitochondries dans certaines conditions démontre que les deux organites partagent les protéines impliquées dans ce processus. Chez les mammifères la dynamine GTPase1, DRP1 forme des anneaux oligomériques autour des membranes peroxysomales ou mitochondriales. Les protéines membranaires Fis1/Mff agiraient comme récepteurs de la DRP1 au niveau membranaire initiant la construction de la fission de chacun de ces deux organites en réponse à l'hydrolyse du GTP (Thoms, et coll., 2009). L'adressage des protéines Fis1/Mff vers les membranes peroxysomales et mitochondriales pourrait être soumis à une compétition entre les deux organites pour DRP1/Fis1 (Motley & Hettema, 2007; Huybrechts et coll., 2009).

La perte de fonction de ces protéines de division bloque les fissions peroxysomales et mitochondriale et provoque l'accumulation des organites sous une forme allongée. Des études réalisées chez des fibroblastes d'un patient atteint d'une déficience en DRP1 ont montré que les deux organites ont une forme allongée. Chez les souris et les patients atteints des déficiences peroxysomales : la taille, la forme, le nombre et les fonctionnalités des mitochondries semblent aberrants, avec la perte de communication entre les deux organites (Baes et coll., 1997).

Des études ont montré que le taux des AGTLC peroxysomale dans les fibroblastes des patients atteints de la X-ALD est affecté par le taux de la  $\beta$ -oxydation AG à longue chaîne mitochondriale, montrant une forte interaction entre les deux organites. Ces études ont montré également des anomalies structurales mitochondriales dans les cellules corticosurréaliennes dans un modèle murin de l'x-ALD (McGuinness et coll., 2003).

La relation entre les peroxysomes et les mitochondries est essentielles pour le maintien d'un équilibre Redox cellulaire. Or, cette relation ne concerne pas uniquement cet équilibre redox mais également l'homéostasie cellulaire qui exigerait la présence d'un peroxysome fonctionnel pour une mitochondrie fonctionnelle.

### III. Cactus et extraits

#### A. Introduction

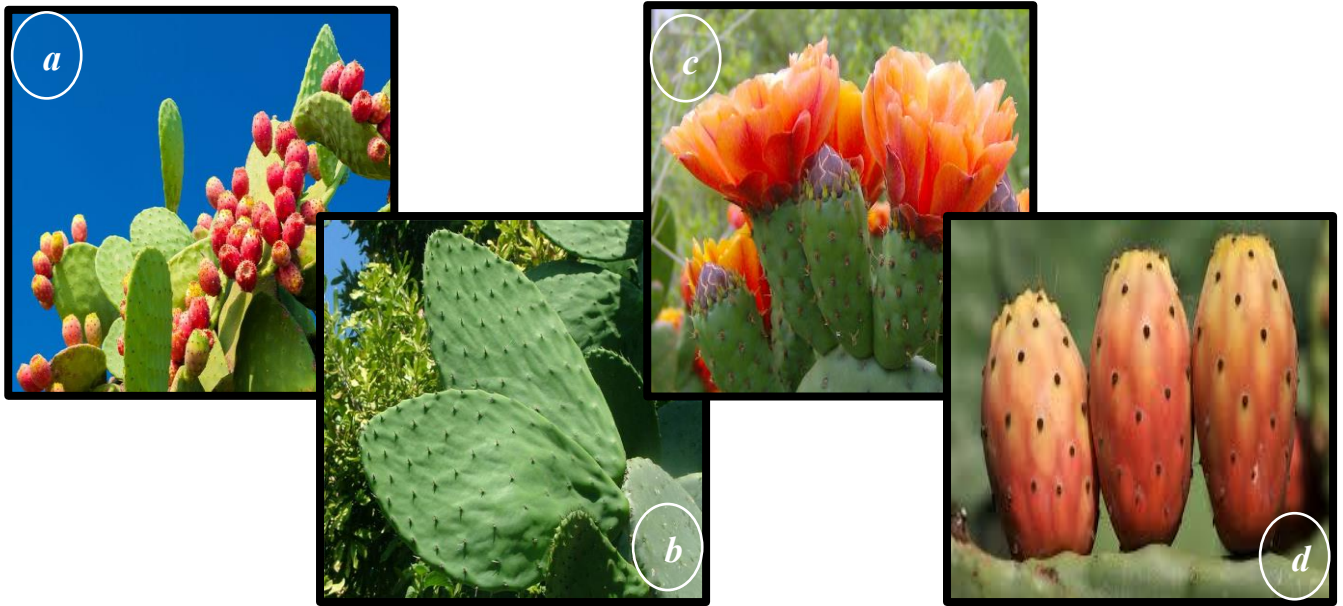
Au cours de ces dernières décennies, une grande importance a été accordée pour l'étude des substances naturelles issues de certaines matières premières afin d'améliorer le bien-être chez l'Homme et de souligner leurs effets bénéfiques dans la prévention de certaines maladies notamment les maladies neurodégénératives et le cancer.

Le cactus appartient à la famille des cactacées (Reyes-Aguero, et coll., 2005), *Opuntia ficus-indica* (OFI) est un cactus originaire du Mexique introduit en Afrique du Nord au début du 17<sup>ème</sup> siècle. Environ 1500 espèces de cactus appartiennent au genre *Opuntia* et sont réparties dans différentes régions du globe (Hegwood, 1990). Cette plante pousse à l'état sauvage dans les régions arides et semi-arides, où la production de plantes alimentaires est généralement très limitée. Les conditions climatiques et leur faible demande en eau favorisent l'extension de la production de cactus, comme l'a souligné l'Organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture (Barbera, et coll., 1995).

Toutes les parties de cette plante ont été utilisées dans le domaine de l'agroalimentaire. Les cladodes (ou «raquettes») de cactus sont consommées sous forme de légumes frais ou ajoutées aux plats cuisinés (Saenz, 2000). Le fruit, figue de Barbarie ou «prickly-pear» en anglais, est utilisé pour la fabrication de produits alimentaires tels que des jus de cactus (Epsinosa-A et coll., 1973), des boissons alcoolisées (Bustos, 1981), de la confiture (Sawaya, Khalil, & Al-Mohammad, 1983), mais aussi pour la production d'édulcorant liquide naturel, ou d'équivalents de beurre de cacao (à partir de la fermentation du jus de figues de Barbarie (Hassan, et coll., 1995)). La majorité des produits utilise le jus de cactus, tandis que les graines jadis jetées sont utilisées actuellement pour la fabrication de l'huile de graines de cactus et des produits cosmétiques (Figure 11).

Le cactus a été désigné comme aliment bénéfique pour la santé avec un grand nombre de nutriments potentiellement actifs et présentant propriétés multifonctionnelles. Les cladodes et les extraits issus de la fleur de cactus ont été étudiées comme traitement possible de la gastrite, de l'hyperglycémie, de l'athérosclérose, du diabète et de l'hypertrophie prostatique (Palevitch, Earon, & Levin, 1993). Ainsi, les extraits de cactus présentent des effets anti-tumoraux (Zou et coll., 2005), antiviraux (Loro, et coll., 1999), anti-inflammatoires (Ahmad, et coll., 1996) et antioxydants (Gentile, et coll., 2004).





**Figure 11: Photo de la plante d'*Opuntia ficus indica*.**  
 (a) la plante entière, (b) la cladode de cactus, (c) la fleur et en (d) le fruit de cactus.

## B. Composition de cactus

Au cours de dernières années, les recherches sur le cactus ont démontré ses bienfaits grâce à l'étude de sa composition, démontrant la présence de vitamines, de fibres, d'acides aminés, de minéraux, ainsi que d'autres composants.

### 1. Les composés phénoliques

Dans la grande famille des antioxydants, on trouve une variété de composés appelés les polyphénols. Ce sont eux que l'on retrouve en majorité dans les fruits, légumes et plantes qui contribuent à leurs vertus pour la santé.

Les polyphénols sont caractérisés, comme l'indique leurs noms, par la présence d'au moins deux groupes phénoliques associés en structures plus ou moins complexes, généralement de haut poids moléculaire. Ces composés sont les produits du métabolisme secondaire chez les plantes.

Les polyphénols prennent une importance croissante en pharmacologie, notamment grâce à leurs effets bénéfiques sur la santé. En effet, leur rôle d'antioxydants naturels suscite de plus en plus d'intérêt pour la prévention et le traitement des maladies inflammatoires, cardiovasculaires, neurodégénératives et aussi du cancer (Laughton, et coll., 1991).



Toutes les parties de cette plante sont riches en polyphénols, tels que les flavonoïdes et les acides phénoliques. La distribution de ces composés diffère d'une partie de cactus à une autre. L'acide gallique est majoritaire dans la fleur (4900 mg/100 g), alors qu'il est peu présent dans la raquette de cactus (2,37 mg/100 g). Ce composé connu par son pouvoir antioxydant et pro-oxydant, il est capable aussi de réduire les dommages à l'ADN (You & Park, 2010). Il possède aussi une activité anti-tumorale, antibactérienne et antivirale. La nictoflorine est un composé majeur du cladode à raison de 146,5 mg/100 g. La nicotiflorine joue un rôle dans la neuroprotection du système nerveux (Nakayama et coll., 2011). Dans la pulpe la teneur totale en polyphénol est de 218,8 mg/ 100 g, par contre dans les graines cette teneur ne dépasse pas 89 mg/100 g. (Tableau 4- (El-Mostafa et coll., 2014)). La peau du fruit de cactus est riche en Isorhamnétine ce composé connu par son rôle anticancéreux et anti-inflammatoire par l'inhibition des cytokines inflammatoires, des études ont montré une induction de l'expression de PPAR- $\delta$  (Kim et coll., 2011; Kim, Choi, & Kim, 2014).

**Tableau 4: Distribution des composés phénoliques dans les différentes parties du cactus (*Opuntia ficus indica*).**

La teneur en acides phénoliques est exprimée en mg/100g. D'après (El-Mostafa et coll., 2014)

Partie de la plante	Composant principal identifié	Quantité en mg / 100g
<b>Fleur de Cactus</b>	Acide gallique	<b>1630-4900</b>
	Quercétine 3-O-Rutinoside	<b>709</b>
	Kaempférol 3-O-Rutinoside	<b>400</b>
	Quercétine 3-O-Glucoside	<b>447</b>
	Isorhamnetin 3-O-Robinoside	<b>4269</b>
	Isorhamnetin 3-O-Galactoside	<b>979</b>
	Isorhamnetin 3-O-Glucoside	<b>724</b>
	Kaempférol 3-O-Arabinoside	<b>324</b>
<b>Pulpe de Cactus</b>	Acide phénolique total	<b>218,8</b>
	Quercétine	<b>9</b>
	Isorhamnetin	<b>4,94</b>
	Kaempferol	<b>0,78</b>
	Lutéoline	<b>0,84</b>
	glycosides d'isorhamnétine	<b>50,6</b>
	Kaempferol	<b>2,7</b>
<b>Graines de cactus</b>	Acide phénolique total	<b>48-89</b>
	Feruloyl-Saccharose Isomère 1	<b>7,36-17,62</b>
	Feruloyl-Saccharose Isomère 2	<b>2,9-17,1</b>
	Sinapoyl-diglucoside	<b>12,6-23,4</b>
	Flavonoïdes totaux	<b>1,5-2,6</b>
	Tanins Totaux	<b>4,1-6,6</b>
<b>Peau du fruit cactus</b>	Acide phénolique total	<b>45-700</b>
	Flavonoïde Total	<b>6,95</b>
	Kaempferol	<b>0,22</b>
	Quercétine	<b>4,32</b>
	Isorhamnetin	<b>2,41-91</b>
<b>Cladode de Cactus</b>	Acide gallique	<b>0,64-2,37</b>
	Coumaric	<b>14,08-16,18</b>
	3,4-dihydroxybenzoïque	<b>0,06-5,02</b>
	4-hydroxybenzoïque	<b>0,5-4,72</b>
	Acide férulique	<b>0,56-34,77</b>
	Acide salicylique	<b>0,58-3,54</b>
	Isoquercétine	<b>2,29-39,67</b>
	Isorhamnetin-3-O-glucoside	<b>4,59-32,21</b>
	Nicotiflorine	<b>2,89-146,5</b>
	Rutin	<b>2,36-26,17</b>
	Narcissine	<b>14,69-137,1</b>

## 2. Les acides gras

L'analyse des lipides totaux réalisée à partir des extraits des cladodes de cactus montre que l'acide palmitique, l'acide oléique, l'acide linoléique et l'acide linoléique constituent 93% de la teneur des lipides (Tableau 5, (Charrouf & Guillaume, 2007)). L'huile de graine de cactus présente un taux d'environ 62% en moyenne de l'acide linoléique. Ce dernier est connu pour ces propriétés contre les maladies cardiovasculaire, inflammatoire et certaines maladies métaboliques (Ramadan & Mörsel, 2003; Soel, et coll., 2007).

**Tableau 5: Composition en acides gras d'*Opuntia ficus indica* dans la cladode et l'huile de graine de cactus.**

*Cette composition est exprimée en g/100g des acides gras totaux. Tableau adapté d'après (El-Mostafa et coll., 2014)*

Acides gras	Cladode de cactus	Graine de cactus
C12:0	1,33	*****
C14:0	1,96	*****
C16:0	13,87	9,32-20,1
C16:1	0,24	1,42-1,80
C18:0	3,33	2,72-311
C18:1	11,16	16,77-18,3
C18:2	34,87	53,5
C18:3	33,23	70,29
C20:0	*****	0-2,58
C22:0	*****	*****
C22:1	*****	*****
C24:0	*****	*****

## 3. Vitamines

Il existe des composants qui présentent une grande importance sur le plan nutritionnel, tels que les carotènes et les tocophérols (vitamine E) (Psomiadou & Tsimidou, 2001). Les tocophérols sont les principaux antioxydants liposolubles localisés dans les membranes cellulaires chez l'homme. La carence en ces composés affecte de nombreux tissus chez les mammifères. La carence en vitamine E chez l'homme provoque des anomalies du développement du système nerveux chez l'enfant et une hémolyse chez l'homme. Des études suggèrent que les personnes ayant un apport en vitamine E et autres antioxydants plus faibles pourraient présenter un risque accru de certains types de cancer et d'athérosclérose (Rimm et

coll., 1993). Il est également suggéré que la supplémentation en antioxydants pourrait réduire le risque de ces processus dégénératifs (Kallio, et coll., 2002). Les données sur la composition en vitamines des différentes parties du cactus sont résumées dans le Tableau 6. Le taux de vitamine E est extrêmement élevé dans la peau du cactus en raison de 2182 mg/100 g de ce tissu. Tandis que la graine contient 106 mg/100 g de la vitamine E mais quasiment absente dans la raquette de cactus.

**Tableau 6: Distribution du contenu vitaminique dans les différentes parties du cactus (*Opuntia ficus indica*).**

La teneur en vitamine est exprimée en mg/100g de tissu. D'après (El-Mostafa et coll., 2014)

Vitamines	Pulpe de cactus	Graine de cactus	Peau de fruit cactus	Cladode de cactus
<b>Vitamine K1</b>	<b>53,2</b>	<b>52,2</b>	<b>109</b>	<b>*****</b>
<b>Vitamine C</b>	<b>34-40</b>	<b>*****</b>	<b>*****</b>	<b>44743</b>
<b>Vitamine B1</b>	<b>*****</b>	<b>*****</b>	<b>*****</b>	<b>0,14</b>
<b>Vitamine B2</b>	<b>*****</b>	<b>*****</b>	<b>*****</b>	<b>0,6</b>
<b>Vitamine B3</b>	<b>*****</b>	<b>*****</b>	<b>*****</b>	<b>0,46</b>
<b><math>\alpha</math>-tocophérol</b>	<b>84,9</b>	<b>56</b>	<b>1760</b>	<b>*****</b>
<b><math>\beta</math>-tocophérol</b>	<b>12,6</b>	<b>12</b>	<b>222</b>	<b>*****</b>
<b><math>\gamma</math>-tocophérol</b>	<b>7,9</b>	<b>33</b>	<b>174</b>	<b>*****</b>
<b><math>\sigma</math>-tocophérol</b>	<b>422</b>	<b>5</b>	<b>26</b>	<b>*****</b>
<b>Totale de la Vitamine E</b>	<b>527,4</b>	<b>106</b>	<b>2182</b>	<b>*****</b>

#### 4. Stérols

Dans une étude menée par l'équipe de Ramadan sur la composition de cactus en stérol a montré que le  $\beta$ -sitostérol présente environ 57% du contenu total en stérol majeur dans la peau de fruit de cactus (Ramadan & Mörsel, 2003). Le deuxième composant majeur est le campestérol constitue avec le  $\beta$ -sitostérol 80% des stérols totaux (Tableau 7). Les autres composants, le stigmastérol et le 5-avénastérol sont présents en quantités approximativement égales (environ 6,0% des stérols totaux). De nombreux effets bénéfiques ont été mis en évidence pour ces deux stérols (Yang & Kallio, 2001). Le Lanostérol et l'ergostérol sont présents à des concentrations plus faibles. Les phytostérols, en général, présentent un intérêt en raison de leur activité antioxydante et de leur impact sur la santé. Les phytostérols ont été ajoutés aux huiles végétales comme exemple d'un aliment fonctionnel efficace (Ntanios, 2001).

**Tableau 7: Distribution des stérols dans les différentes parties du cactus (*Opuntia ficus indica*).**  
 La teneur en stérol est exprimée en g/kg. D'après (El-Mostafa et coll., 2014)

Principaux composants identifiés	Pulpe de cactus	Graine de cactus	Peau du cactus
Campestérol	8,74	1,66	8,76
Stigmastérol	0,73	0,3	2,12
Lanostérol	0,76	0,28	1,66
$\beta$ -Sitostérol	11,2	6,75	21,1
$\Delta^5$ Avenastérol, $\Delta^7$ Avenastérol	1,43	0,29	2,71
$\Delta^7$ Avenastérol	*****	0,05	*****
Ergostérol	*****	*****	0,68

## 5. Minéraux et acides aminés

La graine de cactus est la partie la plus riche en minéraux. Le potassium et le phosphore sont majoritaires avec des quantités respectivement de 170 et 155 mg / 100 g (Tableau 8). La présence de grandes quantités de magnésium est également remarquable (El Kossori, et coll., 1998). Concernant les acides aminés, c'est le glutamate qui se présente comme élément dominant suivi de l'arginine (Tableau 9).

Dans la cladode, les principaux minéraux sont le potassium avec une quantité de 55,20 mg/100 g et le calcium avec un taux de 235 mg/100 g (Tableau 9 (Feugang, et coll., 2006). Le principal acide aminé présent dans cette partie est la glutamine. Dans la pulpe, le potassium est majoritairement présent à 161 mg/100 g (Tableau 9) (Medina, et coll., 2007; Sawaya, et coll., 1983). Dans l'ensemble, le fruit est enrichi en acide aminé proline et un autre dérivé d'acide aminé, la taurine, Il représente à eux deux 61,78% de la teneur totale en acides aminés (Tableau 9).

**Tableau 8: Composition minérale des différentes parties du cactus (*Opuntia ficus indica*).**  
 La teneur en minéraux est exprimée en mg/100g. D'après (El-Mostafa et coll., 2014)

Principaux composants identifiés	Pulpe de cactus	Graine de cactus	Cladode du cactus
Calcium	27,6	16,2	5,64-17,95
Oxalate de calcium	*****	*****	4,3-11,5
Magnésium	27,7	74,8	8,8
Sodium	0,8	67,6	0,3-0,4
Potassium	161	163	2,53-55,20
Fer	1,5	9,45	0,09
Phosphore	*****	152	0,15-2,59
Zinc	*****	1,45	0,08
Cuivre	*****	0,32	*****
Manganèse	*****	Trace	0,19-0,29

**Tableau 9: Composition et distribution des acides aminés dans les différentes parties du cactus (*Opuntia ficus indica*).**

La teneur en minéraux est exprimée en g/100g. D'après (El-Mostafa et coll., 2014)

Principaux composants identifiés	Cladode du cactus	Fruit de cactus	Graine de cactus
Alanine	1,25	3,17	4,75
Arginine	5,01	1,11	6,63
Asparagine	3,13	1,51	Trace
Acide asparginique	4,38	Trace	10,42
Acide glutamique	5,43	2,4	21,68
Glutamine	36,12	12,59	Trace
Cystine	1,04	0,41	0,37
Histidine	4,18	1,64	3,11
Isoleucine	3,97	1,13	6,2
Leucine	2,71	0,75	9,94
Lysine	5,22	0,63	6,79
Méthionine	2,92	2,01	0,7
Phénylalanine	3,55	0,85	5,25
Sérine	6,68	6,34	8,46
Thréonine	4,18	0,48	1,53
Tyrosine	1,46	0,45	3,09
Tryptophane	1,04	0,46	Trace
Valine	7,72	1,43	6,02
Acide $\alpha$ -aminobutyrique	Trace	0,04	Trace
Carnosine	Trace	0,21	Trace
Citrillone	Trace	0,59	Trace
Ornithine	Trace	Trace	Trace
Proline	Trace	46	Trace
Taurine	Trace	15,79	Trace
Glycine	Trace	Trace	5,06

## 6. Propriétés biologiques et médicales de cactus

Les extraits d'*Opuntia* sont utilisés depuis des siècles à des fins nutritionnelles et médicales et leur intérêt thérapeutique a récemment été mis en évidence par des études scientifiques *in vitro* et *in vivo* (Moussa-Ayoub, et coll., 2011). La teneur élevée de cactus en antioxydants (les polyphénols) diminue le taux de la peroxydation lipidique, le premier facteur de risque dans l'athérosclérose. Le cactus étant riche en fibres et protéines alimentaires rend cet aliment hypolipidémant par excellence. Le cactus abaisse significativement les taux plasmatiques de cholestérol LDL et le contenu plasmatique et urinaire de 8-épi-prostaglandine F2 $\alpha$ , un isoprostane F2 par la peroxydation de l'acide arachidonique d'après des études menées par Budinski et ses collaborateurs (Filip, et coll., 2011). Des études soulignent les propriétés antioxydantes et antiathérogènes d'*Opuntia* (Ayorinde, et coll., 2000).

La consommation de jus et de fruits d'*Opuntia* prévient naturellement le stress oxydatif et améliore le statut redox chez l'homme (Jabri karoui & Marzouk, 2013). Il est à noter que la consommation de figues de Barbarie d'*Opuntia* améliore également la fonction plaquettaire et l'équilibre hémostatique, contribuant ainsi à prévenir le risque d'athérosclérose (Khallouki et coll., 2003).

Le fruit de cactus contient de l'acide ascorbique, qui assure un bon fonctionnement du système immunitaire dans l'organisme. Il contient aussi une quantité importante de calcium élément essentiel pour la santé des os. Le cactus peut contribuer aussi à la prévention des maladies liées à l'âge comme l'ostéoporose. Les figues de Barbarie ont un niveau élevé de flavonoïdes, de polyphénols et de bétalaïnes qui agissent tous comme des composés d'antioxydants et neutralisent les radicaux libres qui favorisent des dommages cellulaires avant qu'ils ne contribuent à la mutation de cellules saines en cellules cancéreuses. La recherche scientifique a attiré l'attention sur un type de pigment dite bétalaïnes connu pour son effet antioxydant et anti-radicalaire. Cette bétalaïne existe sous deux formes : bétaxanthine de couleur jaune orangé et bétacyanine avec une couleur pourpre (Castellanos-Santiago & Yahia, 2008; Fernandez-Lopez, et coll., 2012). Des études sur ces composés ont démontré un risque moins élevé de cancer chez les personnes qui ajoutent régulièrement ces types d'antioxydants dans leur alimentation. Les caractéristiques phytochimiques et antioxydantes du Nopal en font un bon mécanisme de défense contre les symptômes du vieillissement, l'inflammation et certains cancers (du côlon et de la prostate). Des études réalisées sur des cellules intestinales épithéliales co-traitées avec IL-1 $\beta$  et l'indicaxanthine (pigment du fruit de cactus) ont montrées

l'activation de NO synthase inductible et une réduction de l'expression des prostaglandines, des ROS et de la cyclooxygénase-2 (Tesoriere, et coll., 2014).

Les extraits issues de cactus assurent des activités antimicrobienne, des études dans ce sens ont démontré que l'extrait méthanoïque provoque la rupture de la membrane bactérienne ce qui génère une augmentation de la perméabilité de la membrane avec la diminution du pH et du taux d'ATP (Sánchez, et coll., 2010).

### 7. L'utilisation de la plante de Cactus *Opuntia ficus indica*

L'utilisation de la figue de barbarie les domaines de nutrition et agroalimentaire repose sur leurs teneurs vitaminiques, protéiques et glucidiques, mais aussi sur la richesse en phénols et flavonoïdes avec son action hypoglycémique, hypolipidémant et antioxydants (Osorio-Esquivel, et coll., 2011; Schaffer, et coll., 2005).

Cette plante contient des colorants naturels utilisés dans le domaine agroalimentaire. Les raquettes de cactus sont valorisé par leur conservation dans les boîtes de conserves en tant que légumes tendres et les fruits au tant que confiture, jus et miel (Castellanos-Santiago & Yahia, 2008; Strack, et coll., 2003).

Le cactus *Opuntia ficus indica*, est exploité dans le domaine cosmétique. Ainsi, les raquettes de cactus sont utilisées dans la fabrication des shampoings et assouplissants pour les cheveux, des crèmes hydratantes et des baumes, leur huile est utilisé comme des préparations anti âge et anti rides naturels comme des sérums et crèmes dermiques (Barka, et coll., 2013).



# *Matériels & Méthodes*

---

## IV. Matériel et Méthodes

### A. Préparation des extraits issus de la raquette de cactus

#### 1. Récolte

La plante du cactus *Opuntia ficus indica* a été récoltée à maturité dans le mois d'Avril 2016 dans la région de Settât au Maroc dans le cactétum d'Ain Nzagh, installé au CRRA-INRA de Settât. Ce site se trouve dans les environs de la ville de Settât à 7 km sur la route de Tnine Ouled Bouziri, à 400 m d'altitude, une latitude de 32.95° et une longitude de 7.62°. La récolte a été effectuée très soigneusement d'une façon à ne pas détériorer les éléments organiques et minéraux présents dans la plante. L'identification botanique a été faite en se basant sur les études de classification botanique de cette plante déjà réalisées dans notre laboratoire (El Kharrassi et coll., 2016) (ElKharrassi, et coll., 2015).

#### 2. Séchage

La partie de la plante *Opuntia ficus indica* qui est les raquettes ont été lavées à l'eau distillée, séchées dans l'étuve à 50°C sous ventilation pendant 48 heures avec la vérification de la stabilité du poids de la matière au cours de séchage. La matière sèche est broyée délicatement en poudre très fine. La poudre de la raquette de cactus est gardée à l'abri de lumière et l'humidité.

#### 3. Préparation des différents extraits

Un fractionnement dit liquide-liquide a été réalisé et ayant pour but d'obtenir un extrait brut selon les propriétés physico-chimiques des deux phases liquides non miscibles. Les solvants utilisés ont une polarité croissante à savoir : l'hexane (indice de polarité 0), le n-butanol (indice de polarité 4), le chloroforme (indice de polarité 4.1) et l'acétate d'éthyle (indice de polarité 4.4).

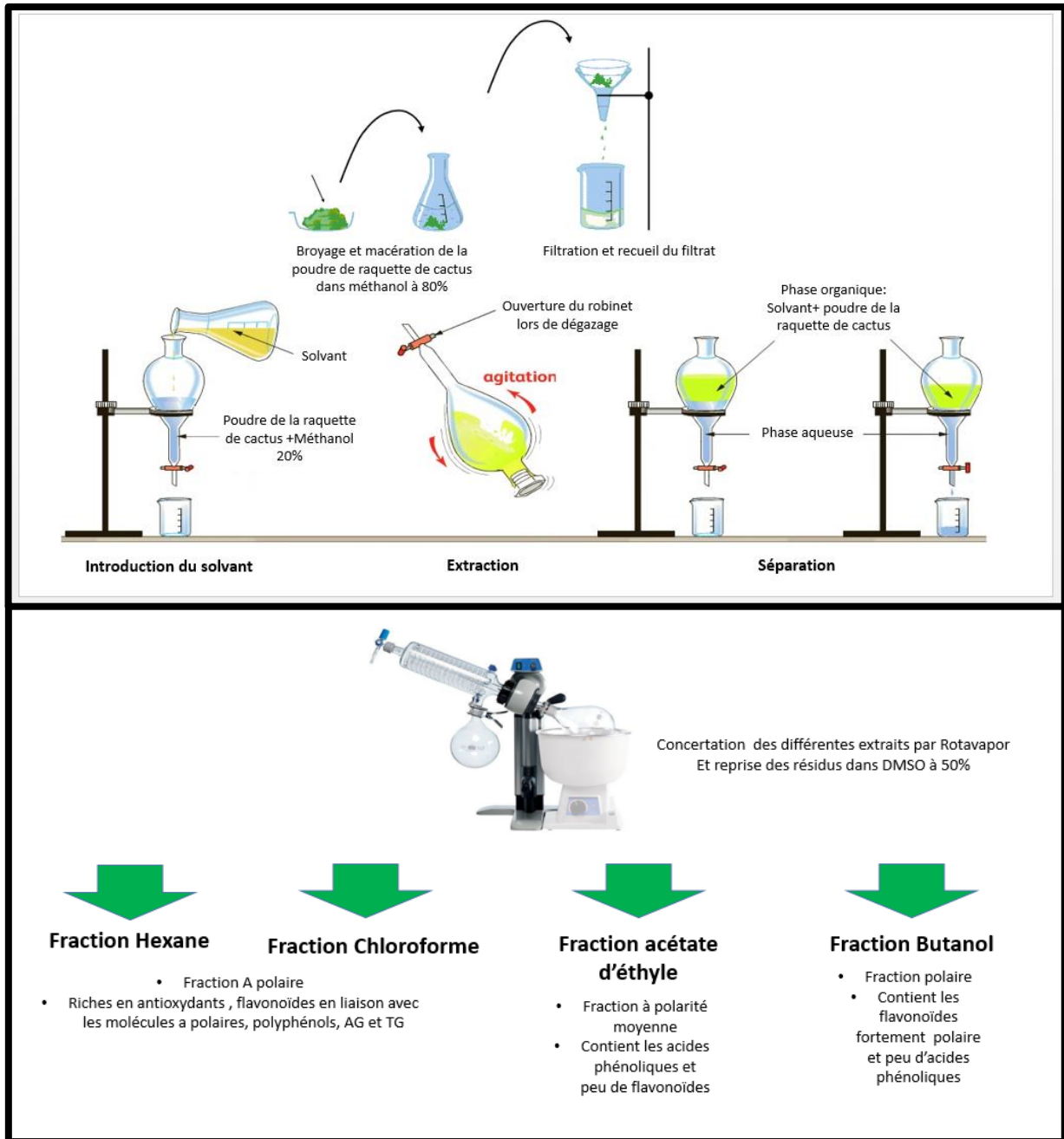
Quarante grammes de la poudre des raquettes de cactus ont été mélangés solution de méthanol à 80% (environ 400 ml), puis, une macération à froid à 4°C pendant 48 heures a été réalisée. Après cette étape de macération, le mélange a été filtré et le filtrat a été recueilli.

Dans une ampoule à décanter contenant le filtrat, nous avons ajouté de l'hexane (v/v). Après avoir bien mélangé, la suspension est mise à décanter jusqu'à la séparation des deux phases. La fraction hexanique a été récupérée dans un flacon en verre fermé et gardé à 4°C à l'obscurité.

Ensuite, un volume de chloroforme (v/v) a été ajouté à la deuxième phase gardée dans l'ampoule à décanter et l'étape précédente a été répétée. La fraction chloroformique a été récupérée. Les mêmes étapes d'extraction ont été réalisées pour l'acétate d'éthyle et pour le butanol.

À l'issue de ces extractions, quatre extraits différents ont été obtenus à partir de la raquette de cactus : successivement des extraits hexanique, chloroformique, d'acétate d'éthyle, et de butanol.

En utilisant un rotavapor permettant une évaporation rotative, nous avons pu concentrer les différents extraits afin d'obtenir un résidu sec qui est ensuite repris dans 20 ml d'une solution de DMSO à 50%. L'ensemble de ces différents extraits finaux ont été gardé, jusqu'à leur utilisation, à 4°C et à l'obscurité (Figure 12).



**Figure 12:** Figure montrant les différentes étapes de préparation des différents extraits de la raquette de cactus.

La préparation des extraits commence avec une macération de la poudre séchée avec le méthanol à 80% et se termine avec la concentration des différents extraits par évaporation rotative comme indiqué ci-dessus.

## B. Culture cellulaire des cellules BV-2

Les cellules BV-2 dérivent des cellules murines microgliales immortalisées par l'oncogène v-raf/v-myc et sont fréquemment utilisée pour se substituer à la culture de cellules microgliales primaires (Banca-Biologica e Cell Factory ; catalogue no. ATL03001). Les cellules BV-2 sont ensemencées à une densité de 120 000 cellules par puits en plaque 12 puits et  $3 \times 10^6$  cellules par puits en plaque 6 puits respectivement dans un volume de 1 ou 2 ml de milieu de culture par puits. Elles sont cultivées en milieu DMEM (Lonza, Bale, Suisse) supplémenté avec 10% de sérum de veau fœtal « décomplémenté » (chauffé pendant 30 minutes à 56°C) (Pan Biotech GmbH, Aidenbach, Germany), 1% d'antibiotiques : pénicilline (100 U/ml) /streptomycine (100U/ml) (Pan Biotech GmbH) et Glutamate 2 mM. Le SVF a été « décomplémenté » pendant 30 minutes au bain marie à 56°C pour tous les milieux de culture. Les cultures BV-2 sont maintenues à 37°C dans une atmosphère humide avec 5% CO<sub>2</sub>.

Après la mise en culture, les cellules arrivent à confluence (un tapis cellulaire qui occupe environ 90% de la surface de la boîte culture), les BV-2 sont récoltées après incubation avec une solution de trypsine à raison de deux fois par semaine. Les cellules sont décollées grâce à l'action de la solution de trypsine/EDTA (trypsine 0,05% ; EDTA 0,02%) (Pan Biotech GmbH). Pour cela, les cellules sont rincées avec 5 ml de DPBS pour éliminer le milieu de culture. Ensuite, 1 ml de solution trypsine/EDTA est ajouté par puits et la culture est incubée à 37°C pendant 2 min. Une fois les cellules décollées du fond du puits, du milieu de culture est ajouté pour inhiber l'action de la trypsine. La suspension cellulaire est centrifugée à 200 g pendant 5 minutes. Après élimination du surnageant, le culot cellulaire est repris dans du milieu frais DMEM complet.

## C. Mesure de la viabilité cellulaire par marquage au bleu de Trypan

Le bleu de Trypan est un colorant qui permet de distinguer les cellules vivantes des cellules mortes puisqu'il colore en bleu le cytoplasme des cellules mortes.

Le surnageant (qui est le milieu de culture) contient des cellules mortes et certaines cellules vivantes en suspension est conservé, puis les cellules adhérentes sont trypsinées et centrifugées (comme décrit dans le paragraphe précédent). Le culot contenant les cellules vivantes et mortes est re-suspendu dans du milieu de culture complet. Le nombre de cellule viable est déterminé par comptage au microscope à contraste de phase en présence de bleu de Trypan en utilisant la

cellule de Malassez. Ainsi, en utilisant cette méthode on peut déterminer le nombre des cellules dans une suspension cellulaire donnée.

#### D. Mesure de la cytotoxicité et de la viabilité cellulaire par le test MTT

Le test MTT est une méthode d'énumération des cellules vivantes, il s'agit d'un test utilisé pour évaluer la viabilité et la cytotoxicité d'une substance après un traitement des cellules. Ce test donne également une indication sur l'activité mitochondriale, il consiste à mesurer l'activité de la succinate déshydrogénase mitochondriale.

Le MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl) -2,5- diphenyltetrazolium bromide, a tetrazole) de couleur jaune est réduit en formazan violet dans les mitochondries de cellules vivantes. L'absorbance de la solution colorée peut être quantifiée à une longueur d'onde de 595 nm dans un spectrophotomètre. Cette réduction du MTT a lieu quand les déshydrogénases mitochondriales sont actives et cette conversion est directement liée au nombre de cellules vivantes (viables). L'effet d'une molécule sur la viabilité cellulaire peut donc être apprécié selon une courbe dose-réponse.

Après avoir réalisé le traitement cellulaire souhaité, le milieu de culture est éliminé et les cellules sont incubées en présence d'une solution de MTT (0,05 mg/ml) diluée dans du milieu DMEM complet à raison de 2 ml/puits pendant 3 h à 37°C. Ensuite, le milieu contenant le MTT est éliminé, les cellules rincées avec 1 ml de DPBS, les cristaux de formazan insolubles ont été dissous dans 1 ml de DMSO à 100% sous une agitation douce pendant 10 minutes. Enfin, l'absorbance a été mesurée à une longueur d'onde de 595 nm à l'aide d'un spectrophotomètre lecteur de plaque. L'activité de la succinate déshydrogénase est déterminée par rapport à celle des cellules contrôles.

#### E. Mesure de l'adhérence cellulaire et de la viabilité par le test de Cristal violet

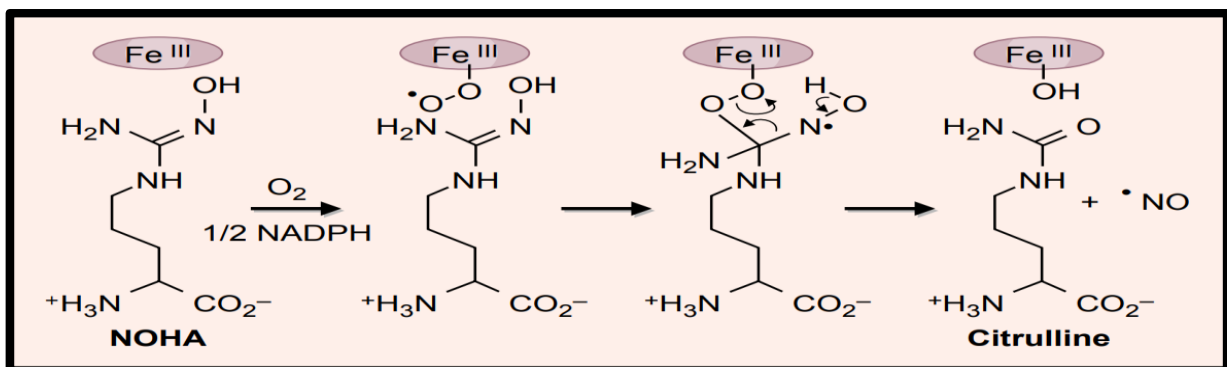
Le cristal violet est un colorant qui s'accumule dans le noyau cellulaire, ce colorant préparé dans une solution d'éthanol (cristal violet 1% dans éthanol 2%, Sigma Aldrich) qui fixe les cellules et permet leur marquage. Le test de l'adhérence cellulaire et de la viabilité au cristal violet consiste à marquer les cellules vivantes et qui restent adhérentes après avoir éliminés les cellules mortes non adhérentes.

Après avoir réalisé le traitement cellulaire souhaité, le surnageant contenant les cellules mortes est éliminé et le tapis des cellules adhérentes est rincé une fois avec 500 µl de DPBS.

Ensuite, une solution de cristal violet (Sigma Aldrich) est alors ajoutée en raison de 250µl /puit, les cellules sont incubées à la température de 37°C pendant 5 minutes. Après incubation, 3 lavages sont réalisés avec 500 µl de l'eau distillée afin d'éliminer l'excès de cristal violet. Le tapis cellulaire est alors séché, puis incubé sous agitation pendant 10 minutes dans une solution de dissolution à base de citrate de sodium 0,1 M dans de l'éthanol 50%. Enfin, le cristal violet présent dans les cellules est ainsi dissout et l'absorbance est mesurée à une longueur d'onde de 570 nm.

## F. Mesure du monoxyde d'azote : test NO

Le monoxyde d'azote (NO) est un biomédiateur synthétisé par la famille des NO synthases (NOS) composée de trois isoenzymes. Ces enzymes catalysent l'oxydation de L'arginine en N-hydroxyarginine, puis de celle-ci en NO. Cette réaction d'oxydation mène à la formation du NO<sup>-</sup> qui ensuite réagit avec l'enzyme pour former dans les conditions aérobies une molécule de nitrite (Figure 13). Le réactif de Greiss réagit avec les nitrites formés et permet donc, indirectement de mesurer du NO produit par les NO-synthases.



**Figure 13: Figure montrant l'un des mécanismes proposés pour l'oxydation de la N-hydroxyarginine (NOHA) menant à la libération de NO par les NOS.**

*L'atome de fer hémique est réduit par un électron provenant du NADPH avant de fixer une molécule d'oxygène. Le peroxyde de fer formé réagit avec la NOHA pour former un intermédiaire qui se décompose en NO, citrulline et atome de fer hémique. D'après (Sennequier et coll. 1998).*

Après avoir réalisé le traitement cellulaire souhaité, le surnageant du milieu de culture est conservé dans la glace. Une série de dilution en cascade d'une solution de nitrite de sodium ( $NaNO_2$ ) allant de 100 µM jusqu'à 0,39 µM est préparée. Dans une plaque de 96 puits, 50 µl de chaque dilution de gamme, 50 µl du surnageant cellulaire sont déposés. Un volume de 50 µl du réactif de Greiss (Sigma Aldrich) est ajouté dans chaque puit. La plaque est ensuite incubée

à l'obscurité et à la température ambiante pendant 30 minutes. Enfin, l'absorbance est lue à une longueur d'onde de 540 nm.

## G. Préparation des lysats cellulaires

### 1. Extraction des protéines

Les protéines sont extraites à partir des cellules suite aux différents traitements réalisés. Pour cela, les cellules sont récoltées après trypsination, dans un volume de 500 µl après lavage au PBS sans KCl (1X) (composé de : NaCl 137 mM, NaHPO<sub>4</sub> 10 mM et KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,76 mM) puis récupérées par une centrifugation de 10 minutes à 200 g.

L'intégralité du surnageant de lavage est éliminée de façon à obtenir un culot cellulaire sec (ce dernier peut alors être congelé à -20°C avant la lyse). La lyse des culots secs pour extraire les protéines est réalisée avec un tampon RIPA composé de Tampon phosphate 25 mM pH 7,4, NaCl 150 mM, SDS 0,1 %, 1% sodium déoxycholate à 10%, NP-40 1%. La lyse est réalisée dans la glace, après une minute d'homogénéisation par un homogénéiseur à microtubes (Dominique Dutscher), en incubant les cellules avec le tampon RIPA pendant 30 minutes. Les lysats sont ensuite centrifugés 20 minutes à 12000 g à 4°C pour éliminer les débris cellulaires. Le surnageant contenant les protéines est récupéré dans de nouveaux tubes qui peuvent être stockés à -80°C pour une utilisation ultérieure.

Remarques : À cette étape, les lysats cellulaires doit directement être utilisé pour la mesure de l'activité ACOX1 et conservé par la suite à -80°C pour les manipulations ultérieures. Les lysats cellulaires doivent être gardés dans la glace durant toute la manipulation.

### 2. Dosage des protéines

La concentration en protéines totales des extraits cellulaires a été déterminée grâce au kit BCA (Sigma Aldrich). Ce kit permet le dosage des protéines en utilisant l'acide Bicinchoninique. Ce dernier est un composé coloré qui réagit avec les ions Cu(I) qui proviennent de la réduction des ions Cu(II) par les protéines. Ainsi, plus la concentration de protéines est élevée et plus l'absorbance du BCA est importante.

Le dosage est réalisé en plaque 96 puits avec 2,5 µL d'échantillon du lysat cellulaire auxquels sont ajoutés 22,5 µL d'eau distillée, 200 µL d'un mélange BCA/Cu(II) (50/1) est ajouté dans chaque puits. Une gamme d'étalonnage est préparée à partir d'une solution de sérum albumine bovine (BSA) allant de 0 à 25 µg de protéines par puits (le blanc étant remplacé par



de l'eau milli-Q). La plaque est incubée 30 minutes à 37°C puis l'absorbance du BCA est lue à 595 nm sur un spectrophotomètre (MRX Revelation, Dynex).

## H. Le fractionnement subcellulaire complet des cellules

Le fractionnement subcellulaire consiste à séparer les différents compartiments cellulaires à partir d'un homogénat cellulaire ou tissulaire. C'est un protocole réalisé en deux étapes : l'homogénéisation et le fractionnement cellulaire par centrifugation.

### 1. L'homogénéisation

La première est une étape d'homogénéisation qui consiste à rompre la membrane plasmique et pour se faire on met les cellules en suspension dans un tampon d'homogénéisation d'un pH et d'une force ioniques connus.

L'homogénéisateur utilisé pour cette étape est un Dounce (tube de verre calibré) dans lequel on place la suspension cellulaire récoltée dans le tampon puis un piston en verre. L'ensemble des cellules passe entre le tube de verre et le piston, sera ainsi comprimée et éclatera, libérant son contenu dans le tampon. On obtient un homogénat total avec tous les constituants de la cellule. La plupart des organites restent intacts, mais sans précaution particulière l'appareil de Golgi et le réticulum endoplasmique vont être fragmentés sous forme de vésicules appelées microsomes.

### 2. La Préparation et analyses des fractions subcellulaire

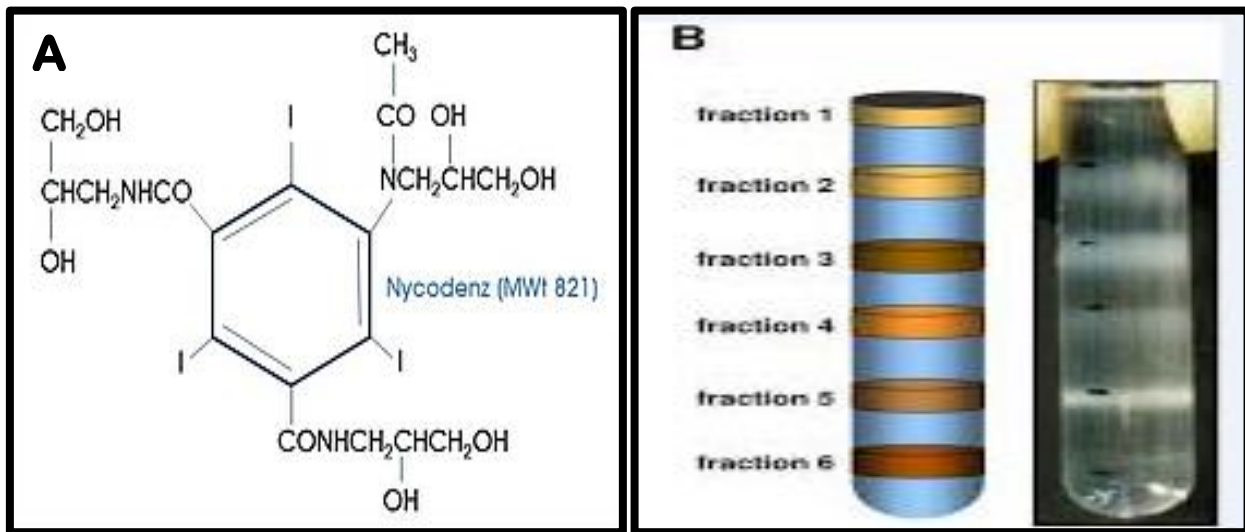
#### a) *Fractionnement par centrifugation différentielle*

La centrifugation différentielle permet la purification de l'homogénat en fonction de la taille et de la densité de ses organites qui les constituent. Pour se faire, l'homogénat est centrifugé par centrifugation différentielle permettant l'obtention de différentes fractions successivement à différentes vitesses. Pour chaque force centrifuge, les organites, en fonction de leur taille et leur densité, se retrouvent dans le culot ou dans le surnageant qui est prélevé soigneusement et le culot est repris dans du tampon d'homogénéisation et si nécessaire gradé dans la glace.

#### b) *Purification par gradient de densité : par Gradient de Nycodenz*

Cette technique consiste brièvement à déposer une fraction subcellulaire obtenue par centrifugation différentielle au sommet d'un gradient de Nycodenz obtenu en mélangeant deux solutions de densités différentes dans le tube de centrifugation. Sous l'effet de la force

centrifuge, les différents organites cellulaires sédimentent migrent dans le gradient jusqu'à atteindre une densité d'équilibre équivalente à leur propre densité (Figure 14).



**Figure 14:** Figure qui montre en (A) la structure de Nycodenz, dérivé de l'acide tri-iodobenzoïque. (B) images des fractions dans un tube à centrifuger après centrifugation.

### 3. Protocole du fractionnement complet des cellules BV-2 en culture

Ce protocole de fractionnement est réalisé selon la méthode de De Duve et coll. (De Duve, et coll., 1955).

Au minimum 6 boîtes de Pétri (0,55 dm<sup>2</sup>/boîte) à environ 80% de confluence sont utilisées pour préparer les différentes fractions.

Au préalable, la veille de la manipulation un tampon d'homogénéisation A : saccharose 250 mM pH 6,9 est préparé et gardé à 4°C dans la chambre froide. Tous les tubes qui sont utilisés pour cette manipulation ont été rincés avec du tampon et ont été gardés également dans la chambre froide.

Le fractionnement subcellulaire complet des cellules BV-2 se déroule en plusieurs étapes (Figure 15) comme suit :

- Laver les cellules 3 fois avec 8 ml de DPBS à température ambiante
- Laver les cellules 2 fois avec 8 ml du tampon A à 4°C
- Ajouter 800 µl du tampon A par boîte de Pétri
- Décoller les cellules avec un grattoir (avec des mouvements de haut en bas, de gauche à droite)
- Récupérer les cellules dans un Dounce taré rincer les boîtes de Pétri et le grattoir avec 1 ml du tampon A

- Homogénéiser les cellules BV-2 par 20 passages du piston A dans le Dounce.
- Centrifuger 10 minutes à 1000 g et à 4°C dans un tube de 15 ml. (Selon le volume de la suspension cellulaire, voir le tableau 10.
- Transférer le surnageant **E1** par décantation minimale dans un tube de 15 ml taré et garder le tube dans la glace.
- Re-suspendre le culot dans 2 ml du tampon A glacé.
- Ré-homogénéiser le culot par 20 passages au piston A dans le Dounce Tight.
- Centrifuger à 1000 g et à 4°C. (le temps de la centrifugation dépend du volume de la suspension cellulaire, voir le tableau 10.
- Transférer le surnageant **E2** par décantation minimale dans le tube de 15 ml contenant déjà le surnageant **E1**. Noter le poids total de la fraction et prélever 500 µl de cette fraction E pour les dosages et garder les tubes dans la glace.
- Re-suspendre le culot **N** et noter le poids de la fraction.
- Centrifuger la fraction **E** (E1+E2) à 5862 g (8000 rpm) à 4°C dans des tubes rigides opaques à parois épaisses (en copolymère de polypropylène, Dominique Deutscher) compatible avec le rotor 70-Ti. (le temps de la centrifugation dépend du volume de la suspension cellulaire, voir le tableau 10.
- Transférer le surnageant par décantation minimale dans un tube rigide.
- Re-suspendre le culot avec une baguette en verre dans 2 ml de volume final du tampon A glacé.
- Centrifuger la fraction pendant 2'24'' à 5862 g (8000 rpm) pour obtenir la fraction **M**.
- Après une décantation minimale du surnageant, re-suspendre le culot à la baguette de verre dans du tampon A glacé. Noter le poids et garder la fraction dans la glace.
- Centrifuger le surnageant **LPS** à 46 000 g (25000 rpm) et à 4°C. (le temps de la centrifugation dépend du volume de la suspension cellulaire, voir le tableau 11.
- Transférer le surnageant après une décantation maximale dans un tube rigide.
- Re-suspendre le culot à la baguette en verre dans 2 ml final du tampon A glacé.

- Centrifuger la fraction pendant 2'52'' à 46 000 g (25000 rpm) pour obtenir la fraction **L**.
- Resuspendre le culot L à la baguette dans du tampon A glacé. Noter le poids et garder la fraction dans la glace.
- Centrifuger le surnageant **PS** pendant 45 minutes à 90100 g (35000 rpm) à 4°C pour obtenir la fraction **P**.
- Transférer le surnageant par décantation maximale dans un tube de 15 ml taré et noter le poids de la fraction **S** et garder-la dans la glace.
- Re-suspendre le culot dans du tampon A glacé, noter le poids de la fraction **P** et garder-la dans la glace.
- Doser les différentes enzymes marqueurs des différentes fractions.

**Tableau 10:** *Le temps de Centrifugation de la suspension cellulaire à 1000g en fonction de son volume.*

<b>Volume de la suspension dans le tube</b>	<b>Temps de la centrifugation à 1000g</b>
7 ml	9 minutes 16 secondes
6 ml	9 minutes 01 secondes
5 ml	8 minutes 31 secondes
4 ml	8 minutes 01 secondes
3 ml	7 minutes 47 secondes
2 ml	7 minutes 32 secondes

**Tableau 11:** *Le temps de centrifugation nécessaire à chaque volume de fraction aux différentes vitesses de centrifugation.*

<b>Volume de la suspension dans le tube</b>	<b>Le temps de la centrifugation à 5862 g (8000 rpm)</b>	<b>Le temps de la centrifugation à 46000 g ou 25000 rpm</b>
2 ml	2 minutes 24 secondes	2 minutes 52 secondes
2,1 ml	2 minutes 27 secondes	2 minutes 54 secondes
2,2 ml	2 minutes 30 secondes	2 minutes 56 secondes
2,3 ml	2 minutes 33 secondes	2 minutes 59 secondes
2,4 ml	2 minutes 36 secondes	3 minutes 02 secondes
2,5 ml	2 minutes 39 secondes	3 minutes 04 secondes
2,6 ml	2 minutes 42 secondes	3 minutes 06 secondes
2,7 ml	2 minutes 45 secondes	3 minutes 09 secondes
2,8 ml	2 minutes 48 secondes	3 minutes 11 secondes
2,9 ml	2 minutes 52 secondes	3 minutes 13 secondes
3 ml	2 minutes 55 secondes	3 minutes 16 secondes

À l'issue de cette manipulation, 6 fractions ont été obtenues dites **ENMLPS** qui sont les suivantes :

**Fraction E** : Extrait de l'homogénat totale

**Fraction N** : Fraction Nucléaire enrichie en noyaux et cytosquelette

**Fraction M** : Fraction Mitochondriale lourde enrichie en mitochondrie

**Fraction L** : Fraction Mitochondriale légère enrichie en lysosome et peroxysome

**Fraction P** : Fraction microsomale contient réticulum endoplasmique (microsomes), appareil de Golgi et ribosomes.

**Fraction S** : Fraction soluble qui contient composant hydrosoluble du cytosol

### 1. Préparation des peroxysomes

La fraction « L » issue de fractionnement cellulaire des BV-2 est déposée sur un gradient discontinu de Nycodenz (environ 700 µl), la solution commerciale de Nycodenz a été utilisée à deux densités 1,07 et 1,28. L'ultracentrifugation est effectuée dans un rotor vertical SW55-Ti à 150 000 g (39 000 rpm) pendant 3 heures.

À la fin de la centrifugation les fractions sont collectées dont le volume, l'indice de réfraction et la densité sont mesurés. Les fractions ont été collectées en coupant le tube par un appareil de fabrication artisanale en 5 à 13 fractions.

#### a) *Le calcul de la fréquence de chaque fraction*

La densité ( $\rho$ ) de chaque fraction est déterminée par un réfractomètre, l'indice de réfraction ( $\eta$ ) est utilisé dans le calcul de la densité des solutions de Nycodenz, selon la relation donnée par le fabricant. Cette relation est la suivante :

$$\rho = 3,242 \eta - 3,323$$

La fréquence moyenne de chaque fraction :  $Q/\Sigma Q$ .  $\Delta\rho$ .  $Q$  représente l'activité mesurée dans la fraction,  $\Sigma Q$  l'activité totale récupérée et  $\Delta\rho$  l'incrément de densité entre les limites supérieures et inférieures de la fraction.

### 2. Dosage des protéines

Les concentrations protéiques des différentes fractions ont été mesurées selon la méthode de Bradford (Bradford, 1976) (BioRad Protein Assay, BioRad), basée sur des mesures d'absorbances à 595 nm, contre une gamme de BSA allant de 0 µg à 80 µg/puits (le volume final de chaque essai est de 1 ml comprenant 200 µl de réactif de Bradford, 10 µl de fraction, qsp 790 µl d'eau ultra pure). Le blanc a été réalisé avec 200 µl de Bradford auxquels sont ajoutés 800 µl d'eau ultra pure.

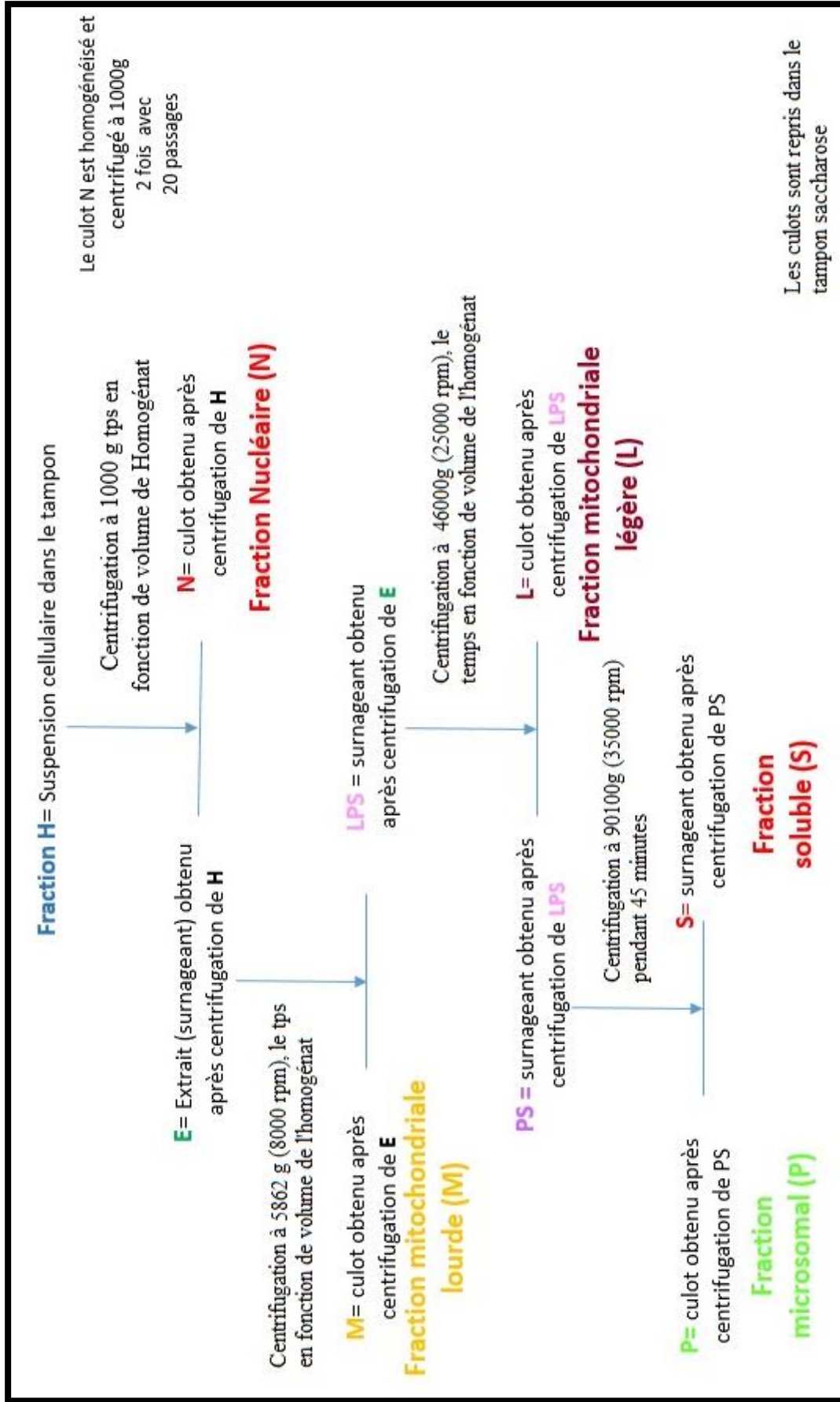
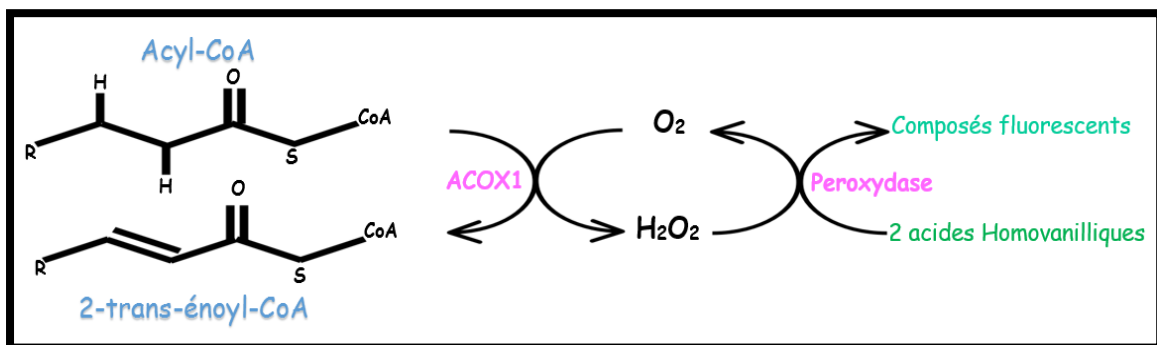


Figure 15: Schéma explicatif des différentes étapes de fractionnement complet des cellules BV-2.

## I. Mesure des activités enzymatiques

### 1. Mesure de l'activité enzymatique de l'acyl-CoA oxydase 1 (ACOX1) par dosage fluorimétrique

Cette méthode, très sensible, repose sur la mesure indirecte de l'activité enzymatique car elle repose sur la mesure de la fluorescence émise à 420 nm par un composé fluorescent excité à 318 nm. Comme le montre la figure 16, ce composé fluorescent provient de la réaction de peroxydation, catalysée par une peroxydase, entre une molécule d' $\text{H}_2\text{O}_2$  produite lors de la réaction de  $\beta$ -oxydation catalysée par l'ACOX1 et deux molécules d'acide homovanillique (HVA) (Brocard et coll., 1993).



**Figure 16:** La réaction enzymatique utilisée pour mesurer l'activité de l'ACOX1 en présence d'acide homovanillique et de peroxydase.

Le substrat, l'acyl-CoA, est oxydé par l'ACOX1 générant le 2-trans-énoyl-CoA correspondant et une molécule d' $\text{H}_2\text{O}_2$ . L' $\text{H}_2\text{O}_2$  réagit avec la peroxydase en présence de deux molécules de HVA ce qui mène à la production des composés fluorescents qui sont détectés à une longueur d'onde de 420 nm.

Dans un premier temps, une gamme étalon d' $\text{H}_2\text{O}_2$  de 0 à 5  $\mu\text{M}$  a été réalisée en préparant un milieu réactionnel composé de tampon Tris HCl 1M pH 7,8, d'acide homovanillique 27 mM, de peroxydase de radis noir (Horse Raddish Peroxidase, HRP) 1 mg/ml et Triton X-100 10%. La réaction est déclenchée par l'addition des solutions d' $\text{H}_2\text{O}_2$  de concentration connue. Le volume réactionnel final est de 200  $\mu\text{l}$ . La mesure de la fluorescence à 420 nm de chaque solution d' $\text{H}_2\text{O}_2$  après réaction permet de tracer une droite d'étalonnage de la fluorescence en fonction de la concentration en d' $\text{H}_2\text{O}_2$ .

Dans un deuxième temps, la mesure de l'activité ACOX1 a été réalisée en utilisant le même milieu réactionnel que précédemment dans lequel est ajouté du palmitoyl-CoA (PCoA) 0,5 mM préparé dans une solution de BSA 1 mg/ml. La réaction est déclenchée par l'addition de 10  $\mu\text{l}$  d'extrait cellulaire. La cinétique d'apparition de la fluorescence est mesurée à 420 nm toute les 30 secondes durant 120 cycles (cinétique de 60 minutes) grâce à un fluorimètre à plaques (Fluorimètre/ luminomètre Infinite M200 pro, TECAN) thermostaté à 30°C. La vitesse initiale



de la réaction est déterminée à partir des courbes cinétiques et le calcul de l'activité spécifique de l'ACOX1 est exprimé en  $\mu\text{M}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$  consommé par minute par milligramme de protéine.

## 2. Mesure l'activité enzymatique de l'oxydation de palmitoyl-CoA insensible au cyanure

L'activité enzymatique de l'oxydation de PCoA insensible au cyanure est une autre méthode pour mesurer l'activité de l'acyl-CoA oxydase 1.

(L'ion de cyanure est un poison cellulaire puissant de la chaîne respiratoire, il inhibe la réduction du cytochrome C (ou le complexe IV), ce qui privera le complexe III de son coenzyme et donc l'inhibition de son activité enzymatique, par manque de coenzyme QH<sub>2</sub>, les enzymes utilisent moins de NADH et succinate et donc les complexes I, III et IV seront moins actifs. L'inhibition de l'activité d'un seul complexe parmi les cinq provoque l'inhibition de toute la chaîne respiratoire mitochondriale)

En effet, cette activité repose la capacité d'un extrait à réduire le  $\text{NAD}^+$  en présence d'acyl-CoA (ici le PCoA) et de cyanure comme décrit par Lazarow et de Duve (1976). La cinétique d'oxydation du PCoA a été évaluée par la mesure de l'activité L-3-hydroxyacyl-CoA déshydrogénase de l'enzyme bifonctionnelle (L-BPE, deuxième enzyme de la  $\beta$ -oxydation peroxysomale, Figure 7 p.49) utilisant le  $\text{NAD}^+$  comme cofacteur qui sera réduit en  $\text{NADH}, \text{H}^+$ . L'ACOX1 étant l'enzyme cinétiquement limitante de la voie de  $\beta$ -oxydation peroxysomale, la vitesse de réduction du  $\text{NAD}^+$  par la L-BPE sera celle de l'oxydation du PCoA par l'ACOX1.

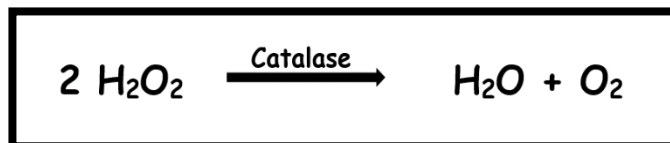
La réduction de  $\text{NAD}^+$  est suivie par la mesure de l'absorbance à 340 nm dans un volume réactionnel de 500  $\mu\text{l}$  : 25  $\mu\text{l}$  de lysat de cellules BV-2 ont été pré-incubés à 37 ° C avec un mélange de 450  $\mu\text{l}$  contenant du tampon phosphate 50 mM, pH 7,4, du DL-dithiothréitol (DTT) 12 mM, de la BSA 200  $\mu\text{g/ml}$ , de la  $\beta$ -nicotinamide adénine dinucléotide hydratée ( $\text{NAD}^+$ ) 0,2 mM et du cyanure de potassium 1 mM préparé extemporanément. La réaction est initiée par l'addition de 25  $\mu\text{L}$  de PCoA 50 mM (tous les réactifs provenaient de Sigma-Aldrich).

La cinétique de la réduction du  $\text{NAD}^+$  est suivie par spectrophotométrie à 340 nm pendant 20 min à 37 ° C. La vitesse initiale de la réaction est exprimée en  $\mu\text{mol/min}$  de  $\text{NAD}^+$  réduit et rapportée à la masse de protéine en mg (activité spécifique).



### 3. Mesure directe de l'activité enzymatique de la catalase

L'activité enzymatique de la catalase, correspondant à la dismutation du substrat  $\text{H}_2\text{O}_2$  (peroxyde d'hydrogène) en eau et en dioxygène (Figure 17), est mesurée en suivant la diminution de l'absorbance à 240 nm par spectrophotométrie.

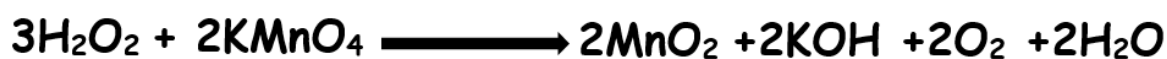


*Figure 17: La réaction enzymatique de la dismutation de l' $\text{H}_2\text{O}_2$  catalysée par la catalase.*

La préparation d'une solution fraîche d' $\text{H}_2\text{O}_2$  400 mM est réalisée à partir de la solution commerciale à 30% (p/p) dans l'eau (sigma-Aldrich). La disparition de l' $\text{H}_2\text{O}_2$  est suivie dans un volume final de 200  $\mu\text{l}$  contenant 190  $\mu\text{l}$  de mélange réactionnel (Tris-HCl 1 M, pH 7,  $\text{H}_2\text{O}_2$  20 mM) et 10  $\mu\text{l}$  du lysat cellulaire (dilué si nécessaire). La cinétique de disparition de l' $\text{H}_2\text{O}_2$  est mesurée en suivant l'absorbance à 240 nm durant 2 minutes (40 cycles avec un intervalle de 3 secondes chacun) grâce à un spectrophotomètre à plaques (Fluorimètre/ luminomètre Infinite M200 pro, TECAN). Enfin, la vitesse initiale de la réaction est déterminée à partir des courbes cinétiques et le calcul de l'activité spécifique de la catalase est exprimé en  $\mu\text{M}$  d' $\text{H}_2\text{O}_2$  consommé par minutes par milligramme de protéine.

### 4. Mesure de l'activité enzymatique de la catalase par la méthode au $\text{KMnO}_4$

C'est une méthode de mesure d'activité enzymatique en point final. Le principe est de mesurer la concentration finale d' $\text{H}_2\text{O}_2$ , après action de la catalase, par sa réaction avec du  $\text{KMnO}_4$ . En effet, le permanganate de potassium, de couleur violette, est oxydé en dioxyde de manganèse incolore par l' $\text{H}_2\text{O}_2$  selon la réaction présentée dans la Figure 18. La concentration de  $\text{KMnO}_4$  restant après réaction totale de l' $\text{H}_2\text{O}_2$  est calculée à partir de la mesure de son absorbance à 480 nm.



*Figure 18: la réaction enzymatique de l'oxydation de  $\text{KMnO}_4$  par le  $\text{H}_2\text{O}_2$*

Pratiquement la réaction est suivie dans volume de 200  $\mu\text{l}$  contenant 10  $\mu\text{l}$  du lysat cellulaire auquel 30  $\mu\text{l}$  de la solution fraîchement préparée de  $\text{H}_2\text{O}_2$  à 7,3 mM est ajoutée. Le mélange est ensuite incubé 3 minutes, temps correspondant à la dégradation de l' $\text{H}_2\text{O}_2$  par la catalase

contenue dans le lysat cellulaire. La réaction est arrêtée avec 20 µl d'acide sulfurique 6N. Ensuite, 140µl d'une solution de KMnO<sub>4</sub> à 2mM est préparée, placée dans l'injecteur du spectrophotomètre à plaques (Fluorimètre/ luminomètre Infinite M 200 pro TECAN) pour suivre l'oxydation de KMnO<sub>4</sub> par le H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> restant dans l'essai.

L'oxydation de KMnO<sub>4</sub> est une réaction rapide. Cette réaction d'oxydation est proportionnelle à l'activité de la catalase.

Enfin, l'activité spécifique de la catalase est exprimée en µM d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> consommées par minutes par milligramme de protéine.

### 5. Mesure de l'activité enzymatique de la β-galactosidase

L'activité β-galactosidase, utilisée comme marqueur cytoplasmique lors du fractionnement cellulaire, est mesurée avec le 4-Méthylumbelliferyl β-D-galactopyranoside (MUG) comme substrat en point final (Peters, et coll., 1972). L'hydrolyse du MUG par la β-galactosidase libère du galactose et le composé fluorescent 4-méthylumbellifère (excitation à 372 nm et émission à 450 nm). Pratiquement, 10 µL des dilutions des différentes fractions ENMLPS et du gradient Nycodenz, sont incubées avec 90 µl d'un mélange réactionnel composé de tampon citrate 50 mM, pH 4,5, de Triton X-100 0,05% et du substrat MUG 5 mM (solution mère préparée dans le DMSO). Les différents essais ont été incubés pendant 1 heure pour les fractions ENMLPS et 3 heures pour les fractions du gradient dans un bain-marie à 37°C. Après le temps d'incubation, la réaction est arrêtée en ajoutant 1,2 ml de solution de fixation (solution B) (tampon glycine 50 mM, pH 10,5, EDTA 5 mM et Triton X-100 0,05%) par cuvette. La fluorescence est lue à une longueur d'onde de 450 nm.

### 6. Mesure de l'activité enzymatique de la β-hexoaminisidase

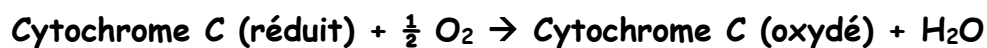
L'activité β-hexoaminosidase, utilisée comme marqueur lysosomal lors du fractionnement cellulaire, est mesurée avec la 4-Méthylumbelliferyl N-acetyl-β-glucosaminide comme substrat en point final (Peters et coll., 1972). L'hydrolyse de ce substrat par la β-hexoaminosidase libère du N-acetyl-β-glucosaminide et le composé fluorescent 4-méthylumbellifère (excitation à 372 nm et émission à 450 nm). Le protocole réactionnel est le même que celui de l'activité β-galactosidase (chapitre IV.I.5), avec le 4-MU-N-acetyl-β-D glucosaminide 5 mM préparé dans le DMSO.

## 7. Mesure de l'activité enzymatique de la Cathepsine-C

L'activité dipeptidyl peptidase I, portée par la Cathepsine-C et utilisée comme marqueur lysosomal lors du fractionnement cellulaire, est mesurée avec la H-Gly-Arg-7-amido-4-méthylcoumarine (H-Gly-Arg-AMC) comme substrat en point final (Hamer & Jadot, 2005; Peters et coll., 1972). L'hydrolyse de ce substrat par la Cathepsine-C libère le dipeptide H-Gly-Arg et le composé fluorescent 7-amido-4-méthylcoumarine (excitation à 350 nm et émission à 450 nm). Le protocole réactionnel est le même que celui de l'activité  $\beta$ -galactosidase (chapitre IV.I.5), le substrat et son activateur préparé comme suit : le substrat H-Gly-Arg-AMC fraîchement préparé 50 mM dans du tampon acétate 1 M pH 5. L'activateur est la mercaptoéthylamine préparée dans un tampon acétate à 0,2 M, pH 5 et triton X-100 2%.

## 8. Mesure de l'activité enzymatique du cytochrome C oxydase

La cytochrome C oxydase est une protéine mitochondriale constituant le complexe IV. Le dosage de son activité va donc donner une indication sur l'enrichissement des fractions en mitochondries. La réaction est catalysée par le complexe IV est présenté dans la Figure 19.



*Figure 19: La réaction enzymatique de l'oxydation du cytochrome C*

Le dosage consiste donc à suivre la disparition du cytochrome C réduit par la mesure de de son absorbance à 550 nm, la vitesse de diminution de l'absorbance étant proportionnelle à l'activité du complexe IV (Della Valle et coll., 2011; Leighton et coll., 1968).

L'activité du cytochrome c oxydase a été mesuré à la température ambiante en utilisant du cytochrome c oxydase 22  $\mu$ M réduit avec de la dithionite de sodium 30 mM sous forme de substrat dans un tampon phosphate de sodium 30 mM, pH 7,4, EDTA 1 mM.

La mesure de l'activité se fait par l'addition de 50  $\mu$ l de chaque fraction à une cuve préalablement remplie avec 1 ml de mélange réactionnel (cytochrome réduit à 90%). Ensuite, la cinétique de l'absorbance est suivie durant 2 minutes à la longueur d'onde de 550 nm.

## 9. Mesure de l'activité enzymatique de l' $\alpha$ -glucosidase alcaline

La mesure de l'activité  $\alpha$ -glucosidase alcaline, réalisée dans les fractions en utilisant le 4-MU- $\alpha$ -D-glucopyranoside comme substrat à 5 mM, suit le même principe et le même

protocole que le dosage des enzymes marqueur des lysosomes (chapitres IV.I.6 et IV.I.7 , p.101) (Peters et coll., 1972).

#### 10. Mesure de l'activité enzymatique de la dipeptyl peptidase III (DPP III)

L'activité DPP III, portée par une métallopeptidase, est utilisée comme marqueur du cytosol lors du fractionnement cellulaire. Cette activité enzyme présente une activité maximale à un pH compris entre 7,5 et 9,5. Le substrat utilisé est l'H-Arg-Arg-7-amido-4-méthylcoumarin (H-Arg-Arg-AMC) (Peters et coll., 1972). L'hydrolyse de ce substrat par la DPP III libère le dipeptide H-Arg-Arg et le composé fluorescent 7-amido-4-méthylcoumarine (excitation à 350 nm et émission à 450 nm). Le protocole réactionnel est le même que celui de l'activité de la cathepsine-C (chapitre IV.I.7, p.102), avec le substrat H-Arg-Arg-AMC 250 µM préparé dans du tampon Tris-HCl 0,5M, pH 8.

#### 11. Western-blot

Le western blot est une technique qui permet la détection, l'identification et la mesure du taux d'expression de protéines spécifiques dans un échantillon biologique.

##### a) *Extraction des protéines*

##### (1) *Extraction des protéines à partir des cellules*

Les protéines sont extraites à partir des cellules BV-2 selon le protocole décrit dans la section (G1. Préparation des lysats cellulaires dans matériel et méthode).

##### (2) *Précipitation des protéines dans les fractions ENMLPS*

Étant donnée la faible concentration en protéines (1 à 3 µg /µl) dans les fractions ENMLPS issues d'un processus de fractionnement subcellulaire complet des cellules BV-2, une précipitation des protéines est une étape.

Après avoir réalisé un dosage des protéines des différentes fractions par la méthode de Bradford, le volume de chaque fraction correspondant à une quantité de 50µg (quantité qui doit être déposée pour le western blot) est prélevé dans un tube eppendorfs. Un volume équivalent en eau milli-Q est ajouté, puis, 4 volumes d'acétone glacé sont ajoutés (l'acétone est pré-incubé pendant 24h à -20°C). Le mélange est alors fortement agité (vortex) pendant 3 minutes et incubé 1h30 à -20°C. Ensuite, le mélange est centrifugé à 20000 g pendant 20 minutes à 4°C. Le surnageant est éliminé et le culot est laissé à sécher pendant 30 minutes à température ambiante.

Enfin, le culot est solubilisé avec 30 à 50 µl de tampon de Laemmli (4x). La solution peut alors être utilisée ou congelés à cette étape.

*b) Préparation des échantillons et Séparation des protéines en SDS-PAGE (PolyAcrylamid Gel Electrophoresis)*

Les échantillons sont préparés de façon à déposer le même volume dans tous les puits ainsi que la même quantité de protéines. Les échantillons protéiques issue des lysats cellulaires sont préparés avec du tampon dénaturant (Tris HCl 250 mM, pH 6,8, glycérol 40%, β-mercaptoéthanol 20%, SDS 10%, quelques cristaux de bleu de bromophénol), un volume de l'échantillon contenant les protéines (50 µg) et un volume d'eau ultra pure pour ajuster tous les tubes au même volume final. Les échantillons peuvent être congelés à cette étape. Un gel de séparation de 8 à 14% (selon le poids moléculaire de la protéine cible) d'acrylamide/bisacrylamide (rapport : 37,5/1) et d'épaisseur 1 à 1,5 mm est d'abord coulé puis un gel de concentration de 4% est coulé dans un système d'électrophorèse (BioRad). Les cinquante microgrammes de protéines sont déposés et concentrés dans le gel de 4% (Tris HCl 125 mM, SDS 0,1%, acrylamide/bisacrylamide 4%, pH 6,8) à 75V, puis séparés à 150V dans le gel de séparation (Tris HCl 375 mM, pH 8,8, SDS 0,1%, acrylamide/ bisacrylamide 8 à 14%). Après leur séparation, les protéines sont transférées sur membrane PVDF (Biorad) en milieu liquide dans un tampon de transfert (Tris base 50 mM, acide borique 50 mM) sous l'action d'un champ électrique de 100V pendant une heure et demi.

*c) Détection des protéines et révélation*

Les membranes obtenues sont ensuite incubées durant la nuit sous agitation dans une solution de saturation de PBS-tween 20 0,1% (PBST), lait 5%. L'incubation avec les anticorps primaires est réalisée dans différentes solutions en fonction de l'anticorps. Les membranes sont rincées trois fois pendant 5 minutes à chaque fois avec du PBS1X puis incubées pendant 1 heure sous agitation en présence les anticorps primaires diluées dans PBS1X tween-20 0,1% lait 5% dans un sac d'hybridation. Les membranes sont rincées trois fois pendant 5 minutes à chaque fois avec du PBS1X puis incubées pendant 1 heure en présence de l'anticorps secondaire couplé à la peroxydase HRP (Santa Cruz) dilué au 1/10000 dans PBS1X tween-20 0,1% lait 5%. Après 3 nouveaux lavages de 5 minutes, la membrane est révélée en utilisant le kit Supersignal West Femto Maximum Sensitivity (Fisher Scientific). Le signal est enregistré durant un temps d'exposition qui varie en fonction de signal obtenu de 1 à 30 minutes avec l'appareil ChemiDoc

XRS+ (BioRad) et pour certaines protéines, l'analyse de densitomètre des bandes obtenues est effectuée par le logiciel Image Lab (BioRad).

#### *d) Déshybridation d'une membrane*

Il est possible sous certaines conditions, de révéler plusieurs protéines sur la même membrane (cas de la  $\beta$ -actine par exemple pour normaliser le signal). Dans ce cas, les membranes déjà utilisées, sont incubées ainsi avec un tampon acide de «stripping» (glycine-HCl 25mM pH=2, SDS 1%,) (permettant de dissocier l'anticorps primaire de son antigène) pendant 30 minutes à température ambiante sous agitation. Après trois lavages de 5 minutes dans du PBS1X tween-20 0,1%, les membranes sont à nouveau saturées pour y être incubées de nouveau avec d'autres anticorps primaires.

## 12. RT-qPCR

#### *a) Extraction des ARN à partir des cellules*

L'extraction des ARN est réalisée avec le kit RNeasy Mini Kit (Qiagen) selon les instructions fournies du fabricant. Les culots cellulaires sont lavés au DPBS et centrifugé pour éliminer les traces du milieu de culture puis un volume de tampon de lyse (buffer RLT) est ajouté directement sur les cellules (adapté en fonction du nombre de cellules). Ensuite, un volume d'éthanol à 70% est ajouté et le mélange est homogénéisé. Le lysat est alors passé sur une colonne RNeasy spin placée dans un tube de 2 mL puis centrifugé 30 secondes à 8000g. Cette étape permet de retenir les ARN dans la colonne. Deux lavages des colonnes sont effectués avec le tampon RW1 puis centrifugé 30 secondes à 8000g. Un nouveau lavage est réalisé avec le tampon RPE (avec une centrifugation de 30 secondes à 8000 g pour laver la colonne). La colonne est ensuite séchée par une centrifugation de 1 minute à 12000g puis cette dernière est placée dans un nouveau tube Eppendorf. Un volume de 30  $\mu$ L d'eau ultra-pure (RNase free) est ajouté dans la colonne puis une centrifugation d'une minute à 8000 g permet de récupérer les ARN totaux. Les ARN peuvent alors être congelés à -80°C.

#### *b) Extraction des ARN à partir des tissus*

L' extraction d' ARN à partir des tissus de souris est réalisée selon la méthode de Trizol, en utilisant TRI Reagent<sup>®</sup> (Sigma-Aldrich). Les fragments de tissus de foie ou de cerveau ont été homogénéisés avec 1 ml de réactif TRI Reagent<sup>®</sup>, et incubé pendant 5 minutes à une température (15 à 30°C), cette étape permet la dissociation complète des complexes de

nucléoprotéines. Ensuite, 200 µl de chloroforme est ajouté, le mélange est mélangé par vortex pendant 15 secondes, et incubé pendant 15 minutes à la température ambiante. Une étape de centrifugation à 12000 g pendant 15 minutes à 4°C est réalisée. La phase aqueuse (surnagent) qui correspond à l'ARN est transférée dans un nouveau tube. 500 µl d'isopropanol est ajouté, le mélange est incubé à la température ambiante pendant 10 minutes et centrifugé à 12 000g pendant 10 minutes à 4°C. Le précipité d'ARN forme un culot au fond du tube, le culot est lavé avec 1 ml d'éthanol à 75% puis centrifugé à 12000 g pendant 15 minutes. L'ARN forme un visible granulé blanc. Le surnagent est retiré, et l'ARN est repris dans 50 µl de RNAase-free water. Enfin, l'ARN est conservé à -80°C.

#### *c) Dosage des ARN*

Les extraits d'ARN doivent être dosés au préalable pour pouvoir faire la RT-qPCR. Pour cela, 2 µL d'échantillons sont placés sur le dispositif TrayCell (Hellma) et la densité optique (DO) est lue à 260 nm et 280 nm par le spectrophotomètre (UV-1800, Shimadzu). Le rapport DO 260 nm / DO 280 nm doit être situé entre 1,8 et 2,2. Ce rapport signifie que les échantillons ne sont pas contaminés par des protéines. La valeur de la DO à 260 nm permet de calculer la concentration en ARN de l'échantillon avec le logiciel UVProbe (Shimadzu).

#### *d) Reverse Transcription (RT) des ARNm*

Afin de pouvoir quantifier les ARNm par qPCR, ces derniers doivent être rétro-transcrits en ADN complémentaires (ADNc). Pour cela, après avoir dosés les ARNs originaux, La RT est réalisée avec le kit GoTaq® 2-Step RT-qPCR System (Promega) selon les instructions fournies du fabricant. Pour chaque condition on a : 5 µg d'ARN, 1µL de Primer Oligo (dT)<sub>15</sub>, 1 µL Random Primer et qsp 10µl de l'eau ultra pure (Nuclease Free Water). Ensuite, le volume est apporté à 20 µL en ajoutant 10µl d'une mixture contenant : 1,5µl Nuclease Free water, 4µl GoScript™ 5X Reaction Buffer, 2µl MgCL<sub>2</sub> à 25mM, 1µl PCR Nucleotide Mix, 0,5µl Recombinant RNasine® Ribonuclease Inhibitor et 1µl de GoScript™ Reverse Transcriptase. Les échantillons sont alors chauffés 5 minutes à 25°C puis 1 heure à 42°C (température de réaction de la RT) et 15 minutes à 70°C (destruction de l'enzyme). Les ARN sont alors rétro-transcrits en ADNc et peuvent être stockés à -20°C jusqu'à l'utilisation ultérieure.

#### *e) Réaction de polymérisation en chaîne en temps réel : qPCR*

Le principe de la réaction de la PCR quantitative repose sur la quantification du niveau d'expression d'un gène donné, après transcription reverse de l'ARNm en ADNc et une réaction



de PCR grâce à la fluorescence émise par fluorophore qui s'intercale entre les brins de l'ADN néosynthétisé au cours de cette réaction de PCR. Le fluorophore utilisé au cours de cette réaction est le SYBR® Green. Les amorces murines utilisées pour chacun des gènes amplifiés ont été choisies PrimerBank (Harvard Medical School). Le gène de référence utilisé code la phosphoprotéine ribosomale acide PO (36B4) (<http://pga.mgh.harvard.edu/primerbank/>). Cette méthode de PCR en temps réel nécessite le calibrage de la réaction et de l'appareil par l'amplification d'une gamme de dilution des ADNc. Des dilutions en série sont réalisées partir d'un mélange de tous les produits de RT dilués. En effet, l'expression de ce gène ne doit pas être modifiée par les différents traitements appliqués sur les cellules.

#### *f) Préparations des échantillons*

La réaction de transcription inverse est réalisée dans un volume final de 20 µl auquel 80 µl de DNA Free water ont été ajoutés pour obtenir un volume final de 100 µl. À partir de ces échantillons, une gamme de dilution a été réalisée pour servir de standard pour la réaction de qPCR. Un volume de 25 µl de chacun des échantillons est prélevé et mélangé pour constituer le premier point de gamme, nommé arbitrairement « 1/64 ». Les points suivants seront réalisés par dilutions au 1/2 en cascade et donneront les points « 1/32 », « 1/16 », « 1/8 », « 1/4 » et « 1/2 ». Les 75 µl de ADNc restant de RT sont complété avec de DNA Free water à 225 µl.

Cette gamme permet de mesurer l'efficacité de l'amplification de chaque gène sur la plaque de qPCR. En effet, pour une efficacité de 100%, il y aura un cycle d'amplification d'écart entre chaque point de la gamme. Par exemple, le point à 1/2 aura 1 Ct de moins que le point au 1/4 et ainsi de suite. Une gamme est réalisée pour chaque gène étudié.

#### *g) Réaction de qPCR*

Chaque échantillon est analysé en double dans des plaques 96 puits (Applied Biosystems). Chaque puits contient un volume réactionnel de 12,5 µl constitué de la manière suivante : 6,25 µl de GoTaq® 2-Step RT-qPCR System (Promega), 2,5 µl d'ADNc (produit de RT dilués) de 0,04 µl d'amorce sens (100 µM), 0,04 µl d'amorce anti-sens (100 µM). Le volume final est de 12,5 µL et la concentration finale des amorces est de 300nM.

La qPCR est effectué sur l'appareil StepOne Plus de (Life Science Technologies) avec le programme suivant : La PCR débute par une étape de chauffage à 95°C pendant 10 minutes pour activer la Taq polymérase ; Ensuite, une étape de dénaturation qui se déroule en 40 cycles de 15 secondes chacun à 95°C suivie d'une étape d'hybridation-élongation pendant 1 minute à 60°C. Après chaque réaction d'amplification, une droite d'étalonnage



est établie indiquant l'efficacité de la réaction de PCR pour chaque couple d'amorces. Enfin, un cycle passant de 60°C à 95°C pour faire une courbe de fusion. La courbe de fusion permet d'évaluer la spécificité des amplicons obtenus.

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

Au niveau expérimental, la quantité de produit formé dépend d'un facteur primordial qui est l'efficacité d'amplification ( $E$ ) définie comme étant la proportion moyenne des molécules d'ADN cible se dupliquant à chaque cycle d'amplification. Pour que la PCR soit exploitable, l'efficacité doit être comprise entre 90 et 110%. Cette droite d'étalonnage a pour équation  $C_t = \log(\text{facteur de dilution}) + C_t \text{ ADNc non dilués}$ . Le  $C_t$  (« cycle threshold » ou cycle seuil) est défini comme la valeur cycle pour laquelle la quantité de fluorescence dépasse de manière significative le seuil de détection de l'appareil. En parallèle à cette gamme d'étalonnage, les échantillons sont amplifiés et les valeurs de  $C_t$  obtenues sont reportées sur la droite standard. L'efficacité de la réaction est calculée par le logiciel StepOne software.

# Résultats

---

*Études des effets protecteurs des extraits de la raquette de cactus -Opuntia ficus indica- sur les fonctions peroxysomales des cellules BV-2 microgliales activées par des lipopolysaccharides*  
**(Article)**

---

## A. Introduction

Depuis très longtemps et jusqu'à nos jours, le cactus, *Opuntia ficus indica* est utilisé comme remède dans la médecine traditionnelle et également comme source de nutriments végétaux dans de nombreux pays. Cette dernière décade, de nombreux travaux scientifiques ont démontré le bénéfice potentiel de l'utilisation de cette plante dans la nutrition et la santé humaine. Notamment, de nombreuses méthodes ont décrits la composition riche du cactus en polyphénols, en vitamines, en acides gras polyinsaturés, en acides aminés et en oligoéléments naturels (El-Mostafa et coll., 2014).

Les conclusions d'un certain nombre études, menées *in vitro* et *in vivo*, s'accordent dans leurs conclusions sur le fait que les extraits d'*Opuntia ficus indica* montrent des effets antioxydants et anti-inflammatoires. Ces effets méritent d'être explorés plus en avant sur le plan pharmacologique et sur le plan thérapeutique (El-Mostafa et coll., 2014).

Actuellement, il est bien admis que l'inflammation et le stress oxydant sont des phénomènes communs et jouant un rôle crucial dans la pathogenèse de nombreuses affections humaines, notamment dans les maladies neurodégénératives. Parmi les cellules du système nerveux, les cellules microgliales ont un rôle central dans la neuroinflammation et dans la physiopathogenèse liées à ces maladies en produisant des molécules pro-inflammatoires comme le TNF $\alpha$ , les interleukines 1 et 6, ainsi que le nitro-oxide NO (Pawate, et coll., 2004; Perry & Teeling, 2013; Cunningham, 2013). La surproduction de ROS par la microglie affecterait les neurones aboutissant à la neurodégénérescence (von Bernhardt, et coll., 2015). L'activation de cellules microgliales par les lipopolysaccharides (LPS) induisent la mort des neurones et des oligodendrocytes (Baud, et coll, 2005). En effet, les LPS, composants majeurs de la paroi externe des bactéries Gram-négatif, sont constitués des trois entités : le lipide A, le noyau (Core) et l'antigène-O. Ces molécules présentent souvent un intérêt en médecine en raison de leurs propriétés immun-modulatrices. La production de ROS par les cellules microgliales activées par les LPS joueraient un rôle majeur dans la neurotoxicité qui peut être largement atténuée en neutralisant le peroxyde d'hydrogène et les anions superoxydes en traitant respectivement par la catalase et la superoxyde dismutase (Wang, et coll., 2004; Nell et coll., 2017) . Ces résultats révèlent le rôle des enzymes antioxydantes, en l'occurrence peroxysomales comme la catalase.

## B. Objectif

L'objectif du travail réalisé dans ce chapitre a porté sur l'étude des effets antioxydants et anti-inflammatoires des extraits issus de la raquette de cactus -*Opuntia ficus indica*- sur les fonctions peroxysomales dans les cellules BV-2 de la microglie activée par quatre types différents de lipopolysaccharides.

## C. Les lipopolysaccharides

Les lipopolysaccharides sont des composants distaux ancrés dans le feuillet externe de la membrane externe bactérienne (Reeves, 1995), ils représentent 40% de la surface cellulaire, c'est un complexe macromoléculaire responsable d'un ensemble des activités biologiques (Joklik, et coll., 1984). Les lipopolysaccharides sont des molécules endotoxiques qui agissent comme molécules de signalisation aussi capables de déclencher un processus inflammatoire systémique. Actuellement, les structures moléculaires de différents types de lipopolysaccharides issus de plusieurs espèces de bactéries Gram (-) ont été bien caractérisées (Neidhardt, 1987). Ces composés possèdent tous une architecture de base commune contenant ainsi 3 régions. (i) **Le lipide A** : possède un caractère hydrophobe, c'est la partie la plus active des lipopolysaccharides et hautement endotoxique situé à la partie proximale du LPS et à l'intérieure de la bicouche lipidique. (ii) **Le noyau** ou «*core*» : se divise en deux parties : un noyau interne qui possède un caractère hydrophobe et un noyau externe avec un caractère hydrophile. Le «*Core*» est de nature polysaccharidique forme un pont entre l'antigène O et le lipide A ; et (iii) **l'antigène O** : possède un caractère hydrophile, composé des polysaccharides situés à la partie distale du LPS, responsable de la spécificité de chaque stéréotype bactérien représentant une sorte d'empreinte digitale des bactéries.

En fonction de la présence ou de l'absence de ces trois parties on distingue différentes formes des lipopolysaccharides : (i) **La forme complète de LPS** «*Smooth LPS*» ou «*LPS Lisse*» contient les 3 parties composantes des lipopolysaccharides ; (ii) **La forme mutante de LPS** «*Rough LPS*» ou «*LPS Rugueux*» cette structure incomplète ne contient pas l'antigène O ; et (iii) **La forme mutante de LPS** «*deep rough LPS*» ou «*LPS rugueux profond*». C'est une forme dont la structure ne contient pas les des deux parties : l'antigène O et le core (Hitchcock et coll., 1986).

Plusieurs études ont montré que la structure du Lipide A est fortement conservée chez les bactéries Gram (-) (Tanamoto et coll., 1984). La structure de l'antigène O est extrêmement

variable tandis que les structures de certaines régions du noyau central étaient fortement conservées entre les différentes souches. Chez *E. coli*, il existe 5 types de noyaux connus : R1-R2-R3-R4 et K-12 et chez *Salmonella* seulement deux noyaux semblables ont été décrits à ceux de *E. coli*. Les structures des oligosaccharides des noyaux dans les deux souches sont différentes mais le squelette de base est un oligosaccharide linéaire de 6 unités de sucres courants : Kdo, Hep, D-glucose, D-galactose (Heine, et coll., 2003; Zarrouk et coll., 1997)

Au cours des cinq dernières décades, les effets toxiques de LPS ont fait l'objet de nombreuses études afin d'avoir des informations supplémentaires nécessaires pour comprendre la pathogénicité des différentes structures qui les composent. La structure de lipide A responsable de la toxicité générée par le LPS diffère d'une souche bactérienne à une autre. Le Lipide A avec six chaînes d'acides gras peut activer le système immunitaire par le biais du récepteur TLR4. Cependant, un Lipide-A à 4 chaînes ne peut pas activer le système immunitaire. Or, cette partie du LPS peut assurer plusieurs activités biologiques à l'exemple de (Brade, et coll., 1988):

- L'activation d'adjuvant, du complément, des macrophages et des granulocytes
- L'induction de l'interleukine 1, de l'interféron et du facteur de nécrose tumorale
- L'induction des prostaglandines, des leucotriènes et de l'activité pro-coagulante

À noter que la réponse et la sensibilité à l'endotoxicité du Lipide-A diffère d'une espèce animale à une autre. L'Homme étant l'espèce la plus sensible, alors que le lapin est la plus résistante de ces espèces (Szalo, et coll., 2006).

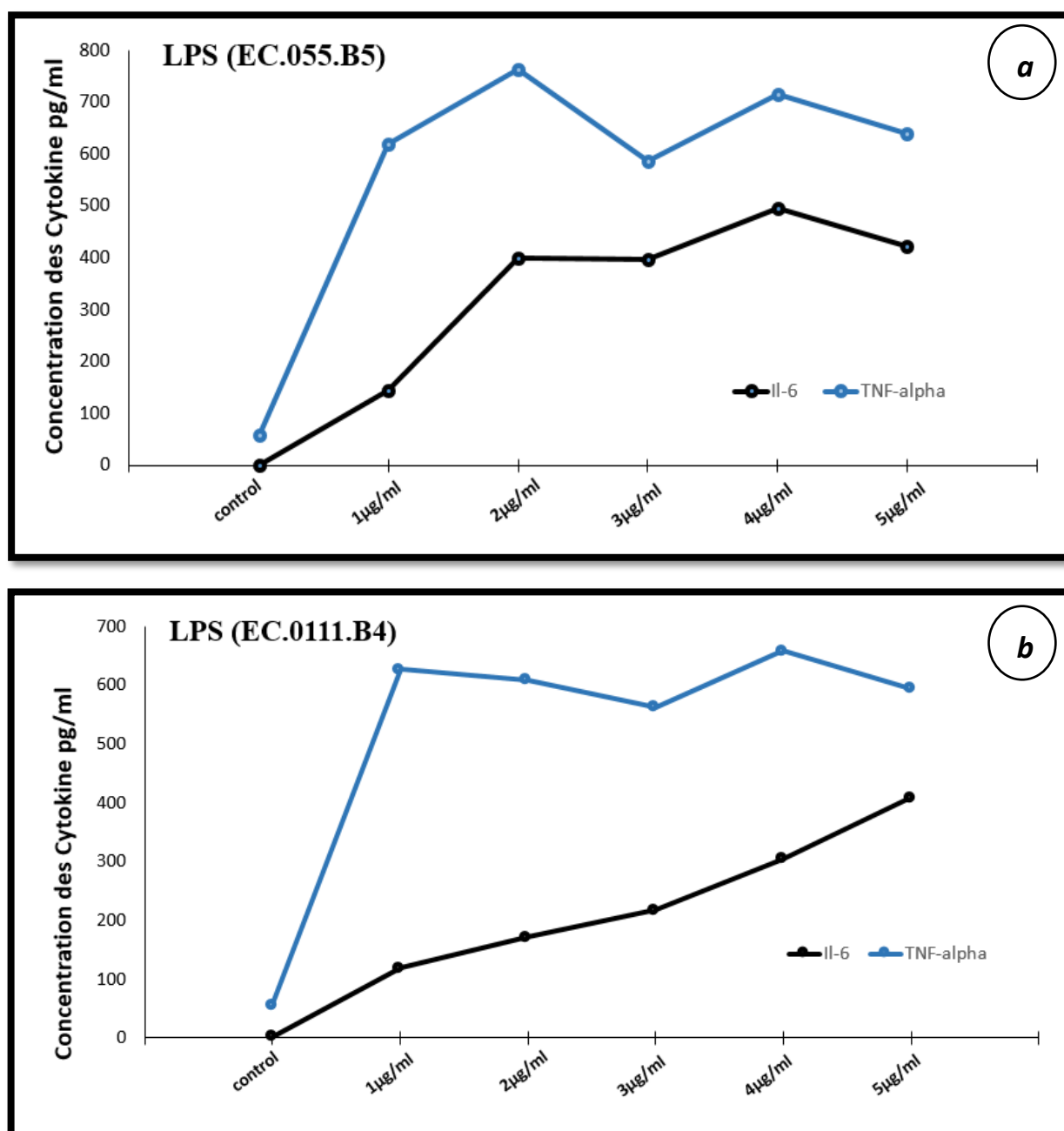
Concernant l'antigène-O qui est la partie immunogène du LPS, assurant différentes fonctions, on cite parmi celles-ci :

- La résistance à l'action du complément (Wilson, et coll, 2011).
- La résistance à la phagocytose (Wilson et coll., 2011)
- Le mimétisme moléculaire (Aspinall et coll., 1994).
- L'adhérence aux tissus de l'hôte (Jacques, 1996).

Le LPS avec sa structure, sa composition complexe et ses systèmes de biosynthèse et de transfert reste un composant capital et majeur de la membrane bactérienne. C'est un élément dont la voie de biosynthèse et les rôles physiopathologiques restent à bien étudier et clarifier. Il peut constituer une bonne cible non seulement pour la recherche fondamentale mais aussi pour le secteur biopharmaceutique.

Les lipopolysaccharides pourraient jouer un rôle important dans le processus inflammatoire chez les patients atteints des troubles neurodégénératives telles que la maladie d'Alzheimer, la sclérose en plaque et les leucodystrophies peroxysomales. À faible concentrations, les LPS peuvent être bénéfiques mais à forte concentration, ils peuvent provoquer un choc septique. Des études ont montré l'effet du LPS sur les fonctions peroxysomales. En effet, ils peuvent altérer la composition de la membrane peroxysomale en diminuant le nombre de peroxysomes dans le foie de rat et en augmentant l'expression des protéines peroxysomales. Nous avons montré une baisse de l'expression des gènes impliqués dans l'oxydation peroxysomale hépatique des acides gras chez les souris traitées aux LPS. Un traitement des cellules gliales C6 du rat avec le LPS provoque une diminution de l'activité de l'ACOX1 et de l'oxydation des AGTLC. Dans les fibroblastes de patients déficients en ACOX1, le traitement avec le LPS induit une prolifération des peroxysomes suite à l'activation des PPAR $\alpha$  et de PGC-1 $\alpha$ . Les données bibliographiques sur la nature du LPS utilisé dans les nombreuses études réalisées pour l'activation des cellules microgliales révèlent une large diversité de ces structures. Les LPS bien qu'ils partagent une architecture structurales globale commune, des variations de leur architecture moléculaire exerceraient une forte influence sur leurs activités biologiques ainsi que sur les différentes voies métaboliques qu'ils impactent. En effet, les LPS activent la voie de signalisation du facteur nucléaire NF $\kappa$ B qui induit l'expression de cytokines pro-inflammatoires TNF $\alpha$  et IL-6 (Kono et coll., 2009; Thiemermann, et coll., 1995). Nous avons pu confirmer ces données dans nos expériences préliminaires pour cette

partie en traitant les cellules BV-2 avec une gamme de concentrations allant de 1 à 5 µg/ml de LPS issus d'*E. coli* (O111.B4 et O55.B5) comme le montre la Figure 20.



**Figure 20: Le taux de sécrétion des cytokines (IL-6 et TNF $\alpha$ ) dans le milieu de culture des cellules BV-2.**

La figure montre le taux de sécrétion des cytokines IL-6 et TNF $\alpha$  dans le milieu de culture des cellules BV-2 après un traitement de 24 heures avec les LPS issus de *E. coli* (a) EC O111.B4 et (b) EC O55.B5. (n=3)

L'expression de deux cytokines pro-inflammatoires ont été mesurées dans les milieux de culture de cellules BV-2. Les résultats montrent que les niveaux de l'intensité de la réponse pour les sérotypes de LPS testés semblent être équivalents aussi bien pour IL-6 que pour le



TNF-alpha. Ceci indique que ces 2 sérotypes activent de manière similaire les cellules microgliales BV-2. Cependant, il reste à savoir, malgré cette réponse inflammatoire équivalente, si l'effet sur les fonctions peroxysomales est également équivalent quel que soit le sérotype de LPS. Nous avons donc voulu étendre cette analyse à d'autres sérotypes et c'est ce qui est présenté dans l'article suivant publié dans la revue *Molecules* qui décrit à la fois la réponse en termes d'activités peroxysomales de cellules microgliales vis-à-vis de quatre sérotypes différents de LPS et les effets protecteurs d'extraits de cactus vis-à-vis des fonctions peroxysomales.

Article

# Protective Effect of Cactus Cladode Extracts on Peroxisomal Functions in Microglial BV-2 Cells Activated by Different Lipopolysaccharides

Fatima-Ezzahra Saih <sup>1,2,3</sup>, Pierre Andreoletti <sup>1,2</sup>, Stéphane Mandard <sup>4</sup>, Norbert Latruffe <sup>1,2</sup>, M'Hammed Saïd El Kebbaj <sup>5</sup>, Gérard Lizard <sup>1,2</sup>, Boubker Nasser <sup>3</sup> and Mustapha Cherkaoui-Malki <sup>1,2,\*</sup>

- <sup>1</sup> Laboratoire BioPeroxiL, Biochimie du Peroxysome, Inflammation et Métabolisme Lipidique, EA 7270, Unité de Formation et de Recherche des Sciences Vie, Terre et Environnement, 21000 Dijon, France; f.z.saih@hotmail.com (F.-E.S.); pierre.andreoletti@u-bourgogne.fr (P.A.); norbert.latruffe@u-bourgogne.fr (N.L.); gerard.lizard@u-bourgogne.fr (G.L.)
  - <sup>2</sup> Laboratoire BioPeroxiL, Université Bourgogne-Franche Comté, 6 Bd Gabriel, 21000 Dijon, France
  - <sup>3</sup> Laboratoire de Biochimie et Neurosciences, Faculté des Sciences et Techniques, Université Hassan I, BP 577, 26 000 Settat, Morocco; boubker\_nasser@hotmail.com
  - <sup>4</sup> Lipness Team, INSERM, Research Center UMR866 and LabEx LipSTIC, Faculté de Médecine, Université de Bourgogne-Franche Comté, 21079 Dijon CEDEX, France; stephane.mandard@u-bourgogne.fr
  - <sup>5</sup> Laboratoire Biologie et Santé, Faculté des Sciences Ben M'sik, Université Hassan II-Casablanca, Avenue Cdt Driss El Harti BP 7955, 20100 Casablanca, Morocco; mselkebbaj@yahoo.fr
- \* Correspondence: malki@u-bourgogne.fr; Tel.: +33-3-8039-6205

Academic Editor: Derek J. McPhee

Received: 25 October 2016; Accepted: 4 January 2017; Published: 7 January 2017

**Abstract:** In this study, we aimed to evaluate the antioxidant and anti-inflammatory properties of *Opuntia ficus-indica* cactus cladode extracts in microglia BV-2 cells. Inflammation associated with microglia activation in neuronal injury can be achieved by LPS exposure. Using four different structurally and biologically well-characterized LPS serotypes, we revealed a structure-related differential effect of LPS on fatty acid  $\beta$ -oxidation and antioxidant enzymes in peroxisomes: *Escherichia coli*-LPS decreased ACOX1 activity while *Salmonella minnesota*-LPS reduced only catalase activity. Different cactus cladode extracts showed an antioxidant effect through microglial catalase activity activation and an anti-inflammatory effect by reducing nitric oxide (NO) LPS-dependent production. These results suggest that cactus extracts may possess a neuroprotective activity through the induction of peroxisomal antioxidant activity and the inhibition of NO production by activated microglial cells.

**Keywords:** acyl-CoA oxidase 1; catalase;  $\beta$ -oxidation; *Escherichia coli*; lipopolysaccharides; LPS; nitric oxide; *Opuntia*; peroxisomes; *Salmonella minnesota*

## 1. Introduction

Excessive oxidative stress triggered by the generation of reactive oxygen species (ROS) has been linked to aging, neuroinflammation and neurodegenerative diseases such as Alzheimer disease, multiple sclerosis and peroxisomal leukodystrophies [1]. Microglia plays a central role in the neuroinflammation and in the physiopathogenesis of these disorders by producing proinflammatory molecules, such as tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), interleukin-1 and 6, and nitric oxide (NO) [2–4]. Overproduction of ROS by activated microglia may affect healthy neurons thereby triggering neurodegeneration [5]. It has been reported that conditioned media induced microglia-damaged neurons [6] and that lipopolysaccharides (LPS)-activated microglia induced death of developing

oligodendrocytes [7]. Furthermore, LPS activates microglia in the brain of animal models for sepsis [8]. Generation of ROS by LPS-activated microglia plays a key role in the triggered neurotoxicity [9], which can be largely reduced by neutralizing the extracellular hydrogen peroxide and superoxide by catalase and superoxide dismutase treatment respectively [10,11]. Such results underlined the antioxidant role of peroxisomal proteins, particularly catalase.

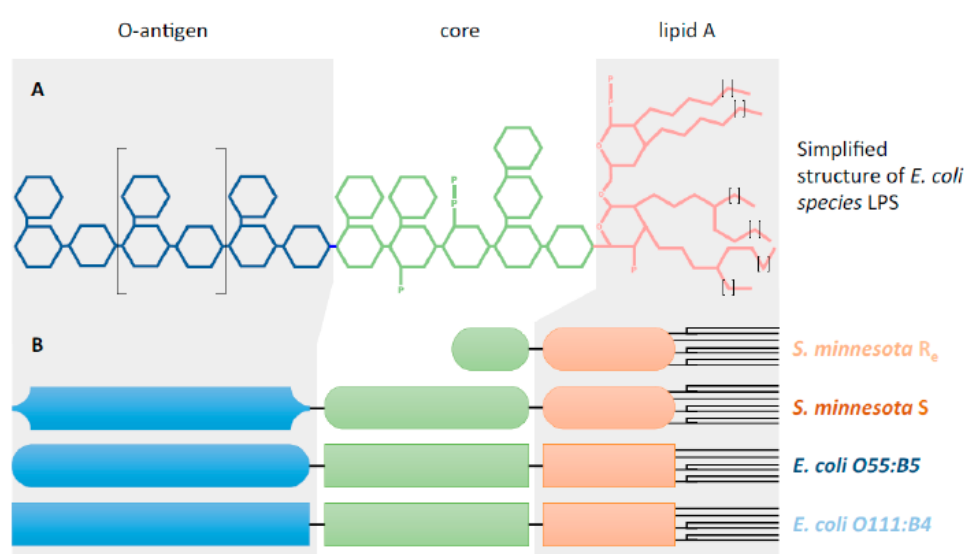
Interestingly, peroxisomes are increasingly recognized as potential regulators of oxidative stress-related signaling pathways [12]. Hence, many peroxisomal enzymes catalyze redox reactions with the generation of hydrogen peroxide as a by-product. Excessive generation of ROS is known to disturb peroxisomal functions [13]. Peroxisome defect is associated with rare inborn errors of peroxisomal metabolism and peroxisomal leukodystrophies are part of neurodegenerative diseases with a progressive demyelination [1,14,15]. The origin of several of these leukodystrophies is linked to the absence of functional peroxisomal  $\beta$ -oxidation of very long chain fatty acids (VLCFA) due to the absence of one functional peroxisomal protein involved in the peroxisome biogenesis (i.e., Zellweger syndrome), in the transport or in the metabolism of VLCFA in the peroxisome (i.e.,  $\alpha$ -adrenoleukodystrophy and acyl-CoA oxidase 1 (ACOX1) deficiency) [1,14,15]. The absence of functional peroxisome caused progressive demyelination and recent data point out oxidative stress as the first hit in the development of neurodegeneration and demyelination [16].

Numerous data are supporting the beneficial role of dietary antioxidant and anti-inflammatory phytochemicals to reduce the deleterious effect of ROS and associated inflammatory processes related to neurodegenerative diseases [17]. *Opuntia ficus-indica*, commonly referred to as prickly pear or nopal cactus, is used in the sub-Saharan traditional medicine pharmacopeia and isolated compounds from its different aerial parts (cladodes, flowers and fruits) revealed antioxidant, anticancer, neuroprotective, hepatoprotective, and antiproliferative properties [17]. The cactus cladodes contain vitamins, antioxidants and various flavonoids, particularly quercetin 3-methyl ether, a highly efficient radical scavenger [18,19]. This supports the hypothesis that *Opuntia ficus indica* derived extracts might alleviate neuronal damages resulting or not from microglial activation.

Previous reports related to the effect of LPS on peroxisome functions revealed that these endotoxins altered peroxisomal membrane composition, diminished the yield of peroxisome fraction in rat liver and enhanced peroxisomal proteins expression [20,21]. We have recently shown down-regulation of genes involved in hepatic peroxisomal fatty acid oxidation (FAOx) in mice exposed to LPS [22]. LPS strongly decreased the activity of ACOX1 and the oxidation of VLCFAs in rat C6 glial cells [23]. In ACOX1-deficient fibroblasts, LPS treatment induced the peroxisomes proliferation through the activation of PPAR $\alpha$  and PGC-1 $\alpha$  [24]. Intriguingly, data compilation regarding the nature of LPS used in the activation of microglial BV-2 cells revealed a great structural diversity from the published literature, whenever LPS serotype is clearly indicated in the related papers [4] (supplementary references). Recently, a systematic review of the in vivo experiments evidenced the disparity in timing and intensity of the LPS-dependent microglia reaction [25]. Such disparity in the generated data can be explained, in all likelihood, by the structural dissimilarity of LPS used in these studies for microglia activation. Thus, the misinterpretation of results can be increased by the great variation in the used conditions of cell culture and LPS serotype. LPS is derived from the gram-negative bacteria, in which it is an integral component of the outer leaflet of the outer membrane [26]. Figure 1A presents simplified structures of enterobacteria LPS. Indeed, LPS consist of three parts: (i) The lipid A, composed of two  $\beta$ 1-6-linked *N*-acetylglucosamines (GlcNAc) substituted with six fatty acids (with chain length ranging from C12 to C16, buried in the bacterial outer membrane) as ether amino or hydroxyl linkage and with phosphate esters. Lipid A structure varies between bacterial strains in terms of fatty acids chain number, composition, phosphorylation and amination; (ii) the core, a polysaccharide moiety (composed of 3-deoxy-D-mannooctulosonic acid, heptose, glucose, galactose and GlcNAc with possible phosphorylation and amination), linked to the lipid A; (iii) and the O-antigen, composed of repetitive units of polysaccharides, defines the serotype of bacterial strains and can be composed of glucose, galactose, rhamnose, mannose or abequose [26].



In the present work, we investigated the antioxidant and anti-inflammatory effects of *Opuntia ficus-indica* cactus cladode extracts in LPS-activated microglia BV-2 cells. Four different LPS serotypes with different lengths and structures (Figure 1B) were used to activate BV-2 cells [26–28]: two *E. coli* LPS differ only in the O-antigen chemical composition (Figure 1B); and two LPS from *Salmonella minnesota* strains (*S. minnesota*), one corresponds to the long form issued from the smooth strain (S) and the second one results from defects in LPS biosynthesis leading to truncated “rough” LPS chemotype, with the absence of O-antigen and a shortened core (Re form) [28]. The antioxidant activity of the different cladode extracts was evaluated through the measurement of catalase and ACOX1 activities, aiming to specify the preventive effect of cactus extracts on peroxisomal dysfunction during LPS-dependent microglia activation, while the anti-inflammatory activity was tested with NO production by BV-2 cells.



**Figure 1.** Structure of lipopolysaccharides. (A) Simplified structure of *E. coli* species LPS. LPS consist of three parts: (i) Lipid A, composed of two  $\beta$ 1-6-linked *N*-acetylglucosamines (GlcNAc) substituted with six fatty acids (with chain length ranging from C12 to C16, buried in the bacterial outer membrane, marked with small brackets) as ether amino or hydroxyl linkage and with phosphate esters (“P”). Lipid A structure varies between bacterial strains in terms of fatty acids chain number, composition, phosphorylation and amination (not shown); (ii) the core, a polysaccharide moiety (composed of 3-deoxy-D-mannooctulosonic acid, heptose, glucose, galactose and GlcNAc with possible phosphorylation and amination), is linked to the lipid A; (iii) the O-antigen, composed of repetitive units of polysaccharides, defines the serotype of bacterial strains and can be composed of glucose, galactose, rhamnose, mannose or abequose. (B) Schematic structures of LPS used in this study. Selected LPS show different lengths or composition. Two LPS from *Salmonella minnesota* strains (*S. minnesota*) were used, one corresponds to the long form issued from the smooth strain (S); and the second one results from defects in LPS biosynthesis leading to truncated “rough” LPS chemotype, with the absence of O-antigen and a shortened core (Re form) (Huang et al., 2012). *E. coli* LPS differ in the O-antigen composition.

## 2. Materials and Methods

### 2.1. Chemicals

LPS were obtained from Sigma-Aldrich, St. Quentin Fallavier, France (*Escherichia coli* O55:B5, L2880; *E. coli* O111:B4, L2630) and from Enzo Life Sciences, Villeurbanne, France (*Salmonella minnesota* S-Form, ALX-581-020; *S. minnesota* R595 (Re), ALX-581-008).

## 2.2. BV-2 Microglia Cell Culture

Murine microglial BV-2 cell lines (BV-2) were grown in a 5% CO<sub>2</sub> incubator at 37 °C in Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM) supplemented with 10% (*v/v*) heat inactivated fetal bovine serum (FBS) and 1% antibiotics (penicillin, streptomycin); culture medium was changed every 2 days. BV-2 cells were seeded on 6-well microplates at  $5 \times 10^5$  cells/well for viability assay, 96-well microplates at  $2 \times 10^4$  cells/well for the NO assay, 24-well microplates at  $1 \times 10^5$  cells/well for catalase activity and Western blotting analysis. Cells were treated with 10, 30 or 100 µg/mL of cactus cladodes extracts and LPS at 1 µg/mL dissolved in fresh DMEM with 5% of FBS.

## 2.3. Cactus Extracts Preparation

Four cactus cladode extracts were prepared with solvents of increasing polarity using hexane and chloroform as non-polar solvents and ethylacetate and methanol as polar solvents [29,30]. Forty milligrams of cladodes from *Opuntia ficus-indica* plants were dried at 50 °C for 48 h, grinded, macerated with methanol 80% for 48 h and filtered. Filtrate was then successively extracted with hexane, chloroform, ethylacetate and finally methanol. The four extracts were evaporated and residues were dissolved in DMSO 50% and kept at 4 °C in darkness up to use.

## 2.4. MTT Assay

The cell proliferation and/or mitochondrial activity were measured using MTT (3-(4,5-dimethyltrazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) assay [31]. Cells, plated in 6-wells plates, were treated for 24 h with the four different serotypes of LPS (1 or 2 µg/mL) or the four cactus extracts (100 µg/mL). Cells were incubated for 2 h with MTT dye followed by the absorbance (Abs) measurement at the 570 nm with a microplate reader.

## 2.5. Staining with Crystal Violet Assay

Quantification of the adherent cell was estimated by staining with crystal violet [32]. Cells were seeded in 6-wells plates and treated for 24 h with the four different serotypes of LPS (1 or 2 µg/mL) or the four cactus extracts (100 µg/mL). At the end of treatment, cells were washed with phosphate buffer saline, stained with crystal violet, rinsed with water and after methanol addition, the optical density (OD) was measured at the 570 nm with a microplate reader.

## 2.6. Nitrite Assay

The production of NO was determined by measuring nitrite (NO<sub>2</sub><sup>-</sup>) accumulation in the cell culture media. BV-2 cells were pretreated with the four different cactus cladodes extracts at 10, 30 or 100 µg/mL for 4 h and then stimulated with 1 µg/mL LPS for 24 h. The accumulated nitrite in the culture supernatant, used as an indicator of NO production, was measured using the Greiss reaction method [33]. Each supernatant was mixed with an equal volume of the Greiss reagent (Sigma-Aldrich) and the absorbance of the mixture was measured at the 540 nm with a microplate reader.

## 2.7. Preparation of BV-2 Cell Lysate

After treatment of BV-2 microglia cells with the four different cactus cladodes extracts and with LPS for 24 h, cells were washed with PBS buffer and  $1 \times 10^5$  cells were lysed in 50 µL of Radioimmunoprecipitation assay (RIPA) buffer: 50 mM Tris-HCl, pH 7.4, 1% NP-40, 0.5% Na-deoxycholate, 0.1% sodium dodecylsulfate, 150 mM NaCl, 2 mM Ethylenediamine tetraacetic acid (EDTA), 50 mM NaF. Cells were placed in ice for 30 min and the lysate was cleared by centrifugation at  $20,000 \times g$  for 20 min. Protein content was assessed by a bicinchoninic acid assay [34]. The supernatant was stored at -80 °C until further use.

## 2.8. Enzymatic Activity Measurement

For catalase activity measurement, 10  $\mu\text{L}$  of BV-2 cell lysate was added to 190  $\mu\text{L}$  of Tris HCl buffer (pH = 7.4) containing 20 mM  $\text{H}_2\text{O}_2$  and the decrease of the absorbance was monitored at 240 nm for 2 min [35]. The change in absorbance with time was proportional to the breakdown of  $\text{H}_2\text{O}_2$ . The catalase activity was expressed as units/mg of protein. ACOX1 activity measurement was performed as described by Oaxaca-Castillo D. et al. [36].

## 2.9. Western Blotting Analysis

The BV-2 microglia were pretreated with the four different cactus cladodes extracts at 10, 30 or 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  for 4 h and then stimulated with LPS at 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  for 24 h; the cells were lysed in lysis buffer. For Western blotting analysis, 30  $\mu\text{g}$  of protein was separated by 15% SDS-page and transferred onto polyvinylidene difluoride (PVDF) membranes [37]. Membranes were blocked using blocking buffer Tris-buffered Saline buffer containing 5% milk, 0.1% Tween 20 (TBST) and washed three times with TBST 5 min each. Membranes were incubated with rabbit anti-catalase antibody (1:1500) in 5% milk in TBST at room temperature for 3 h, washed three times with TBST, incubated with a goat anti-rabbit secondary antibody coupled to horseradish peroxidase for 1 h and developed using enhanced chemiluminescence (ECL) Western blotting detection (Santa Cruz Biotechnology, Inc., Heidelberg, Germany).

## 2.10. Statistical Analysis

Statistical analyses to compare two experimental groups were performed with an unpaired, two-tailed, Student-t test (Excel software) for calculating the probability values; and data were considered statistically different at a  $p$ -value of 0.05 or less.

## 3. Results

### 3.1. Effect of Different LPS on Mitochondrial Status and Viability of Microglial BV-2 Cells

A MTT test was performed to estimate the effect of different LPS on mitochondrial function and BV-2 cells viability. The amount of formazan produced is proportional to the number of metabolically active viable cells and involves the transfer of electrons to MTT by reducing molecules, such as NADH [38]. Both LPS, at 1 or 2  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , from *E. coli*, showed after 24 h an increase in the mitochondrial dehydrogenases activity. Only the smallest LPS from rough *S. minnesota Re*, with less oligosaccharides units on the core region and missing the O-antigen part, enhanced the activity of mitochondrial dehydrogenases (Figure 2A) after 24 h at the used concentrations of 1 or 2  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . A MTT assay also reflects cell viability and proliferation under different LPS treatments. Regarding the obtained results, we can conclude that LPS from both *E. coli* and *S. minnesota Re* were more prone to increase by 10% to 20% BV-2 cells viability and proliferation (Figure 2A). BV-2 microglial cells are reputed semi-adherent cells in DMEM medium. As shown by a crystal violet assay (Figure 2B), treatment with structurally different LPS had no significant effect on BV1 cell adhesion. This observation seems to be coherent with the obtained results for the MTT test.



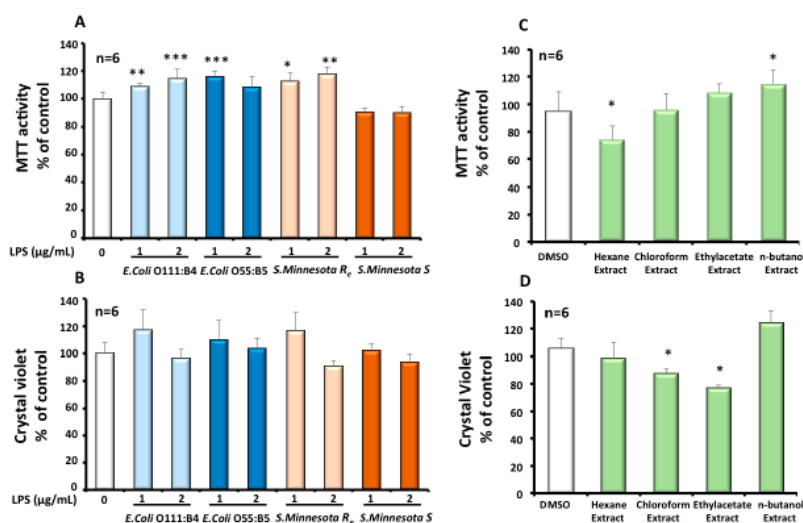


Figure 2. Effect of LPS or cactus extracts on viability (MTT assay; A and C respectively) and on cell growth (crystal violet assay; B and D respectively) of BV-2 microglial cells. Cells were treated for 24 h with the four different serotypes of LPS (1 or 2 µg/mL) or the four cactus extracts (100 µg/mL). The results were the mean ± SD of the three independent experiments. Values were normalized to the control and are given as percent of the control. The significance is shown with the Student-t test:  $p < 0.05$  for \*;  $p < 0.01$  for \*\*;  $p < 0.001$  for \*\*\*.

### 3.2. Effects of Cactus Cladode Extracts on Mitochondrial Status and Viability of Microglial BV-2 Cells

A MTT test was performed to estimate the effect of the four cactus extracts on mitochondrial function and BV-2 cell viability. As shown in Figure 2C, the hexane extract and n-butanol extract have an opposite moderate effect on BV-2 cell viability. The former decreased the viability by −30%, while the latest increased BV-2 viability by +18%. On the other hand, using the crystal violet test, we showed that only chloroform and ethyl-acetate extracts have a negative effect on growth and adherence of BV-2 cells (Figure 2D). These negative effects were estimated to be −15% for the chloroform extract and to be −20% for and the ethyl-acetate extract respectively.

### 3.3. Effects of Different LPS on Peroxisomal Functions in Microglial BV-2 Cells

Peroxisome organelle is characterized by the presence of more than a dozen oxidase-producing  $H_2O_2$  as a by-product and also catalase as an  $H_2O_2$ -degrading enzyme. Hence, we measured in BV-2 cells, after LPS treatment, the activity of ACOX1, the rate-limiting enzyme of peroxisomal β-oxidation, and the activity of catalase, the peroxisomal antioxidant enzyme. Intriguingly, results showed that different LPS impact ACOX1 activity differentially and catalase activity. Thus, both *E. coli* serotypes, O111 and O55 respectively, showed a dose-dependent decrease of ACOX1 activity in BV-2 cells after 24 h LPS treatment. ACOX1 activity was decreased by −25% to −35% with O111 *E. coli* serotype and −18% to −35% for O55 *E. coli* serotype respectively. *S. minnesota* serotypes generally had a slight (+13%) or no effect on ACOX1 activity (Figure 3A). By contrast, catalase activity was clearly decreased with both *S. minnesota* serotypes treatments. In the presence (S) of O-antigen, the catalase activity was decreased by −25% to −40%, relative to the control, while the absence of the O-antigen (Re) revealed a 43% decrease of catalase activity. However, *E. coli* serotypes treatment exhibited a significant but a relatively slight decrease estimated to be −12% to −20% for O111 *E. coli* serotype and −20% to −25% for O55 *E. coli* serotype (Figure 3B). Thus, regarding the effect different LPS on peroxisome functions, the effect of LPS on peroxisomal antioxidant function were inversely proportional to the effect on the activity of peroxisomal β-oxidation in BV-2 microglial cells. The protein levels of ACOX1 and catalase were evaluated by Western blotting. As shown in Figure 4, except *E. coli* O111 serotype,

which increases the catalase level by 1.4 to 1.7 fold, all the LPS serotypes decreased the level of catalase (0.3 to 0.6 fold) in BV-2 cells. ACOX1 level was only slightly decreased by different LPS, except *E. coli* O111 serotypes for which we can see an increased expression of ACOX1 (2 to 2.6 fold) as for catalase (Figure 4).

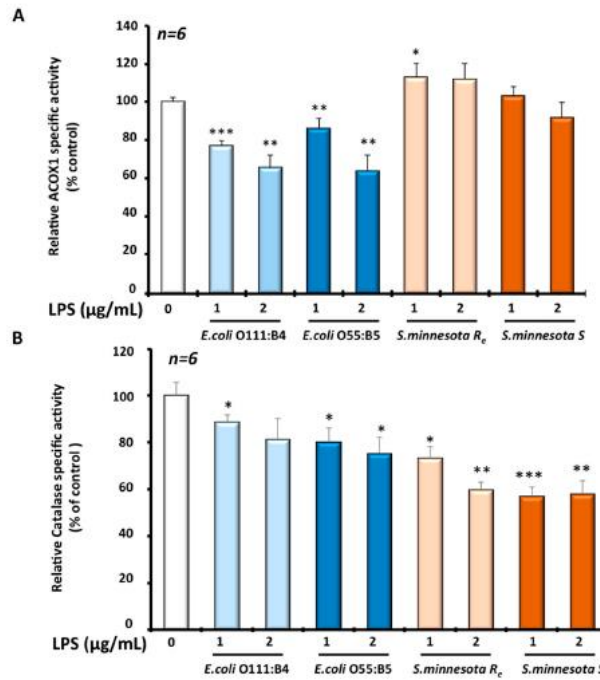


Figure 3. Enzymatic specific activities of (A) ACOX1 and (B) catalase were measured in BV-2 microglial cells treated for 24 h with the four different serotypes of LPS (1 or 2 µg/mL). The results were the mean ± SD of the three independent experiments. Values were normalized to the control and are given as percent of the control. The statistical significance was calculated with the Student-t test:  $p < 0.05$  for \*;  $p < 0.01$  for \*\*;  $p < 0.001$  for \*\*\*.

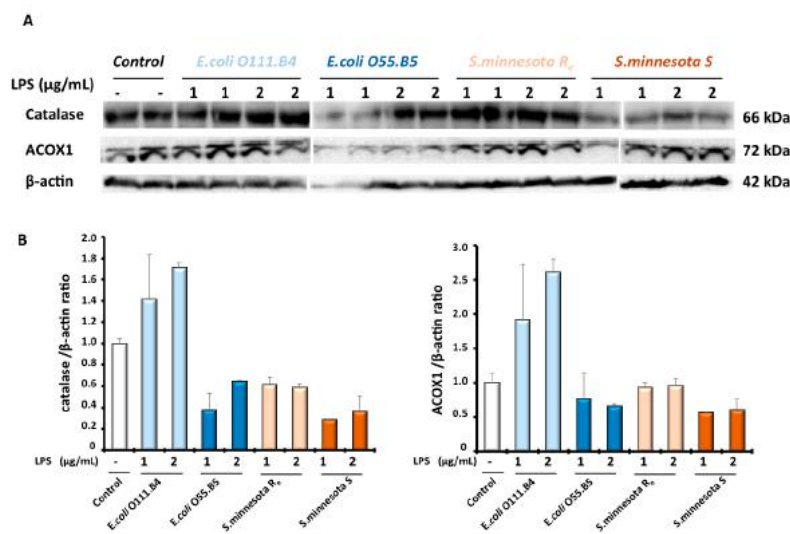


Figure 4. Expression levels of ACOX1 and catalase proteins were evaluated by Western blotting analysis in BV-2 cell extracts after LPS treatment with the four different serotypes (1–2 µg/mL) for 24 h (A). Expression of protein was quantified by densitometry analysis and normalized to the β-actin; (B) and values represent the fold induction relative to the control.



### 3.4. Effects of Cactus Cladode Extracts on Catalase Expression in Microglial BV-2 Cells

Intriguingly, extracts obtained with hexane, chloroform or ethyl-acetate decreased significantly the catalase activity between  $-20\%$  and  $-55\%$  in BV-2 cells after 24 h treatment, except for the hexane extract at the concentration of  $100\ \mu\text{g}/\text{mL}$ , showing an increase of  $30\%$  (Figure 5A). In the presence of LPS (from *Salmonella minnesota S* serotype) (Figure 5B), low dose, at  $10\ \mu\text{g}/\text{mL}$ , of the hexane extract, we observed a greater decrease ( $-45\%$ ) in catalase activity when compared to the LPS treatment alone. However, higher concentrations of the hexane extract or different doses of the other *Opuntia* extracts (chloroform, ethyl-acetate or *n*-butanol) reestablished catalase activity at the same or higher level than the control (Figure 5B). Interestingly, treatment with different extracts had no significant effect on catalase at the protein level (data not shown). This indicates that changes in catalase activity were the result of the modulation of the enzymatic activity.

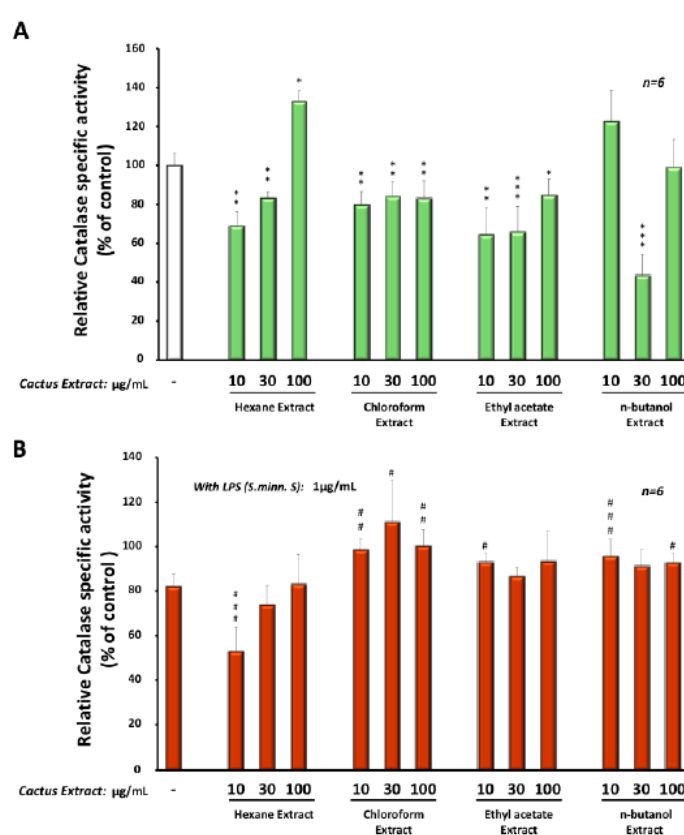


Figure 5. Enzymatic specific activity of catalase was measured in BV-2 microglial cells treated for 24 h with the four different cactus extracts (10, 30 or  $100\ \mu\text{g}/\text{mL}$ ) without (A) or in the presence of *Salmonella minnesota S* LPS at  $1\ \mu\text{g}/\text{mL}$  (B). The results were the mean  $\pm$  SD of the three independent experiments. Values were normalized to the control and are given as percent of the control. The statistical significance was calculated with the Student-t test:  $p < 0.05$  for \* or #;  $p < 0.01$  for \*\* or ##;  $p < 0.001$  for \*\*\* or ###.

### 3.5. Anti-Inflammatory Effect of Cactus Cladode Extracts on NO Production in Microglial BV-2 Cells

To evaluate the anti-inflammatory protective effect of these cactus extracts, we treated microglial BV-2 cells with different extracts at three concentrations: 10, 30 or  $100\ \mu\text{g}/\text{mL}$  (using DMSO as vehicle) in the presence or absence of LPS from *Salmonella minnesota S* serotype. This serotype was chosen because of its significant effect on catalase activity. After 24 h of treatment, different cactus extracts induced a very slight production (up to  $1\ \mu\text{M}$ ) of NO when compared to the control (Figure 6A). All

extracts reduced the effect of LPS (24 h treatment at 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) on NO production in BV-2 cells, from 4.7  $\mu\text{M}$  under LPS treatment alone to less than 2  $\mu\text{M}$  in the presence of the cactus extract. However, hexane and chloroform extracts were the most efficient in reduction of NO production induced by LPS, with less than 1  $\mu\text{M}$  of NO in a dose-dependent manner (Figure 6B).

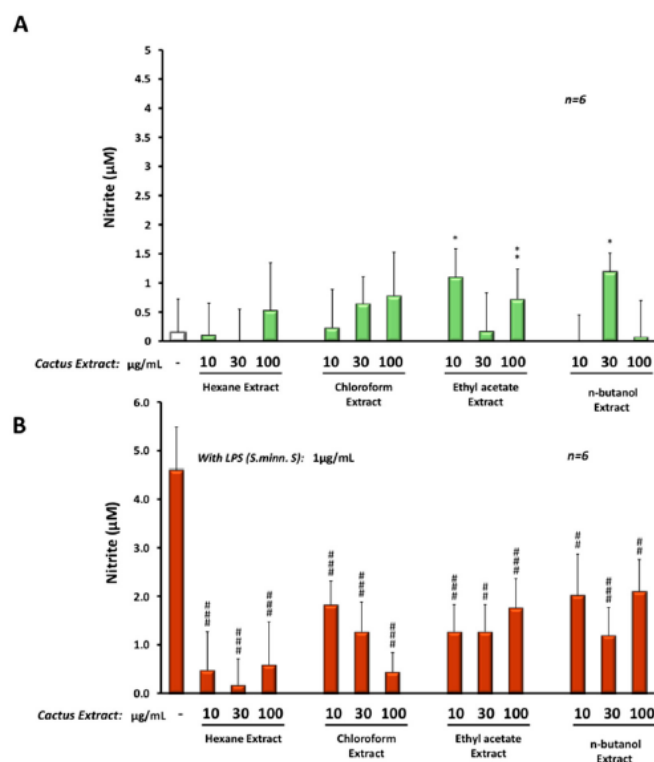


Figure 6. NO production (in  $\mu\text{M}$ ) by BV-2 cells after 24 h treatment with the four different cactus extracts (10, 30 or 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) without (A) or in the presence of *Salmonella minnesota S* LPS at 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (B) evaluated by the Greiss test (NO production was determined by measuring nitrite ( $\text{NO}_2^-$ ) accumulation in the cell culture media). The significance is shown with the Student-t test:  $p < 0.05$  for \*;  $p < 0.01$  for \*\* or ###;  $p < 0.001$  for ####.

#### 4. Discussion

In this study, the antioxidant and anti-inflammatory properties of *Opuntia ficus-indica* cactus cladode extracts were evaluated in microglia BV-2 cells. Different LPS were used to achieve BV-2 cell activation because of the structural heterogeneity of the used LPS serotypes in published studies, whenever it was specified. Therefore, we decided to compare four different serotypes of LPS, which were structurally and biologically well defined [26–28] and presenting a specific structural feature in one of their three LPS parts (i.e., O-antigen, core and Lipid A). The *E. coli* and *S. minnesota S* LPS serotypes differ only in the O-antigen part, while *S. Minnesota Re* have no O-antigen and show shorter oligosaccharidic chain length in the core part (Figure 1); the lipid A part is hexacetylated in *E. coli* serotypes, while *S. minnesota* serotypes have an heptacetylated lipid A. We showed that three serotypes revealed only a slight increase (10% to 15%) of BV-2 cells viability, except for *S. minnesota S* serotype. Previous studies have shown a slight or no change in the viability of BV-2 cells after treatment with *E. coli O111:B4* chemotype [39]. Compared to the BV-2 cell line, primary microglia cells (isolated from rat or mouse newborn brains) are more sensitive to this chemotype and show a significant reduction of their viability as earlier as 2 h following LPS treatment [40,41]. For the *E. coli O55:B5* chemotype, reported results have shown no significant effect on BV-2 cell viability, but a decrease of primary microglia viability [42,43]. To our knowledge, the effect of Rough chemotypes of *S. minnesota* on BV-2

cells has not been described yet. However, in our study, only the *Re S. minnesota* chemotype induced a slight increase in BV-2 cell viability.

Here, we showed, for the first time, a differential effect of LPS between two peroxisomal activities (i.e., ACOX1 and catalase activities) in microglia BV-2 cells. Indeed, both *E. coli* serotypes 0111:B4 and 055:B5 reduced ACOX1 activity (−20% to −40%) but only slightly catalase activity (−10% to −20%). However, BV-2 treatment with *S. minnesota* serotypes revealed a unique effect only on catalase activity (−40%) and no effect on ACOX1 activity. It should be noted that lipid A (from *E. coli*) treatment had no effect on ACOX1 activity (data not shown) indicating that the observed effect is not linked to the lipid A moiety itself. In addition, the expression levels of both ACOX1 and catalase proteins were reduced by all LPS except for *E. coli* 055:B5 serotypes. An earlier report from Khan et al. has shown that the *E. coli* LPS inhibits the oxidation of VLCFA, leading to their accumulation in C6 glial cells [44]. Later, the same group showed that the *E. coli* 055:B5 chemotype reduced drastically the  $\beta$ -oxidation of VLCFA as well as the expression of ACOX1 and catalase transcripts in the fetal rat brain after maternal LPS exposure [45]. Accordingly, endotoxin treatment deeply impacts liver peroxisomes in a specific manner as other cellular organelles are less affected or not affected. Indeed, Khan M. et al. showed that LPS from *Salmonella typhimurium* (structurally resembling the used *E. coli* serotype in this study) augmented the ratio of cholesterol/phospholipids, the plasmalogen levels and affected the fatty acid composition of the peroxisomal fraction [46]. The mechanism underlying this specific remodeling of peroxisomal lipids is still unknown. Our result showing the LPS-associated reduction of the peroxisomal ACOX1 activity may explain, at least partially, the perturbation of hepatic peroxisome lipid structure and metabolism under LPS treatment, which seems to be completely mediated by Kupffer cells, as liver resident macrophages [46]. Thus, the suppression of ACOX1 activity in microglial cells and its consequence on the peroxisomal capacity in the  $\beta$ -oxidation of VLCFA may have a deleterious effect on brain functions and must be associated to neuroinflammation and neurodegeneration in peroxisomal leukodystrophies, including ACOX1 deficiency [47]. This means that exposure of patients with peroxisomal disorders to bacterial infection may worsen their metabolic dysregulation.

In an attempt to explore the therapeutic potentialities of cactus extracts, we showed here that *Opuntia* cladode extracts prevent LPS-associated catalase activity decrease. This modulation of catalase activity was at the level of the enzymatic activity. It has been shown that a 90-kDa glycoprotein isolated from *Opuntia ficus indica* augmented catalase activity in mice liver [48]. Interestingly, different cactus extracts used in this study revealed a strong preventive effect on the production of NO by LPS in BV-2 cells. Our results underline the capacity of *Opuntia* cladode extracts to suppress the inflammatory response induced by LPS in microglial cells, as reported for other cactus tissue extracts [49]. In addition, in cultured mouse cortical cells, the *Opuntia* fruit extract significantly decreased delayed neurotoxicity induced by *N*-methyl-D-aspartate-, kainate-, and oxygen–glucose deprivation [50]. Thus, *Opuntia ficus indica* extracts might alleviate neuronal damages resulting from microglial activation.

Collectively, in this study, we showed that cladode extracts from *Opuntia ficus indica* revealed an antioxidant capacity in the modulation of peroxisomal catalase activity and clear anti-inflammatory properties. In addition, the regulation of peroxisomal functions, regarding LPS exposure, is clearly dependent on LPS chemotype; and LPS shape promotes differential responses between the peroxisomal fatty acid  $\beta$ -oxidation and the peroxisomal antioxidant function.

**Acknowledgments:** We thank Dr. Ahmed El Shobaky for his valuable discussions and Marie Granjon for her technical assistance. This work was supported by the Action Intégrée of the Comité Mixte Inter-universitaire Franco-Marocain (CMIFM, MA/14/310) from the PHC Volubilis/Toubkal program, the Ministère de l'enseignement Supérieur and the Centre National Pour la Recherche Scientifique et Technique (CNRST) Morocco, the Institut Français D'Egypte au Caire, the Ministère des Affaires Etrangères, the Conseil Régional de Bourgogne and the Ministère de l'enseignement et de la Recherche, the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM, Centre de Recherches U866), and the French Government Grant managed by the French National Research Agency under the program "Investissements d'Avenir" ANR-11-LABX-0021.



**Author Contributions:** P.A.; B.N. and M.C.-M. conceived and designed the experiments; F.-E.S. and S.M. performed the experiments; F.-E.S.; P.A. and M.C.-M. contributed to the acquisition and analysis of data; N.L. and M.S.E. contributed to the interpretation of data and the manuscript reading and discussion; G.L. and S.M. contributed reagents/materials/analysis tools; P.A.; B.N. and M.C.-M. Wrote the paper.

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest. The founding sponsors had no role in the design of the study; in the collection, analyses, or interpretation of data; in the writing of the manuscript, and in the decision to publish the results.

## References

1. Trompier, D.; Vejux, A.; Zarrouk, A.; Gondcaille, C.; Geillon, F.; Nury, T.; Savary, S.; Lizard, G. Brain peroxisomes. *Biochimie* **2014**, *98*, 102–110. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. Pawate, S.; Shen, Q.; Fan, F.; Bhat, N.R. Redox regulation of glial inflammatory response to lipopolysaccharide and interferon-gamma. *J. Neurosci. Res.* **2004**, *77*, 540–551. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Perry, V.H.; Teeling, J. Microglia and macrophages of the central nervous system: The contribution of microglia priming and systemic inflammation to chronic neurodegeneration. *Semin. Immunopathol.* **2013**, *35*, 601–612. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Cunningham, C. Microglia and neurodegeneration: The role of systemic inflammation. *Glia* **2013**, *61*, 71–90. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Von Bernhardi, R.; Eugenin-von Bernhardi, L.; Eugenin, J. Microglial cell dysregulation in brain aging and neurodegeneration. *Front. Aging Neurosci.* **2015**, *7*, 124. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
6. Block, M.L.; Hong, J.S. Chronic microglial activation and progressive dopaminergic neurotoxicity. *Biochem. Soc. Trans.* **2007**, *35*, 1127–1132. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
7. Li, J.; Baud, O.; Vartanian, T.; Volpe, J.J.; Rosenberg, P.A. Peroxynitrite generated by inducible nitric oxide synthase and NADPH oxidase mediates microglial toxicity to oligodendrocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2005**, *102*, 9936–9941. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
8. Konsman, J.P.; Parnet, P.; Dantzer, R. Cytokine-induced sickness behaviour: Mechanisms and implications. *Trends Neurosci.* **2002**, *25*, 154–159. [[CrossRef](#)]
9. Liu, B.; Du, L.; Hong, J.S. Naloxone protects rat dopaminergic neurons against inflammatory damage through inhibition of microglia activation and superoxide generation. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2000**, *293*, 607–617. [[PubMed](#)]
10. Wang, T.; Liu, B.; Qin, L.; Wilson, B.; Hong, J.S. Protective effect of the SOD/catalase mimetic MnTMPyP on inflammation-mediated dopaminergic neurodegeneration in mesencephalic neuronal-glial cultures. *J. Neuroimmunol.* **2004**, *147*, 68–72. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
11. Nell, H.J.; Au, J.L.; Giordano, C.R.; Terlecky, S.R.; Walton, P.A.; Whitehead, S.N.; Cechetto, D.F. The targeted antioxidant, catalase-SKL, reduces beta-amyloid toxicity in the rat brain. *Brain Pathol.* **2016**, *27*, 86–94. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Nordgren, M.; Fransen, M. Peroxisomal metabolism and oxidative stress. *Biochimie* **2014**, *98*, 56–62. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Schrader, M.; Fahimi, H.D. Peroxisomes and oxidative stress. *Biochim. Biophys. Acta* **2006**, *1763*, 1755–1766. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Wanders, R.J. Metabolic functions of peroxisomes in health and disease. *Biochimie* **2014**, *98*, 36–44. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Wanders, R.J.; Waterham, H.R. Peroxisomal disorders: The single peroxisomal enzyme deficiencies. *Biochim. Biophys. Acta* **2006**, *1763*, 1707–1720. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. Singh, I.; Pujol, A. Pathomechanisms underlying X-adrenoleukodystrophy: A three-hit hypothesis. *Brain Pathol.* **2010**, *20*, 838–844. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
17. El-Mostafa, K.; El Kharrassi, Y.; Badreddine, A.; Andreoletti, P.; Vamecq, J.; El Kebbjaj, M.S.; Latruffe, N.; Lizard, G.; Nasser, B.; Cherkaoui-Malki, M. Nopal cactus (*Opuntia ficus-indica*) as a source of bioactive compounds for nutrition, health and disease. *Molecules* **2014**, *19*, 14879–14901. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
18. Lee, J.C.; Kim, H.R.; Kim, J.; Jang, Y.S. Antioxidant property of an ethanol extract of the stem of *Opuntia ficus-indica* var. *saboten*. *J. Agric. Food Chem.* **2002**, *50*, 6490–6496. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
19. Stintzing, F.C.; Carle, R. Cactus stems (*Opuntia* spp.): A review on their chemistry, technology, and uses. *Mol. Nutr. Food Res.* **2005**, *49*, 175–194. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

20. Contreras, M.A.; Khan, M.; Smith, B.T.; Cimini, A.M.; Gilg, A.G.; Orak, J.; Singh, I.; Singh, A.K. Endotoxin induces structure-function alterations of rat liver peroxisomes: Kupffer cells released factors as possible modulators. *Hepatology* **2000**, *31*, 446–455. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
21. Dhaunsi, G.S.; Hanevold, C.D.; Singh, I. Impairment of peroxisomal beta-oxidation system by endotoxin treatment. *Mol. Cell. Biochem.* **1994**, *135*, 187–193. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. El Kebbij, R.; Andreoletti, P.; El Hajj, H.I.; El Kharrassi, Y.; Vamecq, J.; Mandard, S.; Saih, F.-E.; Latruffe, N.; El Kebbij, M.S.; Lizard, G.; et al. Argan oil prevents down-regulation induced by endotoxin on liver fatty acid oxidation and gluconeogenesis and on peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator-1 $\alpha$  (PGC-1 $\alpha$ ), peroxisome proliferator-activated receptor  $\alpha$  (PPAR $\alpha$ ) and estrogen related receptor  $\alpha$  (ERR $\alpha$ ). *Biochim. Open* **2015**, *1*, 51–59.
23. Paintlia, M.K.; Paintlia, A.S.; Khan, M.; Singh, I.; Singh, A.K. Modulation of peroxisome proliferator-activated receptor-alpha activity by N-acetyl cysteine attenuates inhibition of oligodendrocyte development in lipopolysaccharide stimulated mixed glial cultures. *J. Neurochem.* **2008**, *105*, 956–970. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. El Kebbij, R.; El Kamouni, S.; El Hajj, H.I.; Andreoletti, P.; Gresti, J.; Latruffe, N.; El Kebbij, M.S.; Vamecq, J.; Lizard, G.; Nasser, B.; et al. Modulation of peroxisomes abundance by argan oil and lipopolysaccharides in acyl-CoA oxidase 1-deficient fibroblasts. *Health* **2013**, *5*, 62–69. [[CrossRef](#)]
25. Hoogland, I.C.; Houbolt, C.; van Westerloo, D.J.; van Gool, W.A.; van de Beek, D. Systemic inflammation and microglial activation: Systematic review of animal experiments. *J. Neuroinflamm.* **2015**, *12*, 114. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Stenutz, R.; Weintraub, A.; Widmalm, G. The structures of *Escherichia coli* O-polysaccharide antigens. *FEMS Microbiol. Rev.* **2006**, *30*, 382–403. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
27. Matsuura, M. Structural Modifications of Bacterial Lipopolysaccharide that Facilitate Gram-Negative Bacteria Evasion of Host Innate Immunity. *Front. Immunol.* **2013**, *4*, 109. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
28. Huang, J.X.; Azad, M.A.; Yuriev, E.; Baker, M.A.; Nation, R.L.; Li, J.; Cooper, M.A.; Velkov, T. Molecular Characterization of Lipopolysaccharide Binding to Human alpha-1-Acid Glycoprotein. *J. Lipids* **2012**, *2012*, 475153. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
29. Sanchez, E.; Garcia, S.; Heredia, N. Extracts of edible and medicinal plants damage membranes of *Vibrio cholerae*. *Appl. Environ. Microbiol.* **2010**, *76*, 6888–6894. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
30. Ennouri, M.; Ammar, I.; Khemakhem, B.; Attia, H. Chemical composition and antibacterial activity of *Opuntia ficus-indica* f. *inermis* (cactus pear) flowers. *J. Med. Food* **2014**, *17*, 908–914. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
31. Denizot, F.; Lang, R. Rapid colorimetric assay for cell growth and survival. Modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. *J. Immunol. Methods* **1986**, *89*, 271–277. [[CrossRef](#)]
32. Badreddine, A.; Karym, E.M.; Zarrouk, A.; Nury, T.; Kharrassi, Y.E.; Nasser, B.; Cherkaoui-Malki, M.; Lizard, G.; Samadi, M. An expeditious synthesis of spinasterol and schottenol, two phytosterols present in argan oil and in cactus pear seed oil, and evaluation of their biological activities on cells of the central nervous system. *Steroids* **2015**, *99*, 119–124. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Green, L.C.; Wagner, D.A.; Glogowski, J.; Skipper, P.L.; Wishnok, J.S.; Tannenbaum, S.R. Analysis of nitrate, nitrite, and [<sup>15</sup>N]nitrate in biological fluids. *Anal. Biochem.* **1982**, *126*, 131–138. [[CrossRef](#)]
34. Smith, P.K.; Krohn, R.I.; Hermanson, G.T.; Mallia, A.K.; Gartner, F.H.; Provenzano, M.D.; Fujimoto, E.K.; Goeke, N.M.; Olson, B.J.; Klenk, D.C. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal. Biochem.* **1985**, *150*, 76–85. [[CrossRef](#)]
35. Cherkaoui-Malki, M.; Bardot, O.; Lhuguenot, J.C.; Latruffe, N. Expression of liver peroxisomal proteins as compared to other organelle marker enzymes in rats treated with hypolipidemic agents. *Biol. Cell* **1990**, *69*, 83–92. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
36. Oaxaca-Castillo, D.; Andreoletti, P.; Vluggens, A.; Yu, S.; van Veldhoven, P.P.; Reddy, J.K.; Cherkaoui-Malki, M. Biochemical characterization of two functional human liver acyl-CoA oxidase isoforms 1a and 1b encoded by a single gene. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2007**, *360*, 314–319. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
37. Vluggens, A.; Andreoletti, P.; Viswakarma, N.; Jia, Y.; Matsumoto, K.; Kulik, W.; Khan, M.; Huang, J.; Guo, D.; Yu, S.; et al. Reversal of mouse Acyl-CoA oxidase 1 (ACOX1) null phenotype by human ACOX1b isoform. *Lab. Invest.* **2010**, *90*, 696–708. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

38. Riss, T.L.; Moravec, R.A.; Niles, A.L.; Duellman, S.; Benink, H.A.; Worzella, T.J.; Minor, L. Cell viability assays. In *Assay Guidance Manual*; Sittampalam, G.S., Coussens, N.P., Nelson, H., Arkin, M., Auld, D., Austin, C., Bejcek, B., Glicksman, M., Inglese, J., Iversen, P.W., et al., Eds.; Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences: Bethesda, MD, USA, 2004.
39. Min, S.; More, S.V.; Park, J.Y.; Jeon, S.B.; Park, S.Y.; Park, E.J.; Yoon, S.H.; Choi, D.K. EOP, a newly synthesized ethyl pyruvate derivative, attenuates the production of inflammatory mediators via p38, ERK and NF- $\kappa$ B pathways in lipopolysaccharide-activated BV-2 microglial cells. *Molecules* **2014**, *19*, 19361–19375. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
40. Liu, B.; Wang, K.; Gao, H.M.; Mandavilli, B.; Wang, J.Y.; Hong, J.S. Molecular consequences of activated microglia in the brain: Overactivation induces apoptosis. *J. Neurochem.* **2001**, *77*, 182–189. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
41. Jung, D.Y.; Lee, H.; Jung, B.Y.; Ock, J.; Lee, M.S.; Lee, W.H.; Suk, K. TLR4, but not TLR2, signals autoregulatory apoptosis of cultured microglia: A critical role of IFN- $\beta$  as a decision maker. *J. Immunol.* **2005**, *174*, 6467–6476. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
42. Song, F.; Zeng, K.; Liao, L.; Yu, Q.; Tu, P.; Wang, X. Schizandrin A Inhibits Microglia-Mediated Neuroninflammation through Inhibiting TRAF6-NF- $\kappa$ B and Jak2-Stat3 Signaling Pathways. *PLoS ONE* **2016**, *11*, e0149991. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
43. Wang, Y.; Gao, H.; Zhang, W.; Zhang, W.; Fang, L. Thymoquinone inhibits lipopolysaccharide-induced inflammatory mediators in BV2 microglial cells. *Int. Immunopharmacol.* **2015**, *26*, 169–173. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. Khan, M.; Pahan, K.; Singh, A.K.; Singh, I. Cytokine-induced accumulation of very long-chain fatty acids in rat C6 glial cells: Implication for X-adrenoleukodystrophy. *J. Neurochem.* **1998**, *71*, 78–87. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
45. Paintlia, M.K.; Paintlia, A.S.; Contreras, M.A.; Singh, I.; Singh, A.K. Lipopolysaccharide-induced peroxisomal dysfunction exacerbates cerebral white matter injury: Attenuation by N-acetyl cysteine. *Exp. Neurol.* **2008**, *210*, 560–576. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
46. Khan, M.; Contreras, M.; Singh, I. Endotoxin-induced alterations of lipid and fatty acid compositions in rat liver peroxisomes. *J. Endotoxin Res.* **2000**, *6*, 41–50. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
47. El Hajj, H.I.; Vluggens, A.; Andreoletti, P.; Ragot, K.; Mandard, S.; Kersten, S.; Waterham, H.R.; Lizard, G.; Wanders, R.J.; Reddy, J.K.; et al. The inflammatory response in acyl-CoA oxidase 1 deficiency (pseudoneonatal adrenoleukodystrophy). *Endocrinology* **2012**, *153*, 2568–2575. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
48. Oh, P.S.; Lim, K.T. Glycoprotein (90 kDa) isolated from *Opuntia ficus-indica* var. *saboten* MAKINO lowers plasma lipid level through scavenging of intracellular radicals in Triton WR-1339-induced mice. *Biol. Pharm. Bull.* **2006**, *29*, 1391–1396. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
49. Lee, M.H.; Kim, J.Y.; Yoon, J.H.; Lim, H.J.; Kim, T.H.; Jin, C.; Kwak, W.J.; Han, C.K.; Ryu, J.H. Inhibition of nitric oxide synthase expression in activated microglia and peroxynitrite scavenging activity by *Opuntia ficus indica* var. *saboten*. *Phytother. Res.* **2006**, *20*, 742–747. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
50. Kim, J.H.; Park, S.M.; Ha, H.J.; Moon, C.J.; Shin, T.K.; Kim, J.M.; Lee, N.H.; Kim, H.C.; Jang, K.J.; Wie, M.B. *Opuntia ficus-indica* attenuates neuronal injury in in vitro and in vivo models of cerebral ischemia. *J. Ethnopharmacol.* **2006**, *104*, 257–262. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

**Sample Availability:** Samples of the compounds *Opuntia ficus-indica* extracts are not available from the authors.



© 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/>).



## D. Discussion

L'étude présentée dans l'article avait pour objectif l'évaluation des effets antioxydant et anti-inflammatoires des différents extraits issus de la raquette de cactus d'*Opuntia ficus indica* dans les cellules microgliales de BV-2. Les études bibliographiques réalisées pour la conception des travaux de cette partie ont montré l'utilisation des différents types de LPS pour l'activation des cellules BV-2 chaque fois que cela a été spécifié. Nous avons décidé de comparer quatre sérotypes de LPS bien définis sur le plan structural. Nous avons choisi deux types de LPS issus de la souche bactérienne *Escherichia coli* et les deux autres issus de la souche bactérienne de *Salmonella minnesota*. Les LPS utilisés pour cette étude sont différents par leurs longueurs de la chaîne d'antigène-O et la structure du Lipide-A. La différence structurale de ces quatre types de LPS utilisés est montrée dans la figure 1 de l'article. Cette étude a pour but de montrer l'activité neuroprotectrice et l'effet préventif d'extraits de la raquette de cactus par l'induction d'une activité antioxydante peroxydomale et l'inhibition de la production du NO par les cellules BV-2 de la microglie activée.

Nos résultats ont montré que trois sérotypes sur les quatre utilisés ne révèlent qu'une légère augmentation d'environ (10 et 15%) de la viabilité de cellule BV-2 après un traitement de 24 heures et seul le sérotype de LPS issu de *S. minnesota* induit une augmentation de la viabilité de ces cellules. Des études réalisées sur les cellules de la microglie primaire isolées du cerveau de rat ou de souris ont montré une sensibilité au LPS de sérotypes issu d'*E. coli* O111.B4 avec la réduction significative de leur viabilité uniquement après 2 heures de traitement (Jung et coll., 2005; Liu et coll., 2001), et aucun effet sur leur viabilité après le traitement avec LPS *E. coli* 055.B5 (Song et coll., 2016; Wang, et coll., 2015).

À l'issue de notre étude, nous avons montré pour la première fois une réponse différentielle en fonction du sérotype de LPS pour les deux principales activités peroxydomales : ACOX1 et Catalase dans les cellules microgliales BV-2. En effet, le traitement des cellules BV-2 avec les LPS issus d'*E. coli* O111.B4 ou d'*E. coli* 055.B5 réduit l'activité ACOX1 respectivement d'environ 20% et de 40% avec une légère diminution d'environ 10% et 20% de l'activité Catalase. Tandis que, le traitement de ces cellules avec les sérotypes de LPS issus de *S. minnesota* n'a montré aucun effet sur l'activité d'ACOX1 mais un effet négatif sur l'activité de la catalase. En présence (S) de l'antigène-O, l'activité catalase diminue de -25% à -40%, relativement aux cellules contrôles, alors que l'absence l'antigène-O (Re), révèle une réduction de l'activité catalase de l'ordre de 43%. Dans ce sens, les études réalisées par

Khan et collaborateur sur des cellules gliales C6 traitées avec les LPS issus de *E. coli* ont montré une accumulation des AGTLC, une diminution de l'expression génique des transcrits d'ACOX1 et de la Catalase (Khan, et coll., 1998; Paintlia, et coll., 2008).

Le deuxième volet de cette étude porte sur l'exploration du potentiel préventif des extraits issus de la raquette de cactus. Nous avons montré que ces extraits empêchent la diminution de l'activité de la catalase dans les cellules activées avec les LPS. Ces résultats vont dans le sens des expériences menées par l'équipe d'Oh et ses collaborateurs qui ont montré que les extraits issus de la raquette de cactus empêchent la diminution de l'activité de la catalase dans le foie de souris grâce à la présence d'une glycoprotéine dans ces extraits (Oh & Lim, 2006). Cette étude a montré aussi un effet préventif puissant sur la production de NO par le LPS dans les cellules BV-2. Durant nos études, nous avons montré que les extraits de la raquette *d'Opuntia ficus indica* révèlent une grande capacité antioxydante et anti-inflammatoire dans la modulation de l'activité de la catalase peroxydomale et des propriétés anti-inflammatoire.



*Caractérisation d'une nouvelle lignée des cellules  
BV-2 déficiente en Acyl-CoA oxydase1 (ACOX1)  
peroxysomale (Article)*

---

## A. Introduction

Généralement, les maladies peroxysomales sont caractérisées par des perturbations des fonctions du peroxysome soit à cause de déficience de la machinerie de biogenèse peroxysomale ; soit à cause du déficit d'une voie métabolique peroxysomale. La P-NALD est une maladie caractérisée par un déficit dans les fonctions peroxysomales à savoir la  $\beta$ -oxydation peroxysomale dont l'acteur majeur est l'enzyme Acyl-CoA oxydase 1 (ACOX1) responsable de la métabolisation d'un nombre important de substrats qui jouent un rôle clé dans l'homéostasie cellulaire.

À cause de la déficience en Acyl-CoA oxydase 1, le système de la  $\beta$ -oxydation ne peut pas fonctionner normalement. Il en résulte une accumulation des AGTLC, un stress oxydant et le déclenchement d'un processus inflammatoire. Les mécanismes reliant ces trois processus ne sont pas encore élucidés. Afin, de comprendre ces mécanismes impliqués, nous avons développé un modèle cellulaire pour étudier les liens entre le déficit du métabolisme peroxysomal des lipides, le stress oxydant et l'inflammation. Ce modèle de cellules microgliales BV-2 déficiente en ACOX1 a été très récemment développé à Dijon par Quentin Raas en utilisant une nouvelle technique d'édition génique CRISPR/Cas9 (Raas et coll. 2018).

L'objectif des travaux de ce chapitre est la caractérisation de cette nouvelle lignée cellulaire microgliale BV-2 déficiente en ACOX1 peroxysomale. L'utilisation d'un sgARN (*single guide RNA*) ciblant l'exon 1 du gène codant l'ACOX1 a permis, grâce au système de réparation cellulaire d'ADN par recombinaison homologue directe, d'introduire une mutation dans la séquence du gène *Acox1*. Le séquençage par la méthode de Sanger a permis de démontrer l'insertion d'un nucléotide T dans le cinquième codon de la région codante de l'exon1, introduisant ainsi un décalage de la phase de lecture quelques nucléotides après le site d'initiation de la transcription de l'ARNm *Acox1*. L'analyse par RT-qPCR a montré que le taux d'ARNm *Acox1* muté n'est pas modifié dans la lignée déficiente an ACOX1 (Raas et coll. 2018).

## B. Objectif

L'objectif donc de cette partie sera la caractérisation de cette nouvelle lignée microgliale BV2 déficiente en ACOX1 au niveau l'activité enzymatique et de l'expression de la protéine ACOX1, l'impact de cette déficience sur la croissance et la morphologie cellulaire ainsi que l'expression gènes impliqués dans le métabolisme peroxysomal ou dans l'inflammation. Ce

travail a fait partie d'une publication dans le journal *Biochimica Biophysica Acta, Mol Cell Biol Lipids* en 2018, où je suis deuxième auteur.

## C. Caractérisation des cellules BV-2 déficiente en ACOX1

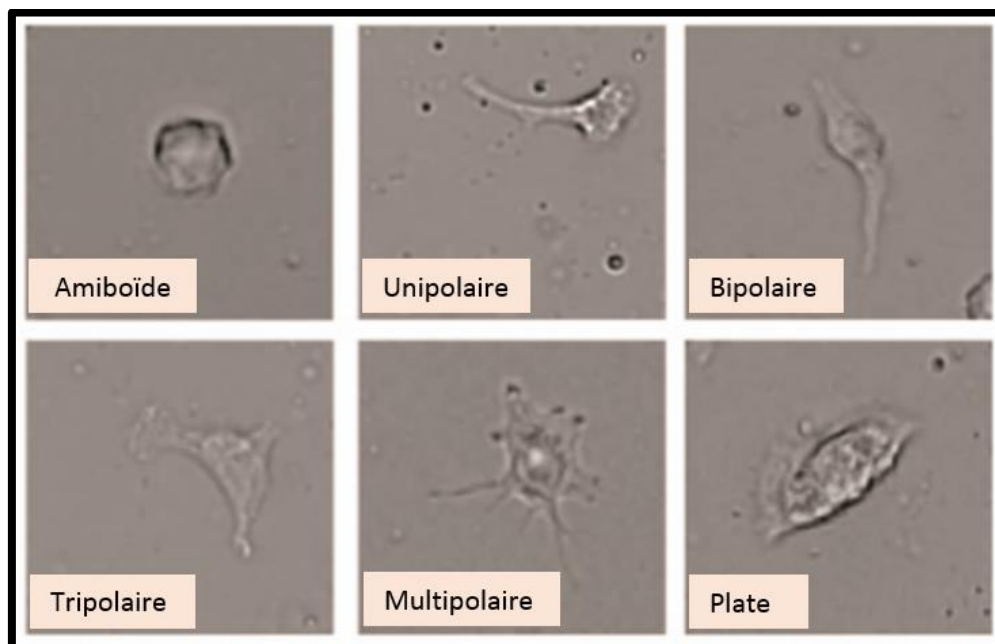
### 1. Étude de la viabilité des cellules BV-2

#### a) Étude de la morphologie des cellules BV-2

Dans la présente étude nous avons utilisé deux types de cellules BV2 :

- Les cellules BV-2 de type sauvage (*Wt* : ce sont des cellules sauvages utilisées comme témoin positif car elles expriment l'ACOX1). Ce type de cellules nous permet de valider les expériences.
- Les cellules BV-2 (*Acox1*<sup>-/-</sup>) : Ce sont des cellules dont les deux allèles codant pour l'ACOX1 ont été tronqués par la méthode Crispr/Cas-9. Théoriquement l'activité ACOX1 devrait être absente.

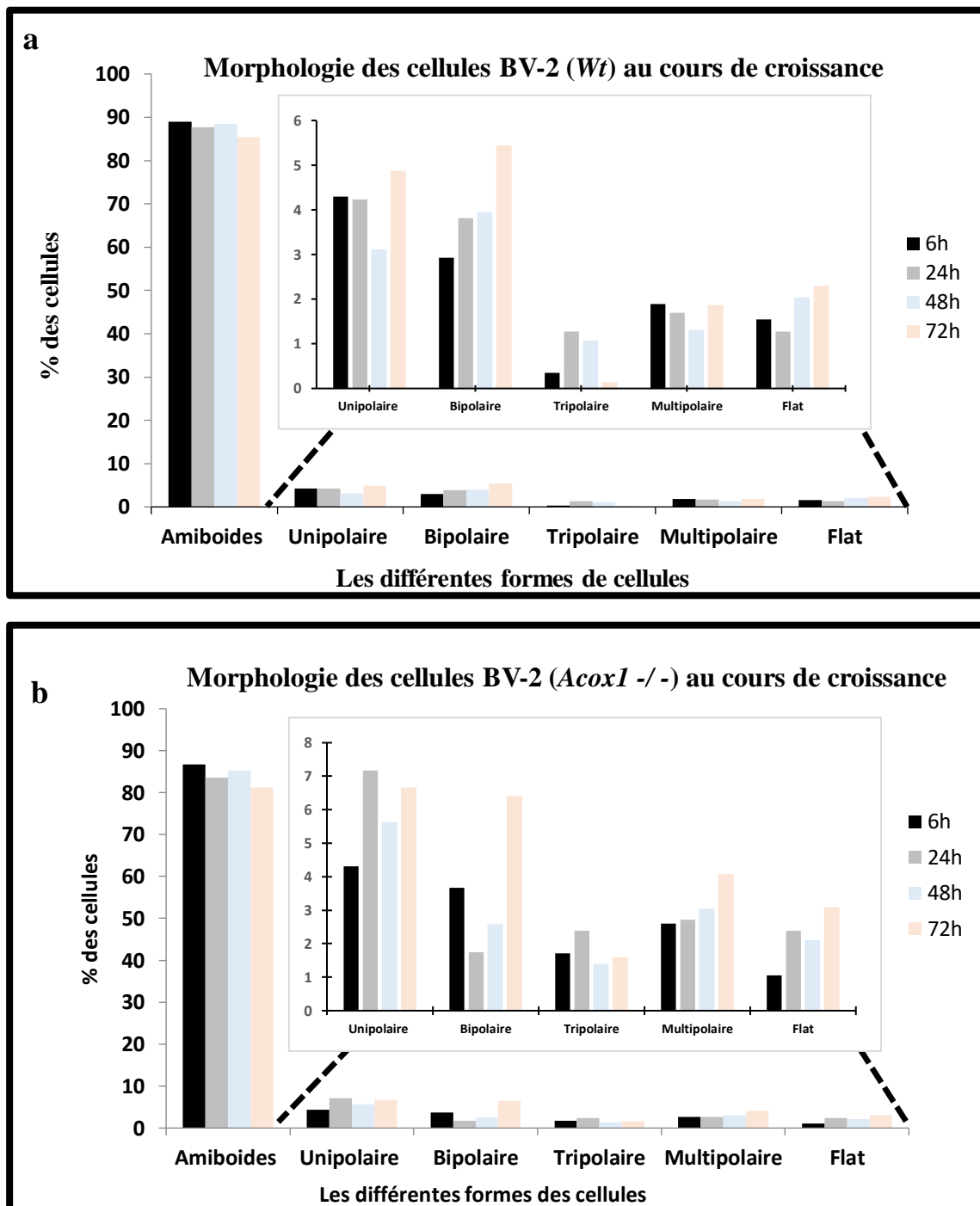
Pour évaluer l'effet de la diminution ou de l'absence de l'activité ACOX1 sur la proportion de chacune des formes cellulaires, une étude morphologique a été réalisée durant une semaine sur les deux types des cellules. En effet, les cellules BV-2 peuvent exister sous plusieurs formes : amiboïde, unipolaire, bipolaire, tripolaire, multipolaire et plate (Figure 21). L'apparition de formes polarisées et amiboïdes, adhérentes, est caractéristique de l'activation des cellules BV-2.



**Figure 21: Les différentes formes des cellules BV-2**

Les cellules BV-2 qui ont été visualisées pendant l'expérience. Photo prise par microscopie optique en contraste de phase (x100). Les cellules non activées et non adhérentes se présentent sous la forme « plate », puis une fois activées, elles se polarisent en cellules de forme uni-, bi-, tri- et multipolaire et deviennent plus adhérentes.

Ainsi, chaque type de cellules BV-2 a été mis en culture et la proportion de chaque forme cellulaire a été calculée après comptage à cinq temps de culture (6h, 24h, 48h et 72h) (Figure 22).



**Figure 22 : Résultats de l'étude morphologiques des cellules BV-2 Wt et ACOX1(-/-) présentant les proportions des différentes formes cellulaires des cellules BV2 en fonction du temps.**

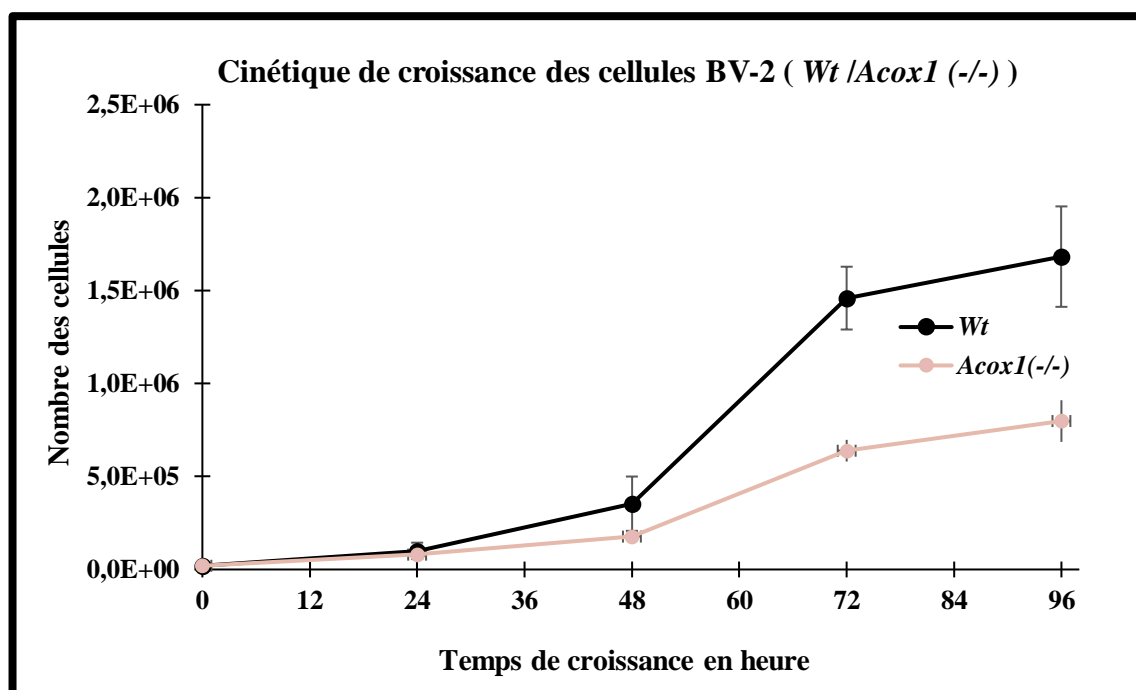
La proportion (en %) des différentes formes cellulaires est présentée. Les encarts représentent un agrandissement des données pour les formes cellulaires peu fréquentes. En A les cellules BV-2 Wt, en B les cellules BV-2 ACOX1 (-/-). Des cellules Wt et ACOX1 (-/-) ont été mises en culture dans du milieu de culture DMEM à 10% SVF et 10% antibiotiques dans les plaques 24 puits en raison de  $2.10^4$  cellules/ puits pendant 96 heures. Au bout de chaque temps trois photos des cellules au grossissement x40 ont été prises à 6h, 24h, 48h et 72h.

La Figure 22 présente les résultats de l'étude morphologique des cellules BV-2 Wt et ACOX1(-/-) au cours de temps. Les résultats de cette étude montrent qu'aucune différence flagrante n'est observée entre chaque type de cellules du point de vue des formes morphologiques. Elles ont toutes une proportion de cellules de forme amiboïde qui est largement majoritaire (supérieure à 80%) par rapport aux cellules de formes différenciées. Cependant il semblerait que plus on avance dans le temps, plus la proportion de formes différenciées augmente (visible par la diminution de la proportion de forme amiboïde à 72h).

*b) Étude de la croissance cellulaire : les cellules BV-2 ACOX1(-/-) croissent plus lentement*

Afin d'évaluer l'effet de l'absence de l'activité ACOX1 sur la viabilité des cellules BV-2, une étude a été réalisée durant une semaine sur les deux types des cellules. Ainsi, chaque type de cellules BV-2 a été mis en culture pour une durée de 96h et le nombre de cellules a été mesuré par comptage pour cinq temps de culture (6h, 24h, 48h, 72h et 96h) en utilisant le bleu de trypan comme colorant des cellules mortes. La Figure 23 montre les résultats de la cinétique de croissance de ces cellules BV-2 (Wt et ACOX1(-/-)) au cours du temps.

Le suivi de la viabilité des cellules au cours du temps est réalisé dans du milieu de culture DMEM supplémenté du 10% SVF et 1% antibiotique, le milieu n'a pas été changé durant les 96 heures de la manipulation. Au cours de ce temps, on a remarqué un changement de couleur du milieu qui passe au fur et à mesure du rouge à l'orange, puis au jaune, cela montre une acidification du milieu due à la consommation des nutriments par les cellules.



**Figure 23: Cinétique de croissance des cellules BV-2 (Wt — ) et BV-2(ACOX1(-/-) — ).**

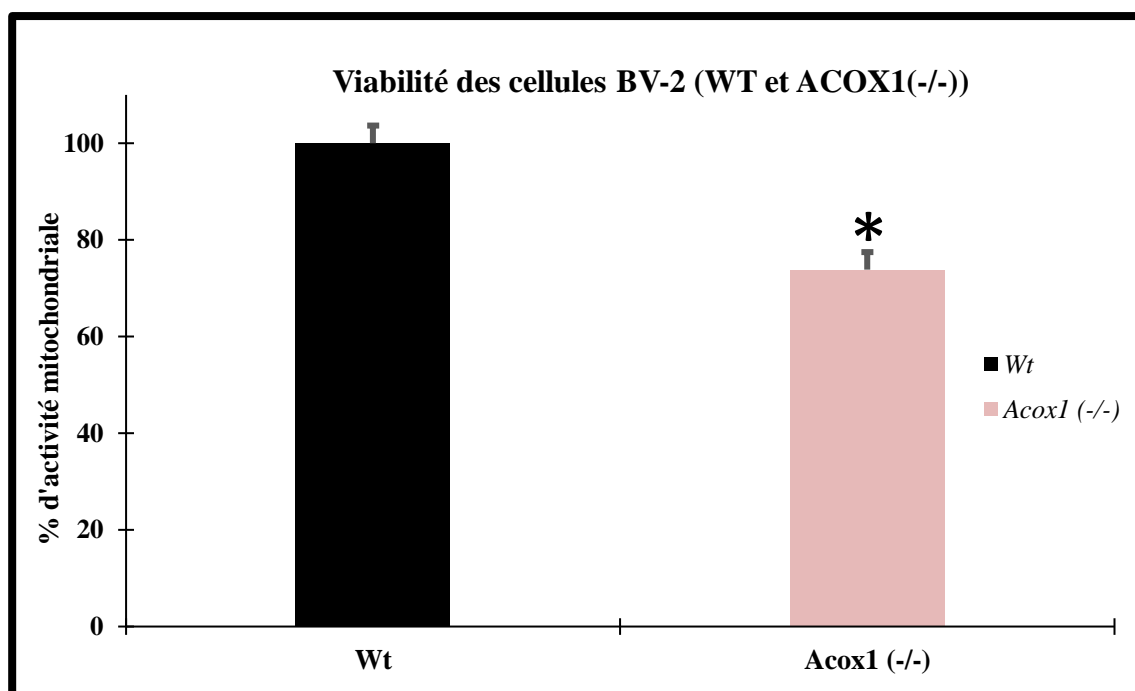
Les cellules BV-2 Wt et ACOX1 (-/-) ont été mises en culture dans du milieu de culture DMEM à 10% SVF et 10% antibiotiques dans les plaques 24 puits en raison de  $2.10^4$  cellules/ puits pendant 96 heures. Au bout de chaque temps les cellules ont été récupérées dans du tampon DPBS et comptées en utilisant le bleu de trypan et la cellule de Malassez ( $n=6$ ).

Pour chaque type de cellules BV-2 (Wt et ACOX1(-/-)), 6 heures après la culture, on observe qu'il y a une faible augmentation du nombre de cellules, puis une stabilité de croissance entre 6 h et 24 h, cette stabilité est due à l'adaptation des cellules au milieu de culture et au temps que mis ces cellules pour adhérer aux boîtes de culture. Entre 24h et 72h, c'est la phase d'accélération qui débute, suivie de la phase exponentielle de croissance, les cellules se mettent à proliférer, les conditions sont favorables, car le milieu est encore riche en nutriments et elles possèdent de la place sur le fond du puits. Au bout de 72h les cellules Wt et les cellules ACOX1(-/-) entrent en phase stationnaire. Il apparaît que les cellules BV-2 (ACOX1(-/-)) ont une cinétique de croissance plus lente les cellules BV-2 Wt et une phase stationnaire atteinte pour un nombre de cellules moindre ( $7,98.10^5$  cellules pour les BV-2 (ACOX1(-/-)) contre  $1,68.10^6$  cellules pour les cellules BV-2 Wt). Cela signifie que le temps de doublement des cellules BV-2 (ACOX1(-/-)) est 2 fois plus long que les cellules BV-2 Wt.

## 2. Étude de la viabilité et l'adhérence cellulaire

### a) *L'absence d'ACOX1 diminue la viabilité cellulaire*

Afin d'évaluer la viabilité cellulaire, l'activité de la succinate déshydrogénase mitochondriale des cellules BV-2 Wt et ACOX1(-/-) a été mesurée par le test MTT. La Figure 24 montre les résultats de ce test.



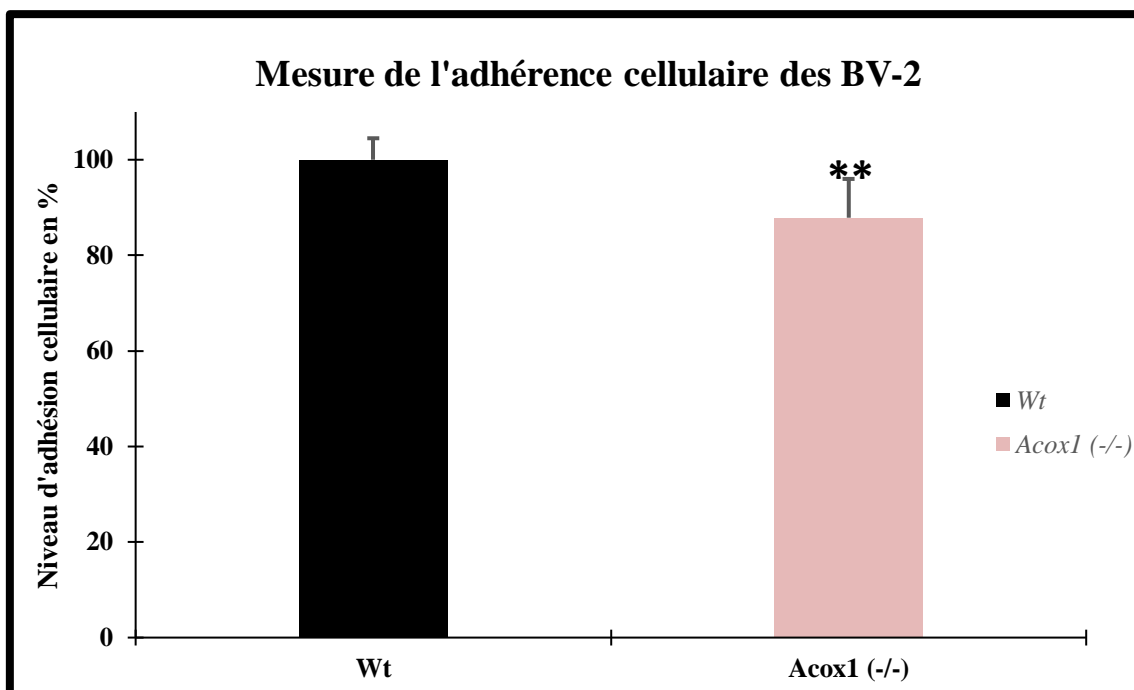
**Figure 24: Viabilité des cellules BV-2 (Wt) et (ACOX1(-/-)) évaluée par la mesure du niveau de l'activité de la succinate déshydrogénase mitochondriale (Test MTT).**

Les cellules Bv-2 Wt et ACOX1(-/-) ont été mises en culture dans du milieu de culture DMEM à 10% SVF et 10% antibiotiques dans les plaques 6 puits en raison de  $5 \cdot 10^5$  cellules/puits pendant 24h, puis le test MTT a été réalisé ( $n=3$ , \*  $p<0.1$ ).

Les résultats de ce test montrent que, en référence au niveau basal de l'activité succinate déshydrogénase mitochondriale des cellules BV-2 Wt (100%), une diminution de l'activité de la succinate déshydrogénase des cellules BV-2 ACOX1(-/-) d'environ 30% est observée par rapport aux cellules BV-2 Wt.

### b) *L'absence d'ACOX1 diminue l'adhérence cellulaire*

Afin de comparer le niveau d'adhérence des cellules BV-2 Wt et ACOX1(-/-), le test au cristal violet a été réalisé pour comparer l'adhésion des cellules. La Figure 25 montre les résultats de ce test.



**Figure 25 : Adhésion des cellules BV-2 (Wt) et (ACOX1(-/-)) mesurée par marquage au cristal violet.**

Les cellules BV-2 Wt et ACOX1(-/-) ont été mises en culture dans du milieu de culture DMEM à 10% SVF et 10% antibiotiques dans les plaques 6 puits en raison de  $5.10^5$  cellules/puits pendant 36 heures. Au bout de temps de croissance, la coloration au cristal violet a été réalisée ( $n=6$ ,  $** p<0.05$ ).

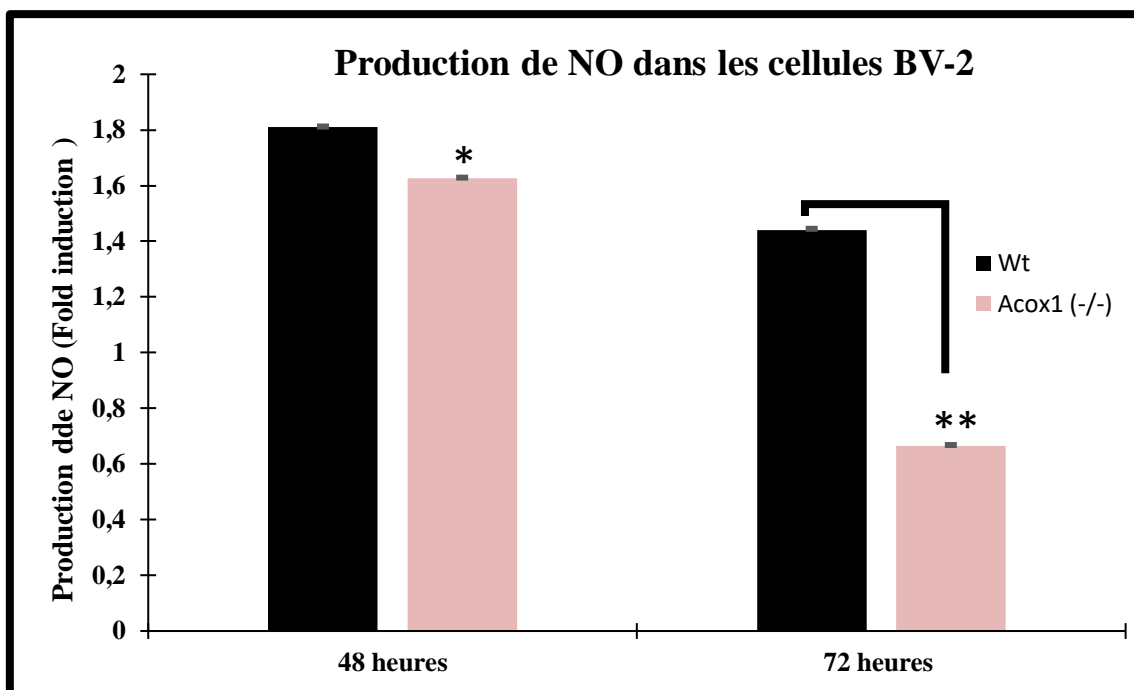
Les résultats montrent une diminution de l'adhésion des cellules BV-2 (ACOX1(-/-)) d'environ 20% est observée par rapport aux cellules BV-2 (Wt).

### 3. La production de NO est fortement diminuée dans les cellules BV-2 déficiente en ACOX1

Afin de comparer la production de NO dans les cellules BV-2 Wt et ACOX1(-/-), les cellules ont été mises en culture pour une durée de 48h et 72h sans changer le milieu de culture, puis le test NO a été réalisé à chaque temps en utilisant le réactif de Greiss. La Figure 26 montre les résultats de ce test.

À 48h de culture une diminution de 20% est observée dans la production de NO entre les deux lignées cellulaires. Par contre, à 72h, le taux diminue pour les deux lignées cellulaires respectivement de 37% et 96% pour les cellules BV-2 (Wt) et les cellules BV-2 ACOX1(-/-). De manière très intéressante, une diminution de la production du NO supérieure à 70% est observée pour les cellules BV-2 (ACOX1(-/-) par rapport aux cellules BV-2 (Wt).





**Figure 26: niveau de production de NO par les cellules BV-2 Wt et ACOX1(-/-).**

Les cellules BV-2 Wt et ACOX1(-/-) ont été mises en culture dans du milieu de culture DMEM à 10% SVF et 10% antibiotiques dans les plaques 6 puits en raison de  $5 \cdot 10^5$  cellules/puits pendant 48 et 72 heures. Au bout de chaque intervalle de temps, le test NO a été réalisé ( $n=6$ , \*  $p<0.1$ , \*\*  $p<0.05$ ).

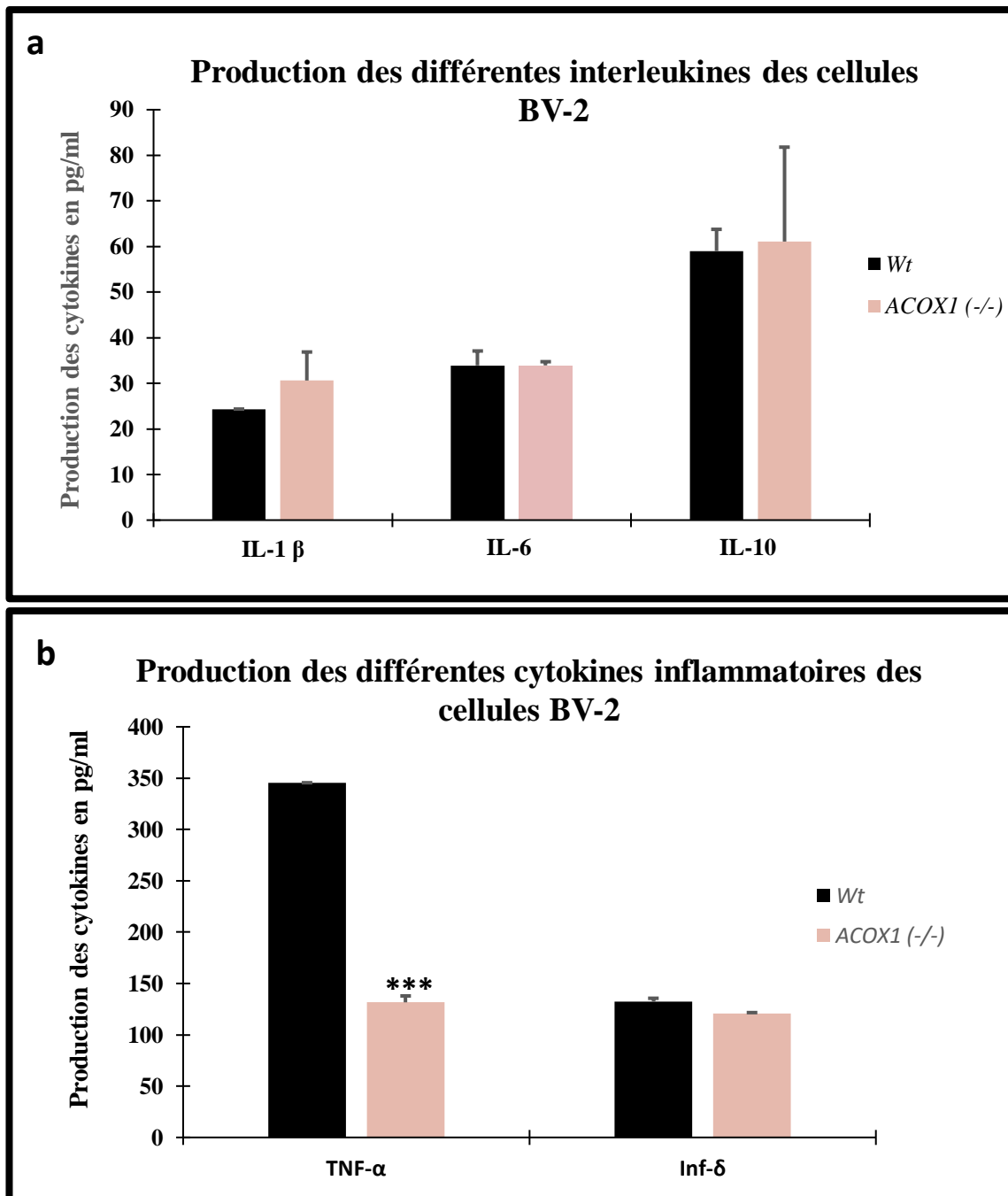
#### 4. La déficience en ACOX1 et la production des cytokines inflammatoires

Afin d'évaluer l'effet pro-inflammatoire de la déficience en ACOX1 des cellules BV-2, une mesure de cytokines inflammatoires libérées dans le surnageant du milieu de culture a été réalisée après 48 heures de culture. Ce travail a été réalisé en collaboration avec Stéphane Mandard (MCU Biochimie) du laboratoire INSERM U866 de Dijon. Les résultats de cette étude sont présentés dans la Figure 27.

En analysant les résultats de la mesure des cytokines inflammatoires libérés dans le milieu de culture des cellules BV-2, on remarque ainsi :

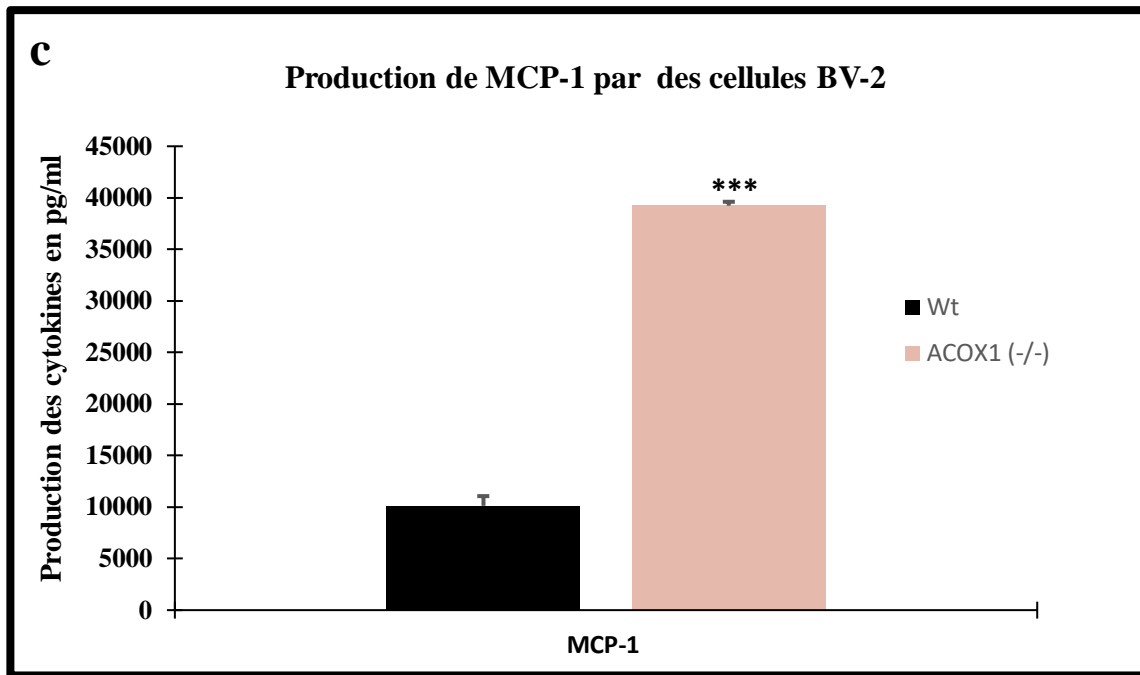
- Pour les interleukines 1 $\beta$ , 6 et 10, aucune différence significative n'est observée dans leur libération entre les deux types cellulaires Wt et ACOX1(-/-). Il est à noter que le niveau de la production de l'IL-10 est plus élevé que celui de l'IL-6 et de l'IL-1 $\beta$  ( Figure 27 a).
- Pour TNF- $\alpha$  : il est à remarquer que le taux de TNF- $\alpha$  libéré par les cellules BV-2 ACOX1(-/-) est diminué de 65% par rapport au BV-2 Wt (Figure 27 b).

- Pour  $\text{INF-}\delta$  aucune différence significative du niveau de production n'est remarqué entre les deux types de cellules BV-2 Wt et  $\text{ACOX1(-/-)}$  (Figure 27b).
- Pour MCP-1 : le taux de libération de cette cytokine par les BV-2  $\text{ACOX1(-/-)}$  est environ quatre fois la quantité libérée par les cellules BV-2 Wt à l'état basal (Figure 28).



**Figure 27: Figure montrant le niveau de l'expression des cytokines inflammatoires par les cellules BV-2 Wt et  $\text{ACOX1(-/-)}$ .**

En (a) le niveau d'expression de la famille des Interleukines IL-1 $\beta$ , IL-6 et IL-10 ; en (b) l'expression de TNF- $\alpha$  et INF- $\delta$ . Les cellules BV-2 Wt et  $\text{ACOX1(-/-)}$  ont été mises en culture dans du milieu de culture DMEM à 10% SVF et 10% antibiotiques et le surnageant a été récupéré 48 heures. (n=3, \*\*\* p<0.001)

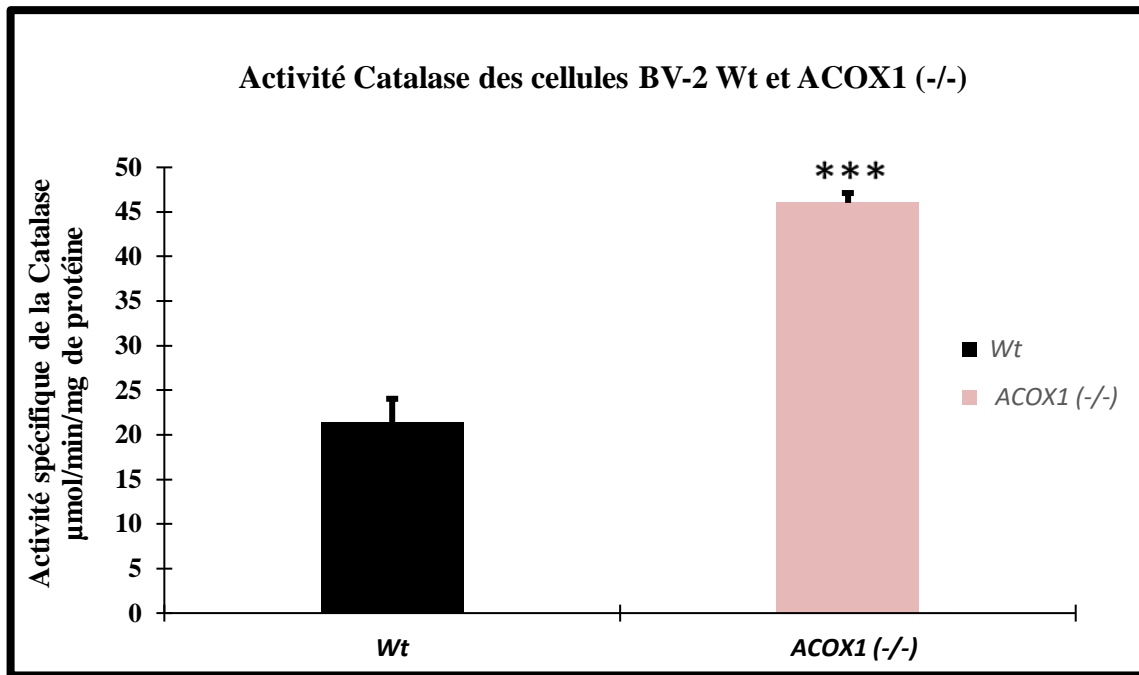


**Figure 28: Figure montrant le niveau de l'expression des cytokines inflammatoires par les cellules BV-2 Wt et ACOX1(-/-).**

Le niveau d'expression MCP-1. Les cellules BV-2 Wt et ACOX1(-/-) ont été mises en culture dans du milieu de culture DMEM à 10% SVF et 10% antibiotiques et le surnageant a été récupéré 48 heures. (n=3, \*\*\* p<0.001)

### 5. La déficience en ACOX1 augmente l'activité de la catalase des cellules BV-2

La mesure de l'activité catalase des cellules BV-2 ACOX1(-/-) a été réalisée en parallèle à l'activité de cette enzyme chez les cellules BV-2 Wt, la Figure 29 montre les résultats de cette mesure. Ces résultats montrent une augmentation significative de 2,25 x du niveau de cette activité dans les cellules BV-2 ACOX1(-/-) par rapport aux cellules Wt.



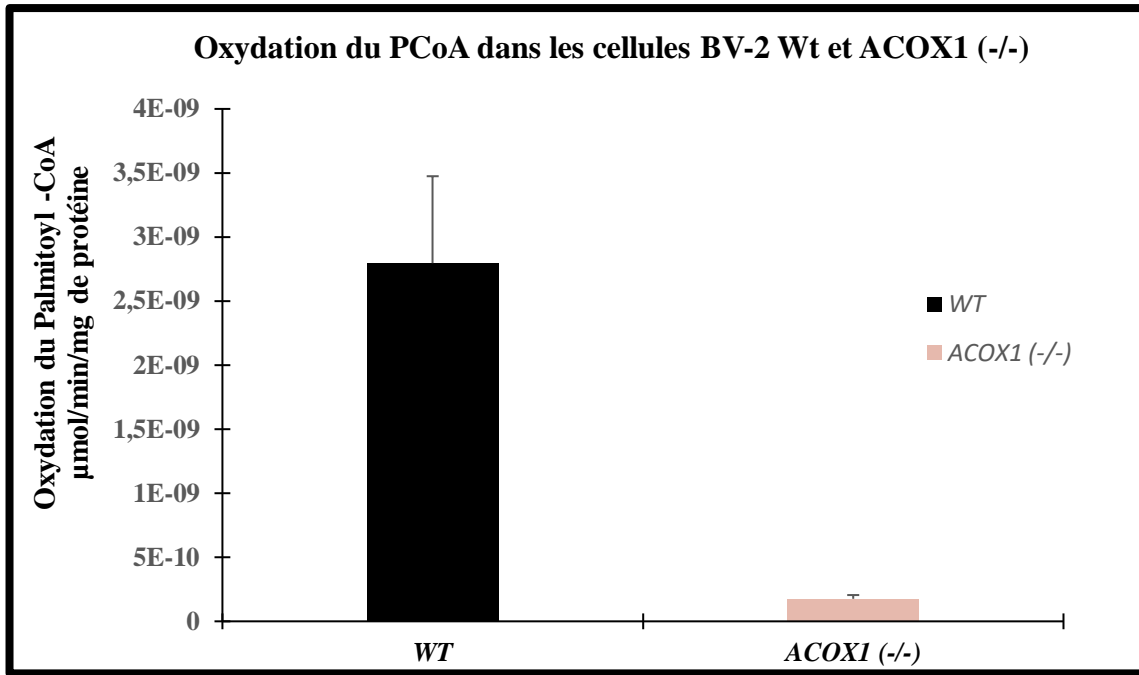
**Figure 29: Figure montrant l'activité spécifique de la catalase des cellules BV-2 Wt et ACOX1(-/-).** Les cellules BV-2 (Wt, ACOX1(-/-)) ont étéensemencées dans des plaques 6 puits en raison de  $3 \cdot 10^6$  cellules/puits pendant 12h, après avoir préparées les Lysats cellulaires ; l'activité de la Catalase a été mesurée à 240 nm, la figure montre l'activité Spécifique de la Catalase des cellules BV-2 ( $n=4$ , \*\*\*  $p<0.001$ ).

#### 6. L'activité palmitoyl-CoA oxydase est absente dans les cellules BV-2 déficientes en ACOX1.

L'étape nécessaire de la caractérisation des deux types cellulaires BV-2 Wt et ACOX1(-/-) consiste à vérifier l'absence de l'activité acyl-CoA oxydase 1. La mesure de l'activité enzymatique pour le palmitoyl-CoA (C16:0) a été réalisé par une méthode spectrophotométrie en suivant la réduction du NADH sur les extraits cellulaires des deux types cellulaires.

La mesure de l'activité ACOX1/Enzyme Bi-fonctionnelle des cellules BV-2 ACOX1(-/-) a été mesurée et comparée par rapport à l'activité de cette enzyme chez les cellules BV-2 Wt. La

Figure 30 montre les résultats de cette mesure. Ces résultats montrent une très faible activité de cette enzyme dans les cellules BV-2 ACOX1(-/-) qui est de  $(1,78 \cdot 10^{-10} \mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg})$  par rapport aux cellules Wt  $(2,8 \cdot 10^{-9} \mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg})$ . Cette activité résiduelle peut être le bruit de fond du test.



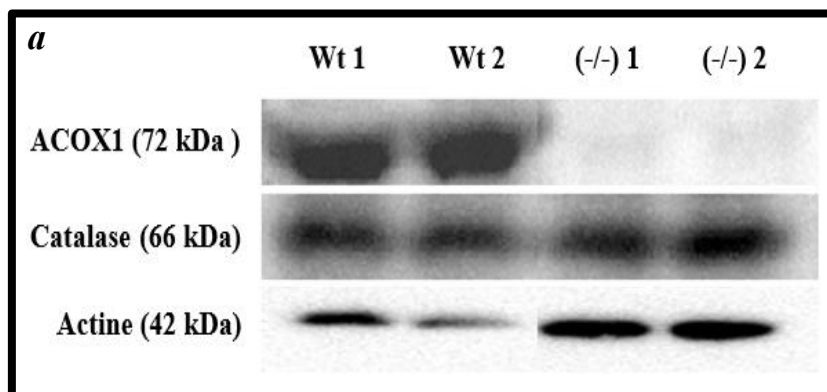
**Figure 30: Figure montrant l'activité de l'oxydation du Palmitoyl- CoA des cellules BV-2 Wt et ACOX1(-/-).**

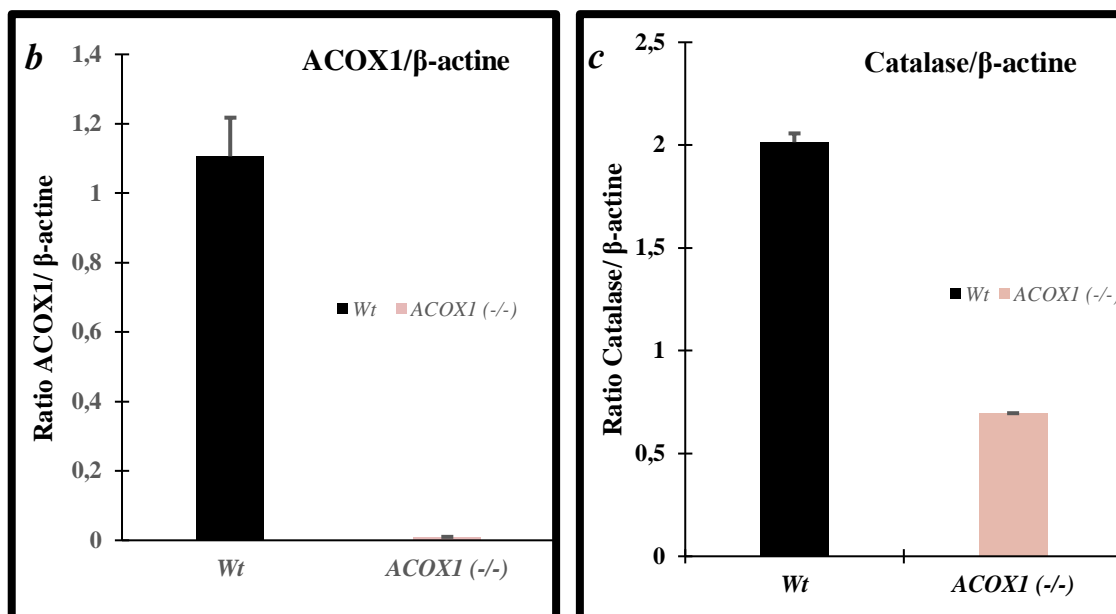
Les cellules BV-2 (Wt, ACOX1(-/-)) ont été ensemencées dans des plaques 6 puits en raison de  $3 \cdot 10^6$  cellules/puits pendant 12h, après avoir préparées les Lysats cellulaires ; l'activité de l'oxydation du Palmitoyl-CoA a été mesurée, la figure montre cette activité dans les cellules BV-2 (n=2).

## 7. Évaluation de l'expression de la protéine ACOX 1 et Catalase

Pour confirmer les résultats de la mesure de l'activité ACOX1 et Catalase des cellules BV-2, la présence de la protéine ACOX1 a été testé par western-blot (Figure 31).

Les cellules BV-2 Wt montrent une bande de 72 kDa caractéristique de l'ACOX1 et une bande de 66 kDa caractéristique de la catalase. Les cellules BV-2 ACOX1(-/-) montrent une intensité faible pour la bande ACOX1.





**Figure 31: Figure montrant expression protéique de l'ACOX1 et de la Catalase par Western blot dans les cellules BV-2 Wt et ACOX1(-/-).**

Sur la photo (a), la protéine ACOX1 est caractérisée par une bande à 72 kDa et la catalase avec une bande à 66 kDa. Les extraits cellulaires obtenus dans les types de cellules BV-2 ont été séparés par électrophorèse en gel de polyacrylamide en présence de SDS puis transférés sur une membrane de PVDF et immun-détectés avec l'anticorps anti-ACOX1 et anti-Catalase. La membrane a été ensuite dépouillée et exposée à l'anticorps anti- $\beta$ -actine. (b) Analyse de la densité relative des bandes par rapport à celle de la  $\beta$ -actine en (b) pour l'ACOX1 et en (c) pour la Catalase avec le logiciel Image Lab. Les barres d'erreurs sur les histogrammes représentent les écarts types ( $n=2$ ).

## 8. Déficience en ACOX1 et variations de l'expression génique

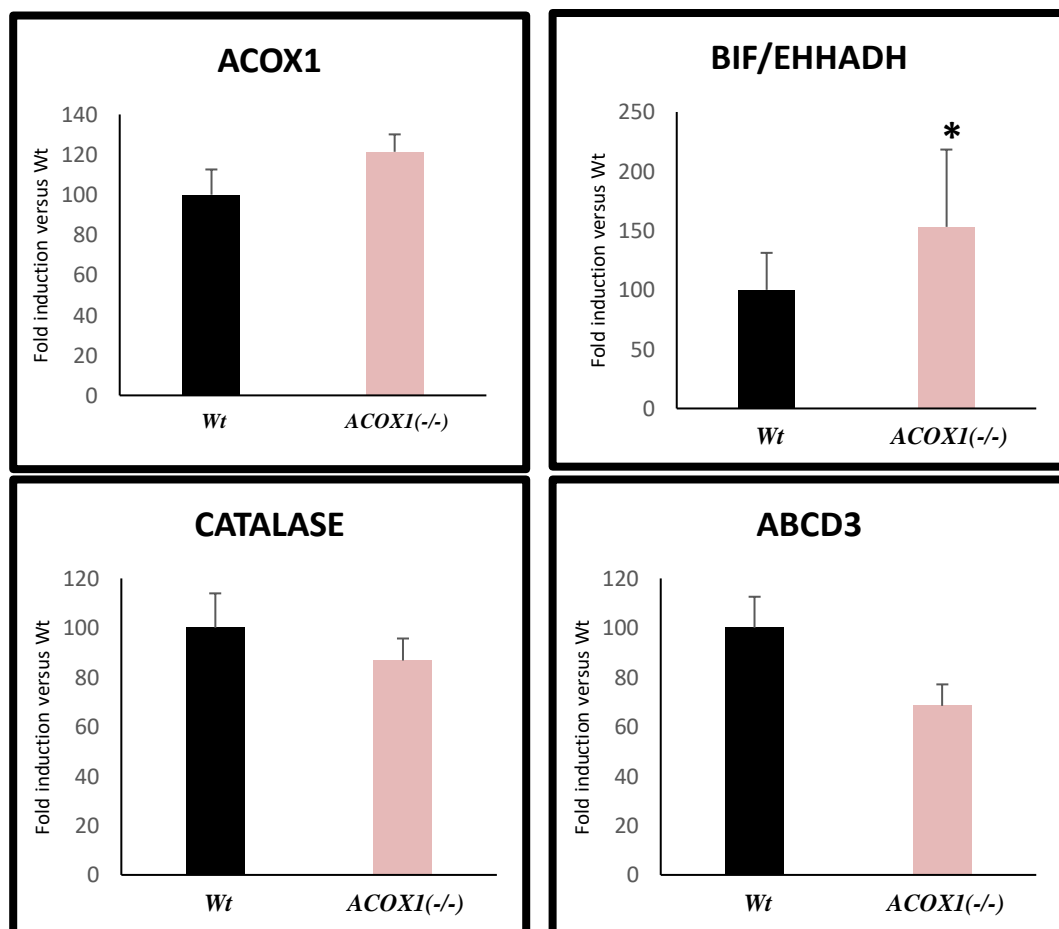
Depuis de nombreuses années, les études menées sur un certain nombre de maladies peroxysomales s'appuient sur l'utilisation de fibroblastes obtenus à partir de patients atteints par ces maladies. L'accès à ces fibroblastes non transformés s'avère capital dans la compréhension des mécanismes moléculaires liés à la déficience de l'ACOX1. Cependant, l'utilisation de ces fibroblastes peut présenter des limitations liées au fonctionnement de ces cellules dont certains aspects métaboliques sont limités. C'est pourquoi le développement d'une lignée déficiente en ACOX1 représente une avancée dans la compréhension des changements métaboliques liés ou non à l'inflammation et/ou à la biogenèse d'autres organites cellulaires.

L'obtention très récentes dans notre laboratoire de la lignée déficiente en ACOX1 à ouvert un nouveau champ d'investigation sur le rôle de la microglie dans cette maladie. Après avoir caractérisé cette lignée pour s'assurer de la déficience en ACOX1, nous avons souhaité explorer l'expression transcriptionnelle de gènes codants pour les protéines peroxysomales ainsi que de gènes impliqués dans l'inflammation.

Les analyses par PCR quantitative des taux d'ARNm des gènes codants des protéines peroxysomales dans le contrôle des fonctions peroxysomales, la biogenèse mitochondriale et métabolisme énergétique, les cytokines pro et anti inflammatoires et la neuroinflammation.

*a) Évaluation du taux d'expression des gènes codant pour protéines peroxysomales liées à la  $\beta$ -oxydation peroxysomale*

La Figure 32 présente l'expression relative des ARNm des enzymes et protéines liées à la  $\beta$ -oxydation peroxysomale (ACOX1, Enzyme bifonctionnelle, Catalase et ABCD3, figure 32)



**Figure 32: évaluation du taux d'ARNm des gènes codant pour les enzymes de la peroxysomale  $\beta$ -oxydation peroxysomale dans les cellules BV-2 Wt et ACOX1(-/-).**

*L'expression relative des ARNm correspondant aux différents gènes codant pour les protéines peroxysomales en ACOX1, catalase et BiF et ABCD3. L'axe des abscisses représente le niveau d'expression de chaque gène en fold induction calculé par rapport aux cellules BV-2 Wt (n=3, \* p<0.01).*

L'analyse de l'expression du gène codant pour l'ACOX1 et la catalase ne montrent aucune différence au niveau des deux types cellulaires. L'ARNm du gène qui code pour l'enzyme

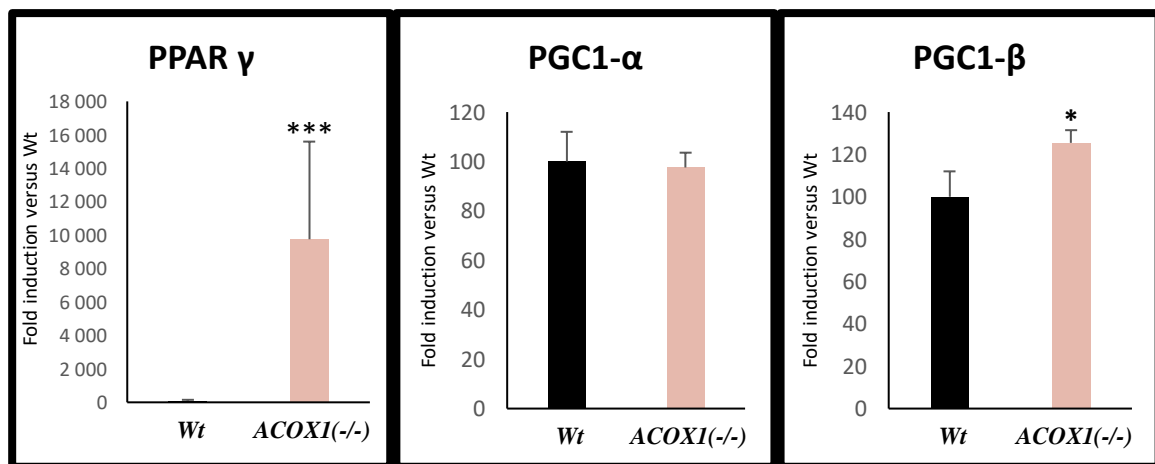
bifonctionnelle Bif/ EHHADH montre une augmentation de l'expression au niveau des cellules BV-2 déficiente en ACOX1 par rapport aux cellules contrôles.

Le gène codant pour ABCD3 a montré une légère diminution de l'expression dans les cellules BV-2 déficiente en ACOX1 par rapport aux cellules Wt.

*b) Évaluation du taux d'expression des gènes codant pour protéines intervenant dans la biogenèse mitochondriale et métabolisme énergétique*

L'analyse de l'expression relative des ARNm des gènes codant pour la biogenèse mitochondriale à savoir la PGC1- $\alpha$  et PGC1- $\beta$ , et PPAR $\delta$  sont représentés dans la figure 33.

La PGC1- $\alpha$  est un coactivateur de transcription, l'un des protéines essentielles à l'activation de l'expression des gènes. Il s'associe à des facteurs de transcription, à l'origine sont des coactivateurs de transcription PPAR $\alpha$  et au même temps le principal régulateur de la biogenèse et des fonctions mitochondriales. De ce fait, la mesure de l'expression d'ARNm a été réalisée, les résultats ont montré qu'il n'y a pas aucune différence du niveau d'expression PGC1- $\alpha$  mais une légère augmentation du PGC1- $\beta$  dans les cellules BV-2 déficiente en ACOX1 par rapport au Wt. Tandis que cette déficience en ACOX1 induit fortement l'expression du gène codant pour la PPAR  $\delta$ .



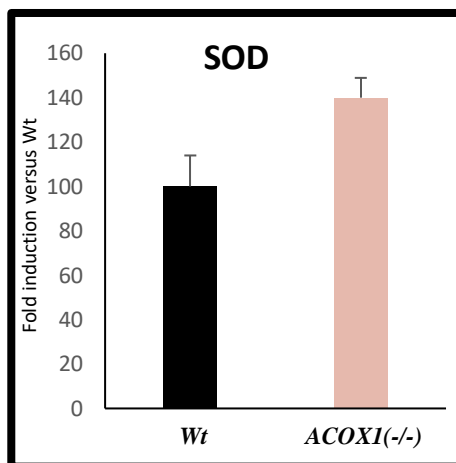
**Figure 33: Évaluation du taux d'ARNm des gènes codant pour les enzymes de la biogenèse des mitochondries et métabolisme énergétique dans les cellules BV-2 Wt et ACOX1(-/-).**

L'expression relative des ARNm correspondant aux différents gènes codant pour les enzymes intervenant dans la biogenèse des mitochondries et métabolisme énergétique. L'axe des abscisses représente le niveau d'expression de chaque gène en fold induction calculé par rapport aux cellules BV-2 Wt. (n=3, \*\*\* p<0.0001, \* p<0.01)



c) *Évaluation du taux d'expression des gènes codant pour les gènes de stress oxydant*

La SOD est une enzyme antioxydante qui intervient dans le maintien de l'équilibre cellulaire, le taux d'expression du gène SOD est augmenté dans les cellules BV-2 ACOX1(-/-) par rapport au BV-2 Wt comme le montre le résultat de la Figure 34.



**Figure 34:Évaluation du taux d'ARNm du gène codant pour une protéine impliqué dans le stress oxydant dans les cellules BV-2 Wt et ACOX1(-/-).**

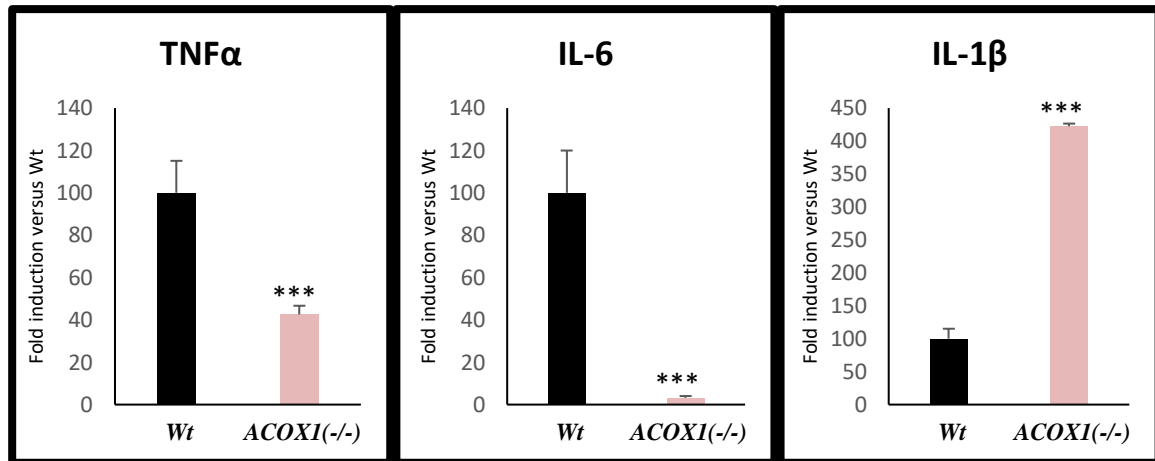
*L'expression relative des ARNm correspondant au gène codant pour la SOD dans les cellules BV-2 Wt et ACOX1 (-/-). L'axe des abscisses représente le niveau d'expression de chaque gène en fold induction calculé par rapport aux cellules BV-2 Wt (n=3).*

d) *Évaluation du taux d'expression des gènes codant pour les cytokines inflammatoires et les gènes de la neuroinflammation*

L'analyse par PCR quantitatives des taux d'ARNm des cytokines pro-inflammatoire à savoir certaines interleukines comme IL-6, IL-1 $\beta$  et TNF- $\alpha$  a été réalisée sur les cellules BV-2 Wt et ACOX1(-/-). Les résultats présentés dans la Figure 35 montre que l'expression du gène codant par IL-6 et TNF- $\alpha$  est réprimé dans les BV-2 (ACOX1(-/-)) par rapport au Wt, tandis que IL-1 $\beta$  est augmentée d'environ quatre fois dans les cellules BV-2 déficientes en ACOX1 par rapport aux cellules contrôles.

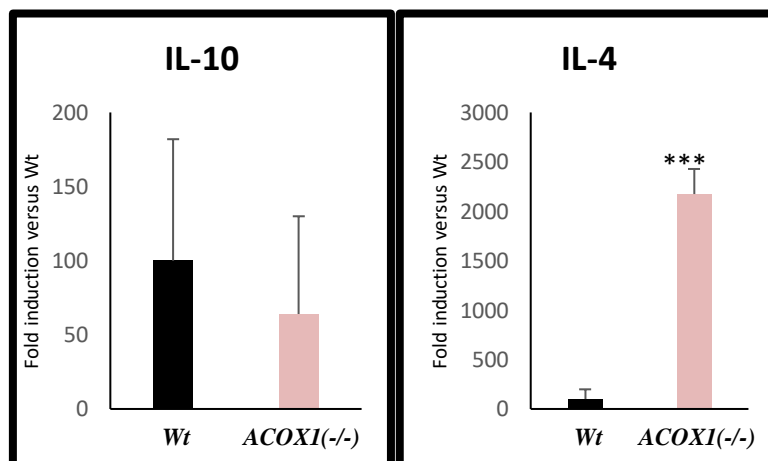
L'analyse des résultats pour les cytokines anti-inflammatoires a montré qu'il n'y a pas de différence dans le niveau d'expression d'IL-10, tandis que le gène codant pour IL-4 est surexprimé dans les cellules BV-2 déficientes en ACOX1 par rapport aux cellules Wt comme le montre la Figure 36.

Concernant les gènes de la neuroinflammation l'analyse par PCR quantitatives des taux d'ARNm de iNOS, Arginase et MCP-1. La figure 37 a montré que : l'expression du gène iNOS est diminué dans les cellules BV-2 en absence d'ACOX1 par rapport aux Wt d'environ 50%. Tandis que l'expression pour les gènes codant pour MCP-1 et arginase sont fortement induites dans les cellules BV-2 présentant la déficience en ACOX1 par rapport aux cellules Wt.



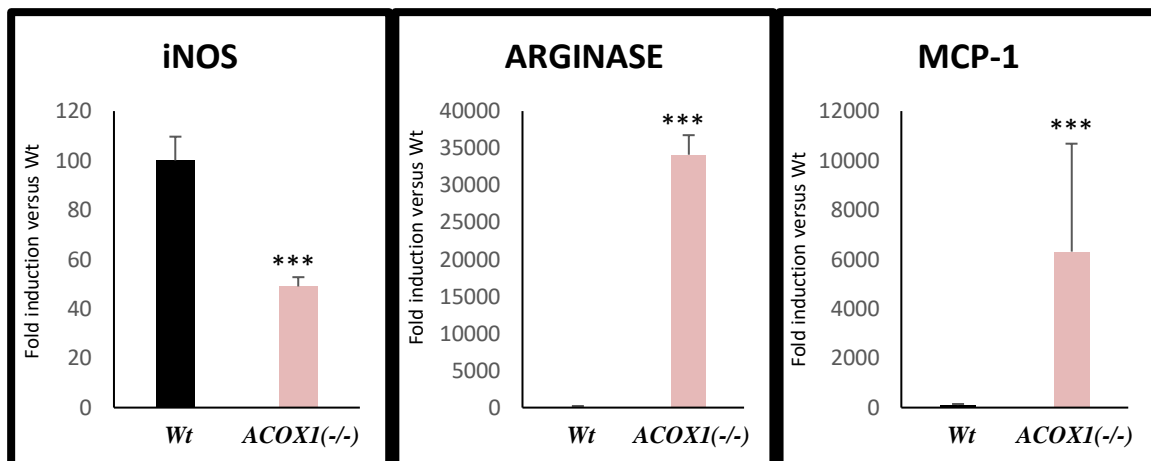
**Figure 35: Évaluation du taux d'ARNm des gènes codant pour les cytokines pro-inflammatoires dans les cellules BV-2 Wt et ACOX1(-/-).**

L'expression relative des ARNm correspondant au gène codant pour les cytokines pro-inflammatoires : IL-6, IL-1 $\beta$  et TNF- $\alpha$  dans les cellules BV-2 Wt et ACOX 1 (-/-). L'axe des abscisses représente le niveau d'expression de chaque gène en « fold induction » calculé par rapport aux cellules BV-2 Wt (n=3, \*\*\* p<0.0001).



**Figure 36: Évaluation du taux d'ARNm des gènes codant pour les cytokines anti-inflammatoires dans les cellules BV-2 Wt et ACOX1(-/-).**

L'expression relative des ARNm correspondant au gène codant pour les cytokines pro-inflammatoires : IL-10, IL-4 dans les cellules BV-2 Wt et ACOX 1 (-/-). L'axe des abscisses représente le niveau d'expression de chaque gène en « fold induction » calculé par rapport aux cellules BV-2 Wt (n=3, \*\*\* p<0.0001).



**Figure 37: Évaluation du taux d'ARNm des gènes codant pour les gènes impliqués dans la neuroinflammation dans les cellules BV-2 Wt et ACOXI(-/-).**

L'expression relative des ARNm correspondant au gène codant pour gènes impliqués dans la neuroinflammation : Arginase, iNoS (NOS 2) et MCP-1 dans les cellules BV-2 Wt et ACOX 1(-/-). L'axe des abscisses représente le niveau d'expression de chaque gène en « fold induction » calculé par rapport aux cellules BV-2 Wt (n=3, \*\*\*  $p < 0.0001$ ).



Contents lists available at ScienceDirect

BBA - Molecular and Cell Biology of Lipids

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/bbalip](http://www.elsevier.com/locate/bbalip)

## A microglial cell model for acyl-CoA oxidase 1 deficiency

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

<sup>a</sup> Laboratoire Bio-PeroxiL, EA7270, University of Bourgogne Franche-Comté, Dijon, France

<sup>b</sup> Laboratoire de Biochimie et Neurosciences, Faculté des Sciences et Techniques, University Hassan I, Settat, Morocco

<sup>c</sup> Aix Marseille Univ, CNRS, INSERM, CIML, Centre d'Immunologie de Marseille-Luminy, Marseille, France

<sup>d</sup> Laboratory of Clinical Chemistry, Hospital of Varese, ASST-Sestelaghi, Milan, Italy

<sup>e</sup> Laboratory of Medical Genetics and Neurogenetics, Fondazione IRCCS Istituto Neurologico Carlo Besta, Milan, Italy

<sup>f</sup> Unité de Recherche en Physiologie Moléculaire (URPHYM), laboratoire de Chimie Physiologique, NARILIS (Namur Research Institute for Life Sciences), University of Namur (UNamur), Namur, Belgium

<sup>g</sup> Centre des Sciences du Goût et de l'Alimentation, AgroSup Dijon, UMR6265/UMR1324, CNRS, INRA, University of Bourgogne Franche-Comté, Dijon, France

<sup>h</sup> 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)  $\beta$ -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<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 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-1 $\beta$*  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  $\beta$ -oxidation defect on oxidative stress, inflammation and cellular functions.

### 1. Introduction

Peroxisomes are small organelles (0.1–1  $\mu$ m), 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  $\beta$ -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  $\beta$ -oxidation pathway dedicated to straight-chain fatty acids, which includes long- and very long-chain fatty acids (LCFA, VLCFA), polyunsaturated fatty acids, and dicarboxylic 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](mailto: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

1388-1981/© 2018 Elsevier B.V. All rights reserved.

Please cite this article as: Raas, Q., BBA - Molecular and Cell Biology of Lipids, <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2018.10.005>



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  $\beta$ -oxidation in rat brain [18]. Hepatomegaly, adrenal insufficiency and craniofacial dysmorphism 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 GeneCopoeta, 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 (GeneCopoeta, 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. ATLO3001) 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 <b>CGG</b>	4:[1-2-3-6]	chrX: -7,341,383
Predicted off-target 1	<u>CTTCCCTCCTTGCGCAGAT<b>CGG</b></u>		
Target sequence	GGCCCGCTCCTTGCGCAGAT <b>CGG</b>	4:[2-5-7-9]	chr12: -56,701,554
Predicted off-target 2	<u>GCCAGGT<b>CGT</b>TGCGCAGAT<b>CGG</b></u>		

Mismatches are underlined and the protospacer adjacent motif (NGC) 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<sub>2</sub>.

BV-2 cells ( $2 \times 10^6$ , ~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 ( $2 \times 10^4$  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 *Acox1F*: 5'-CTCAAGGCCCTGGCCAATCG-3', *Acox1R*: 5'-ACGCCATCGAAGTAGGGGT-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 cComplete 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<sup>+</sup> 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<sup>+</sup> 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<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (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<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. 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<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (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 from 12 cells using ImageJ calculation of areas after manual delineation of organelles. The mean area (± SD) was expressed in µm<sup>2</sup> 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 house-keeping gene *36B4* using the following primers: *IL-1β*: F, 5'-AAGGAG AACCAAGCAACGAC-3', R, 5'-GAGATTGAGCTGTCTGCTCA-3', *IL-6*: F, 5'-GTTCTCTGGGAAATCGTGA-3', R, 5'-TGACTCCAGGTAGCTA TGG-3', *Trem2*: F, 5'-GACCTCTCCACGAGTTTCTCC-3', R, 5'-TACATGA CACCTCAAGGACTG-3', *36B4*: F, 5'-ATGGGTACAAGCGCGTCTG-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 Bonferroni 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 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  $\beta$ -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 diamino-benzidine (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 peroxophagy 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



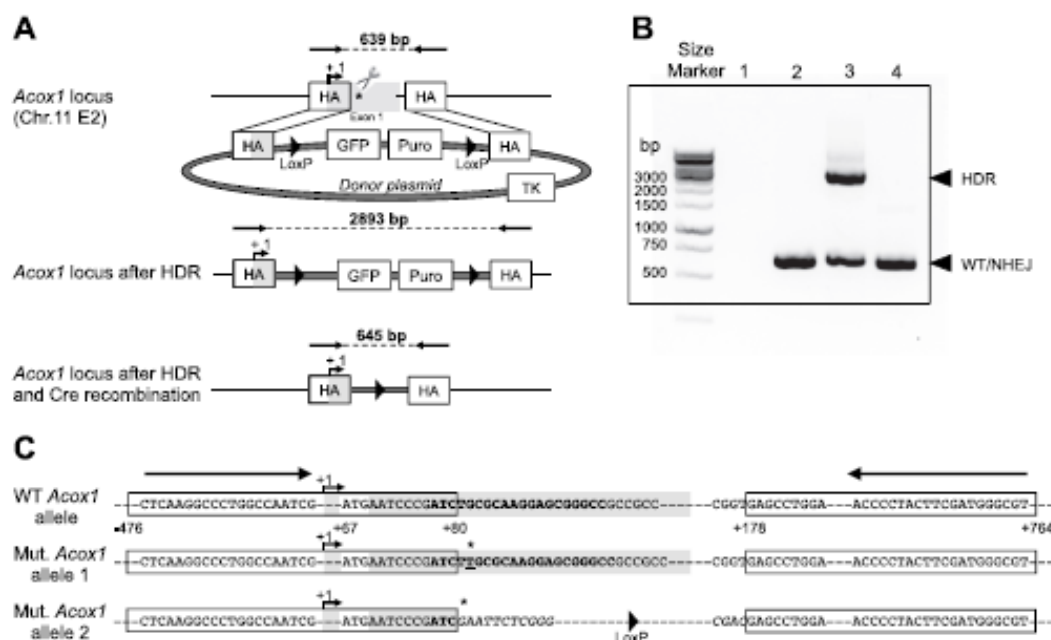


Fig. 1. CRISPR/Cas9-mediated gene knockout strategy and molecular screening in BV-2 cells. (A) Schematic representation of the *Acox1* target locus and donor plasmid allowing homology-directed repair (HDR) and representation of the locus after Cre recombination. The size of amplicons for each case is indicated. The position of primers used for PCR screening are shown by two opposite arrows (HA: homology arm; light grey box: 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).

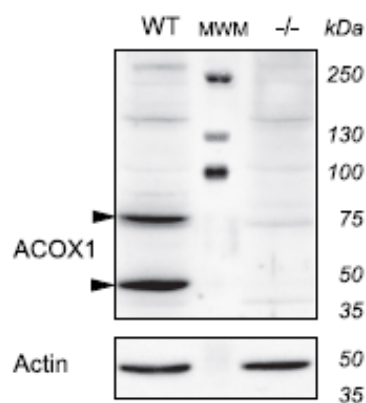


Fig. 2. Western blot analysis of ACOX1 expression in WT and *Acox1*-deficient (-/-) BV-2 cells. Proteins of whole cell lysates were separated on 7.5% SDS-PAGE, blotted on PVDF membrane and analyzed by immunoblotting with anti-ACOX1 and anti-Actin antibodies. The central lane corresponds to molecular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

elongated organelles, suggesting fission. Mitochondria areas were found significantly reduced ( $0.603 \mu\text{m}^2 \pm 0.034$  in WT cells ( $n = 133$ ) vs  $0.502 \mu\text{m}^2 \pm 0.020$  *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).

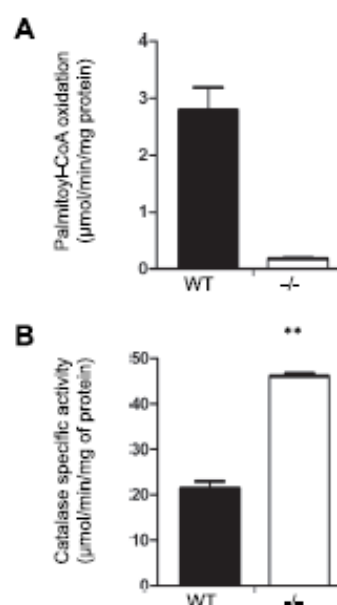


Fig. 3. Cyanide-insensitive palmitoyl-CoA oxidation (A) and catalase activity (B) in WT and *Acox1*-deficient (-/-) BV-2 cells. Data represent the mean  $\pm$  SD of 4 independent experiments. Statistically significant differences determined by unpaired *t*-test analysis are indicated: \*\* *P* value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



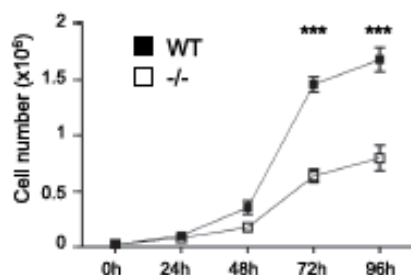


Fig. 4. Proliferation curve of WT and *Acox1*-deficient ( $-/-$ ) BV-2 cells. At  $t_0$ ,  $2 \times 10^4$  cells were seeded. Data represents mean values of 2 independent experiments (cells, from the same passage number, thawed at different dates and cultivated during 48 h) with 3 technical replicates  $\pm$  SD. Statistically significant differences determined by ANOVA are indicated: \*\*\* P value  $\leq$  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 ( $\times 3.5$  for C26:0 and  $\times 1.6$  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-1 $\beta$  and 6 (IL-1 $\beta$  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-1 $\beta$  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*-deficient 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<sub>2</sub>O<sub>2</sub> level [45] and since catalase expression and activity are indeed very sensitive to oxidative stress [46]. *Acox1* deficiency in mice or *Acox1* silencing in 158N 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*-deficient cells, a possible activation of PPAR $\alpha$  would also make sense. Peroxisomes and mitochondria share very similar division and proliferation mechanisms that depend in part on PPAR $\alpha$  activation [49]. In the *Acox1* $^{-/-}$  mice liver, a sustained activation of PPAR $\alpha$  pathways has been observed [11,45]. The most admitted hypothesis is that one or several substrates of ACOX1 accumulate and serve as PPAR $\alpha$  activators [50]. Among these substrates, VLCFA have been described as PPAR $\alpha$  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 PPAR $\alpha$  responsive genes such as *Acox1* or *Pex11b* showed a weak induction that does not support clearly the involvement of PPAR $\alpha$  (data not shown). Of note, PPAR $\alpha$ -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

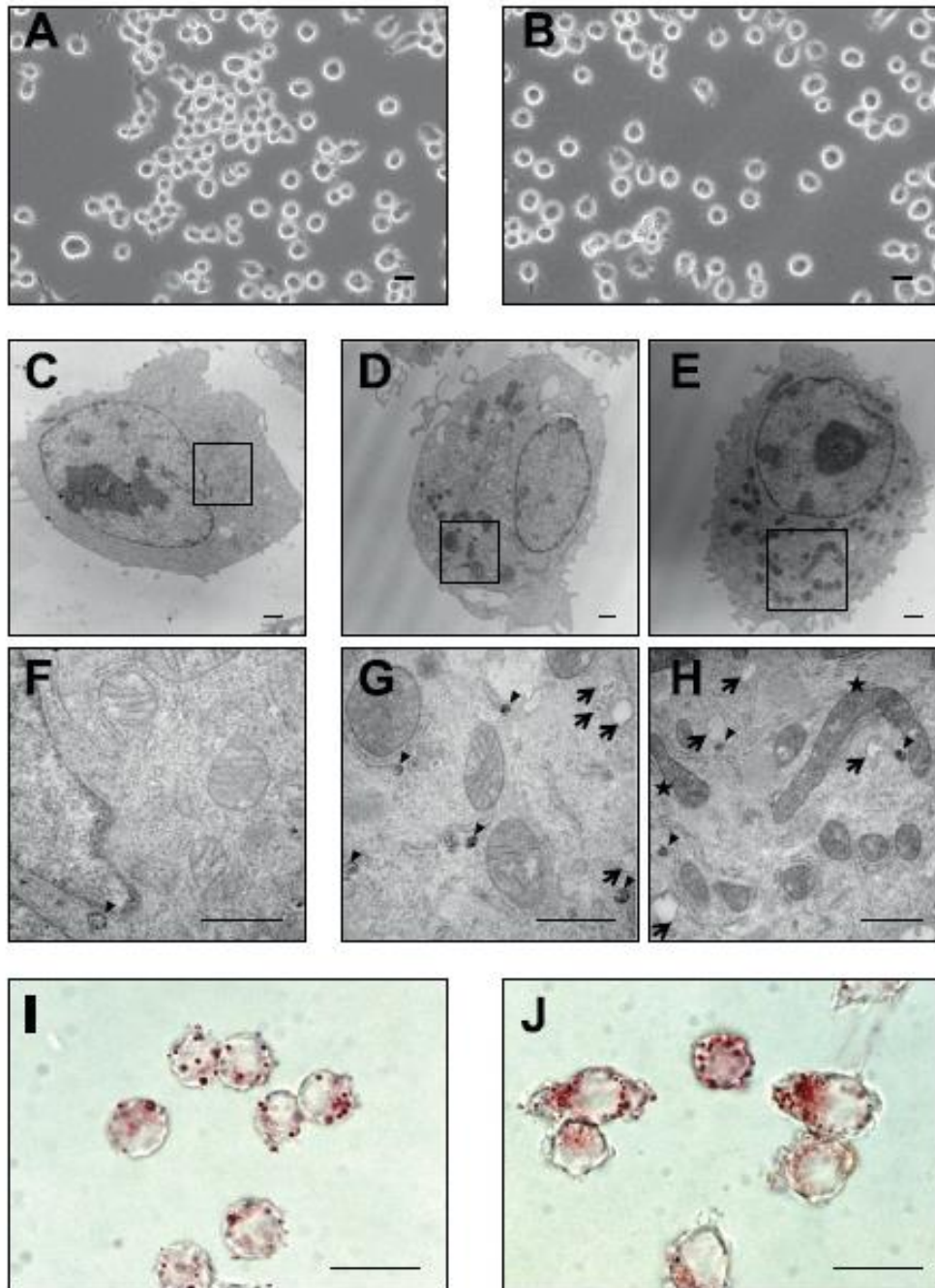


Fig. 5. Cell morphology analysis. Phase contrast micrographs of WT (A) and *Acox1*-deficient (B) BV-2 cells showing a majority of round shaped cells and a minority of elongated ramified cells without obvious differences between both genotypes (bar = 20  $\mu$ m). Transmission electron micrographs (whole cell and respective higher magnification) of WT (C, F) and *Acox1*-deficient (D, G and E, H) BV-2 cells (bar = 2  $\mu$ m). 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  $\mu$ m).

patients with *ACOX1* defect and *Acox1*<sup>-/-</sup> 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		<i>ACOX1</i> -/-		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  $P \leq 0.001$ \*\*\*,  $P \leq 0.01$ \*\* ,  $P \leq 0.05$ \* determined by unpaired t-test analysis are indicated. NS, not significant.

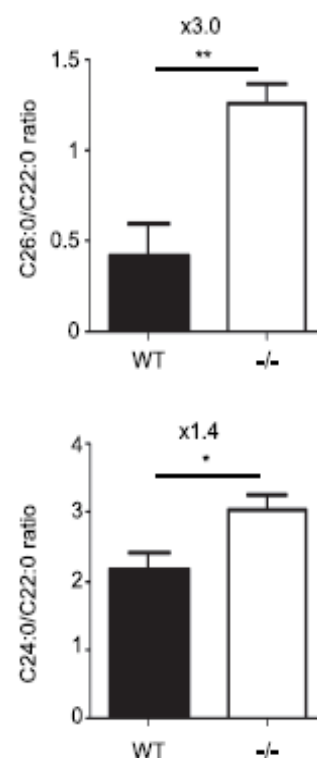
because of the role of microglia in brain homeostasis and inflammation control, further lipid analysis should also focus on signaling molecules of lipid origin secreted by microglial cells, i.e. docosanoid and eicosanoids fatty acid derivatives, which are tightly connected to peroxisomal metabolism [62].

The absence of peroxisome proliferation in human fibroblasts [21] represents a discrepancy with our results but the absence of PPAR $\alpha$  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*<sup>-/-</sup> mice [45].

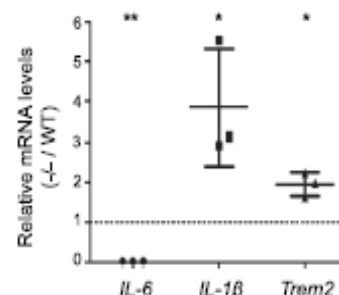
Very interestingly, in the absence of any stimuli, we found that the expression levels of genes expressing the proinflammatory cytokines (IL-1 $\beta$  and IL-6) and the cell surface protein Trem2 which controls microglial polarization and inflammatory response, are modified in *Acox1*-deficient cells. Induction of IL-1 $\beta$  and IL-6 was described in BV-2 cells upon LPS stimulation [64]. The observed induction of IL-1 $\beta$  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*<sup>-/-</sup> 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  $\leq 0.01$ , \*  $P$  value  $\leq 0.05$ .



**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-1 $\beta$ ) and the phagocytic and immune receptor Trem2 were measured using real time RT-qPCR and normalized to 36B4. Data represent the mean values  $\pm$  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  $\leq 0.01$ , \*  $P$  value  $\leq 0.05$ .

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 pathopathogenesis 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'Éducation Nationale, 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). Fatima Saïh received a fellowship "Action Intégrée de the Comité Mixte Inter-universitaire Franco-Marocain" (CMIFM, AIMA/14/310, Campus France N° 30293PA) from the PHC Toubkal program, Ministère des Affaires Étrangères. We thank the DimaCell platform for technical assistance in TEM (Microscopy Centre INRA/UB) and the cytometry platform of DJON 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. Andreolotti, N. Laitruite, 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. Franssen, 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. Proenca, J. Koster, M.S. Ebbertink, 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. Castaels, H.J. Eysen, 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 pseudo-neonatal adrenoleukodystrophy, *J. Clin. Invest.* 94 (1994) 526–531.
- [8] C. Nohammer, Y. El-Shabrawi, S. Schauer, M. Hiden, J. Berger, S. Forns-Pettur, E. Winter, R. Eiferl, 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. Ouxaca-Castillo, P. Andreolotti, 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. Halston, K. Murray, F. Toulon, 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, L.J. A. 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. Monuk, J. Powers, P.H. Schwartz, P.A. Watkins, Y. Shi, A. Moser, D.A. Shrier, H.R. Waterham, D.J. Nugent, J.E. Abdesur, Effects of hematopoietic stem cell transplantation on acyl-CoA oxidase deficiency: a sibling comparison study, *J. Inher. Metab. Dis.* 37 (2014) 791–799.
- [18] C. Van den Branden, J. Lesman, 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. Stok, 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. Schielen, N. Feller, R.B. Schutgens, F. Stellaard, C. Jakobs, R. Mithulla, G. Soldfeldt, First prenatal diagnosis of acyl-CoA oxidase deficiency, *J. Inher. Metab. Dis.* 13 (1990) 371–374.
- [21] H.I. El Hajj, A. Vluggens, P. Andreolotti, 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. Bottsberg, S. Verheijden, I. Hulshagen, D.H. Gutmann, S. Goebels, 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] I. Hulshagen, O. Krysko, A. Bottsberg, 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. Froesch, P. Musolino, R. Tanzil, D.Y. Kim, A. Bilfi, 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. Froesch, 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. Gillem, 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* 327 (2012) 816–821.
- [29] E. Blas, R. Barluzzi, V. Bocchini, R. Mazzolla, F. Bistoni, Immortalization of murine microglial cells by a v-rif/v-myc carrying retrovirus, *J. Neuroimmunol.* 27 (1990) 229–237.
- [30] A. Henn, S. Lund, M. Hedtjarn, A. Schratzenholz, 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. Blas, P. Slick, 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. Gullinger, 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 Kebhaj, P. Andreolotti, D. Moutassif, M. Kabine, H. Schohn, M. Dauca, N. Laitruite, M.S. El Kebhaj, 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. Andreolotti,



- M. Cherkaoui-Malki, T. Nury, G. Lizard, I. Weinhofer, J. Berger, E.T. Kass, D. Tromppler, S. Savary, LXK antagonists induce ABCD2 expression, *Biochim. Biophys. Acta* 1841 (2014) 259–266.
- [37] M.A. Lauronzi, C. Arcuri, R. Rossi, P. Marconi, V. Bocchini, Effects of micro-environment on morphology and function of the microglial cell line BV-2, *Neurochem. Res.* 26 (2001) 1209–1216.
- [38] X. Liu, N. Qian, Microglia and CNS Interleukin-1: beyond immunological concepts, *Front. Neurol.* 9 (2018) 8.
- [39] M. Ertu, 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. Steger, 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. Heering, P. Ullnitz, 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. Viuggens, 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. Baurne, P. Andreoletti, A. Athias, T. Nury, A. Zarrouk, K. Ragot, A. Vejux, J.M. Riedinger, Z. Kattan, G. Bessede, D. Tromppler, 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 fusion 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. Kler, 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. Kler, 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. Gryglak-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 mono-unsaturated fatty acids as agonists for peroxisome proliferator-activated receptors, *Biol. Pharm. Bull.* 33 (2010) 854–861.
- [55] M.V. Chakravarthy, L.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. Viuggens, P. Andreoletti, N. Viswakarma, Y. Jia, K. Matsumoto, W. Kallik, 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. Invest.* 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. Depretre, S. Fourcade, M. Lecca, S. Leclercq, P. Martin, T. Pineau, F. Cadepond, M. El-ett, 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. Carozzo, C. Bellini, S. Lucifoli, 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. Bonifoli, Peroxisomal acyl-CoA-oxidase deficiency: two new cases, *Am. J. Med. Genet. A* 146A (2008) 1676–1681.
- [61] S. Ferdnandusse, 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. Inher. 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.

*Analyses par fractionnement subcellulaire et ultracentrifugation en gradient Nycodenz des cellules BV-2 déficientes en Acyl-CoA oxydase 1 peroxysomale.*

---

## A. Introduction

Les résultats obtenus et présentés dans le chapitre précédent, grâce à la caractérisation des cellules BV-2 déficiente en *Acox1*<sup>-/-</sup>, nous ont encouragé à étudier de près si cette déficience impact la distribution et les activités enzymatiques des organites cellulaires, et particulièrement les peroxyosomes.

Le fractionnement subcellulaire des cellules a été réalisé en collaboration avec l'équipe du Pr. Michel JADOT de l'université de Namur en Belgique. Une équipe experte dans les techniques de fractionnement des différents types cellulaires. Nous avons réalisé pour la première fois, le fractionnement des cellules BV-2 et l'étude de la distribution des organites cellulaires dans ces cellules. Des expériences qui ont demandé l'adaptation du protocole pour le fractionnement subcellulaire et une mise au point d'une technique pour la mesure de l'activité de la catalase dans les fractions Nycodenz peroxysoyomales de ces cellules.

Pour les lysats des cellules BV-2, les homogénats de tissus de souris et les fractions ENMLPS, la mesure de l'activité de la Catalase a été réalisée en suivant une dégradation de peroxyde d'hydrogène par la catalase à 240 nm. Or, pour les fractions préparées avec le gradient de Nycodenz, la mesure de cette activité à 240 nm était impossible en raison de l'interférence de l'absorption du Nycodenz à 244 nm.

## B. Introduction

Ce chapitre a pour objectif de présenter donc une optimisation de la technique de fractionnement subcellulaire des cellules BV-2, une mise au point de la mesure de l'activité catalase comme enzyme marqueur peroxyosomal et l'analyse par fractionnement et par ultracentrifugation des cellules BV-2 déficientes en ACOX1.



## C. Protocole de fractionnement subcellulaire des cellules BV-2

### 1. Principe du fractionnement subcellulaire

La méthode de fractionnement subcellulaire consiste à séparer les différents organites cellulaires : noyau-mitochondries-lysosomes et peroxyosomes par destruction de la membrane plasmique et une désorganisation de la cellule par homogénéisation afin, de libérer son contenu et obtenir des fractions séparées et enrichies en un ou plusieurs organite(s) particulier(s).

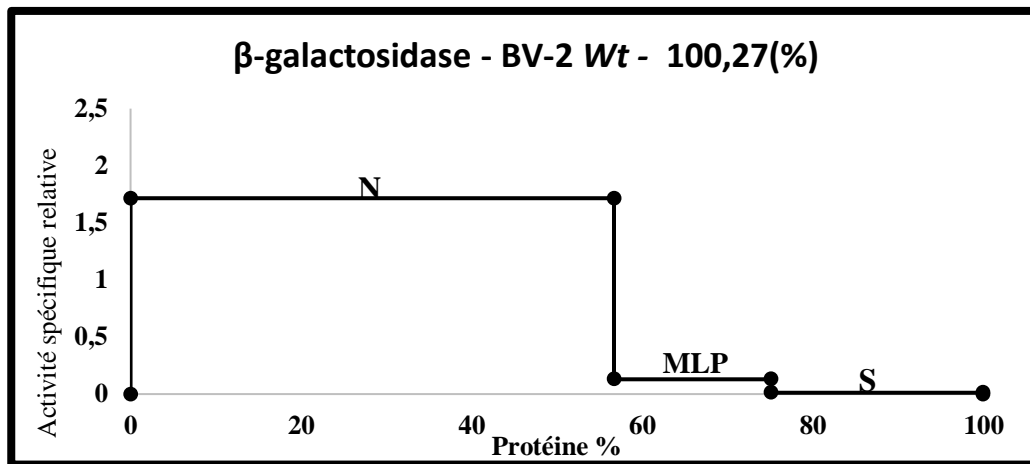
La première étape de ce processus est l'homogénéisation qui consiste à rompre la membrane plasmique dans une suspension cellulaire dont le pH et la force ionique sont connus. Cette étape est la plus importante de cette méthode, permettant de libérer le contenu cellulaire dans le tampon d'homogénéisation.

L'homogénéisation peut se faire via plusieurs moyens selon le type cellulaire et tissulaire. L'homogénéisateur utilisé pour les cellules est un tube en verre dans lequel la suspension cellulaire est placée puis le piston est placé dans ce tube. Ainsi, les cellules passant entre la paroi du tube et le piston, seront comprimées, la membrane cellulaire rompue et enfin le contenu cellulaire libéré. Le nombre de passages (aller et retour) réalisés avec le piston pour la lyse de la membrane plasmique dépend de la fragilité et la nature de la membrane plasmique de chaque type cellulaire.

Pour le fractionnement subcellulaire des cellules BV-2, il n'existait pas de méthode préétablie et publiée pour le fractionnement de ces cellules. En effet, nous avons mis au point cette étape d'homogénéisation de ces cellules en se basant sur le protocole adapté pour les cellules MCF-7 (lignée des cellules mammaires cancéreuses), les fibroblastes et les cellules HELA utilisées dans le laboratoire de chimie physiologique à l'université de Namur en Belgique.

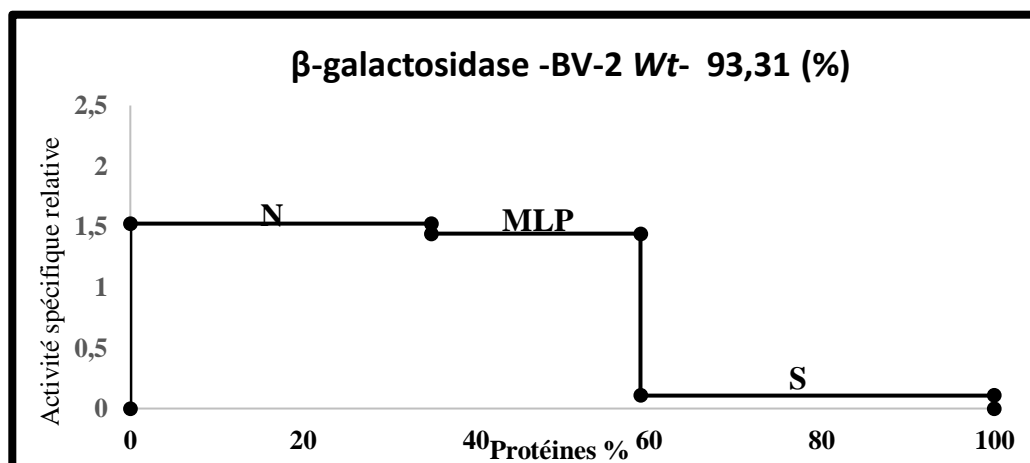
Le protocole utilisé dans un premier temps est basé sur le passage six fois dans le Dounce d'une suspension cellulaire des BV-2 dans une solution isotonique de saccharose 250 mM. Un fractionnement subcellulaire partiel qui consiste à obtenir 3 fractions : N / MLP et S a été réalisé puis un dosage de l'activité de l'enzyme marqueur des lysosomes, la  $\beta$ - galactosidase, a été réalisé. Les résultats de ce dosage (Figure 38) ont montré que l'activité de la  $\beta$ - galactosidase est beaucoup plus élevée dans la fraction N et une faible activité dans la fraction MLP qui en principe serait enrichie en lysosomes, indiquant donc un enrichissement en lysosomes de la fraction N (nucléaire) et qui pourrait être dû uniquement la présence de cellules

encore intactes dans la fraction nucléaire. Ceci peut être expliqué par un certain degré de rigidité de la membrane cellulaire de ces cellules BV-2.



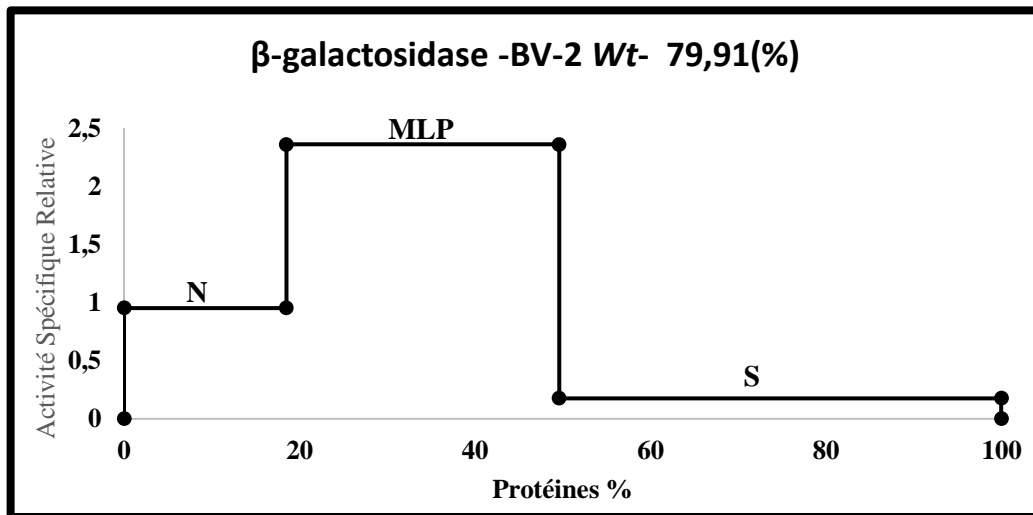
**Figure 38 :** L'activité spécifique relative de la  $\beta$ -galactosidase dans les fractions N, MLP et S des cellules BV-2 Wt après une homogénéisation avec 6 passages en Dounce. L'axe des abscisses exprime le pourcentage cumulé des protéines de différentes fractions obtenues par centrifugation différentielle. L'axe des ordonnées représente l'activité spécifique relative de chaque fraction en fonction l'activité totale dans l'homogénat.

La deuxième étape était d'utiliser un système d'homogénéisation « système de Blach » qui consiste à faire passer six fois la suspension cellulaire dans à travers des billes entre deux seringues. Les résultats obtenus confirment un niveau d'activité  $\beta$ - galactosidase similaire entre les deux fractions N et MLP comme le montre la figure 39 montrant une libération partielle du contenu lysosomal des cellules BV-2.



**Figure 39:**L'activité spécifique relative de la  $\beta$ -galactosidase dans les fractions N, MLP et S des cellules BV-2 Wt après une homogénéisation avec 6 passages avec « le système de Blach ». L'axe des abscisses exprime le pourcentage cumulé des protéines de différentes fractions obtenues par centrifugation différentielle. L'axe des ordonnées représente l'activité spécifique relative de chaque fraction en fonction l'activité totale dans l'homogénat.

La troisième étape de cette mise au point a consisté à augmenter le nombre de passage jusqu'à 20 fois dans le Dounce de la suspension cellulaire pour lyser plus les membranes plasmiques des cellules sans abîmer les organites cellulaires. Après fractionnement cellulaire, un dosage de l'activité  $\beta$ -galactosidase a été réalisé et qui montra une forte activité lysosomale dans la fraction MLP et donc meilleure distribution de organites dans ces fractions comme le montre la figure 40.



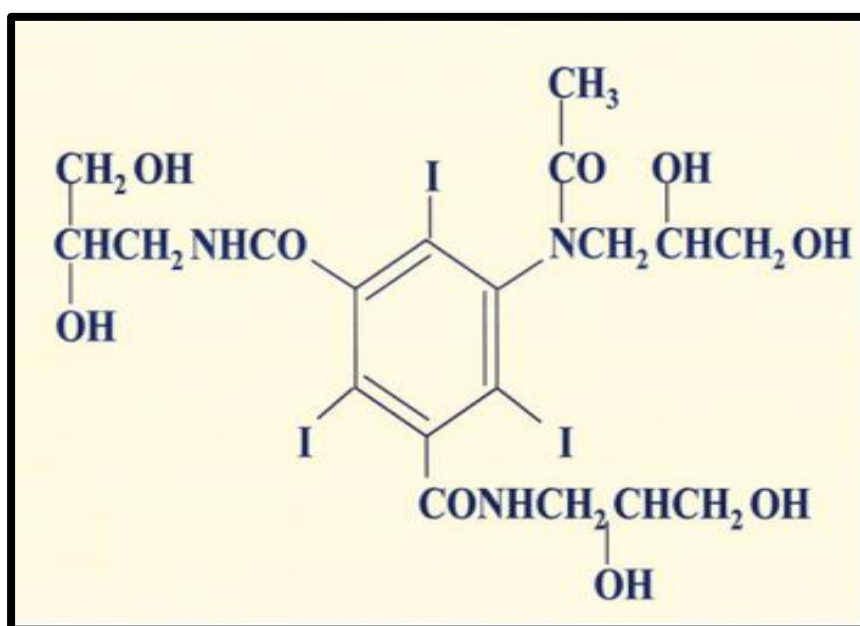
**Figure 40 :** L'activité spécifique relative de la  $\beta$ -galactosidase dans les fractions N, MLP et S des cellules BV-2 Wt après une homogénéisation avec 20 passages à la Dounce. L'axe des abscisses exprime le pourcentage cumulé des protéines de différentes fractions obtenues par centrifugation différentielle. L'axe des ordonnées représente l'activité spécifique relative de chaque fraction en fonction l'activité totale dans l'homogénat.

Suite aux résultats obtenus et en comparant les trois paramètres d'homogénéisation des cellules, nous avons choisi d'appliquer 20 passages en Dounce de la suspension cellulaire BV-2 pour assurer la lyse des membranes plasmiques sans abîmer les autres organites.

## D. Mesure de l'activité de la Catalase avec le $\text{KMnO}_4$

### 1. Introduction

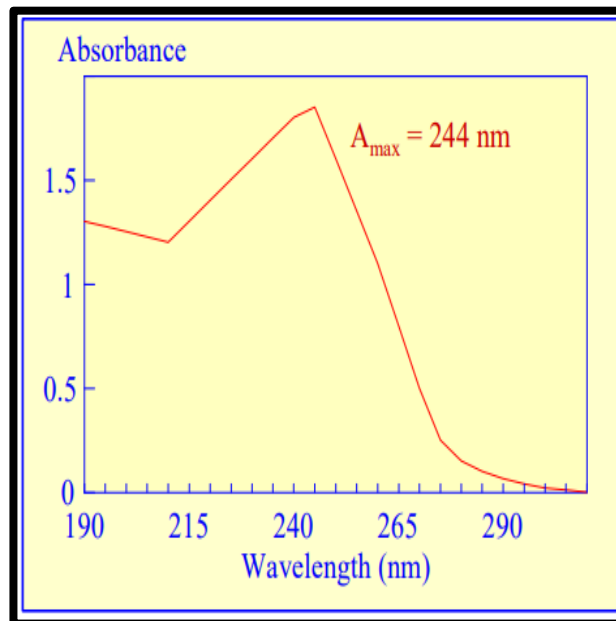
La solution Nycodenz est le nom commercial d'iohexol, dont le nom systématique est le 5-(N-2,3-dihydroxypropylacétamido)-2,4,6-tri-iodo-N-bis(2,3-dihydroxypropyl) isophthalamide. Il a un poids moléculaire de 821 (Figure 41).



**Figure 41:** Figure montrant la Structure de Nycodenz .  
le 5-(N-2,3-dihydroxypropylacétamido)-2,4,6-tri-iodo-N-bis(2,3-dihydroxypropyl) isophthalamide

Les propriétés chimiques et la stabilité de Nycodenz sont liées à sa structure. Sa haute densité provient de la présence d'un cycle triiodobenzène substitué lié à un certain nombre de groupes hydrophiles qui sont responsables de la forte hydro-solubilité de cette solution Nycodenz. C'est un dérivé non ionique de l'acide métrizoïque ; le groupe carboxyle présent dans l'acide métrizoïque est lié au groupe amine du 3-amino-1,2-propanediol. La chaîne latérale dihydroxypropylacétamido est responsable de la très faible toxicité de Nycodenz par rapport au métrizamide. Nycodenz a un point de fusion défini entre  $174$  et  $180^\circ \text{C}$ . Le noyau aromatique

iodé absorbe fortement dans la région ultraviolette du spectre avec une absorption maximale de 244 nm comme le montre la Figure 42.



*Figure 42: Figure montrant le spectre d'absorption de Nycodenz*

Pour cette raison, on ne peut pas mesurer l'activité de la catalase avec la méthode à 240 nm consistant à suivre la dégradation de  $\text{H}_2\text{O}_2$  par la catalase (méthode cinétique), en raison de l'absorption maximale de Nycodenz à cette longueur d'onde. De ce fait, c'était intéressant de trouver une nouvelle méthode de mesure de cette activité.

Cette partie répond à un besoin de description détaillée d'une méthode de mesure de l'activité totale de la catalase. Ainsi, il semble être généralement applicable à toute sorte d'extraits tissulaires et cellulaires.

Ce chapitre contient également une mise à jour de la technique courante de la mesure de l'activité de la catalase en mesurant  $\text{H}_2\text{O}_2$ , par titrage au permanganate de potassium par spectrophotométrie qui était largement utilisée dans les études antérieures publiées.

## 2. Mise au point de la méthode de détermination de l'activité Catalase

### a) Principe et méthode

L'activité enzymatique de la catalase est mesurée en suivant l'oxydation de  $\text{KMnO}_4$  par le  $\text{H}_2\text{O}_2$  par spectrophotométrie à 480 nm selon la réaction suivante :



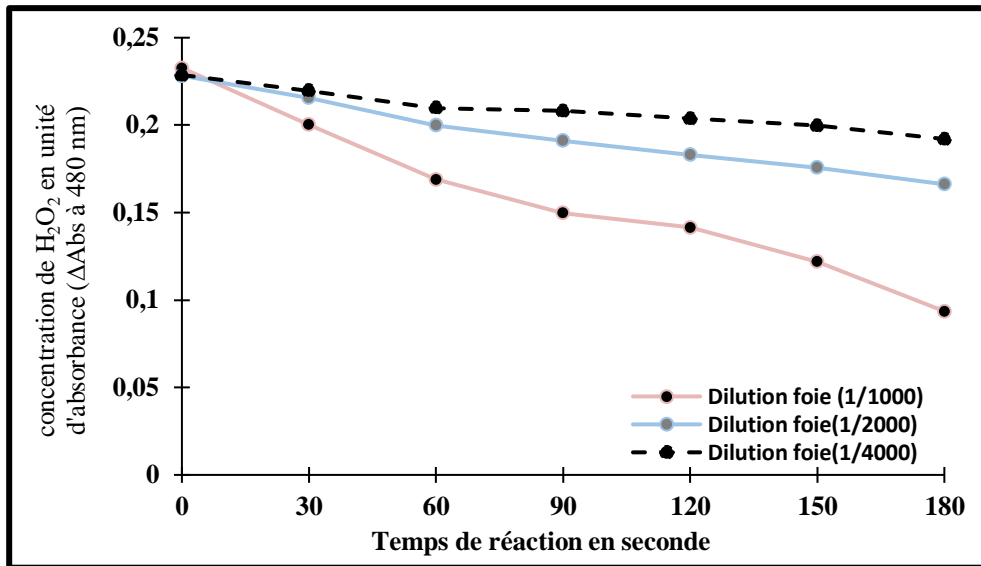
Figure 43: La réaction enzymatique de l'oxydation de  $\text{KMnO}_4$  par le  $\text{H}_2\text{O}_2$

Cette réaction a été suivie dans volume de 200  $\mu\text{l}$  contenant ainsi : 10  $\mu\text{l}$  du lysat cellulaire auquel 30  $\mu\text{l}$  de la solution fraîchement préparée de  $\text{H}_2\text{O}_2$  à 7,3 mM est ajoutée, le mélange est incubé 3 minutes (le temps de la réaction de la dégradation de  $\text{H}_2\text{O}_2$  par la catalase contenu dans le lysat cellulaire), la réaction est arrêtée avec 20  $\mu\text{l}$  de l'acide sulfurique  $\text{H}_2\text{SO}_4$  à 6 N. Ensuite, une solution de  $\text{KMnO}_4$  à 2 mM est préparée, placée dans l'injecteur de un spectrophotomètre à plaques (Fluorimètre/ luminomètre Infinite M200 pro TECAN) pour suivre l'oxydation de  $\text{KMnO}_4$  par le  $\text{H}_2\text{O}_2$  restant dans l'essai en raison de 140  $\mu\text{l}$  ajouté/puit. L'oxydation de  $\text{KMnO}_4$  est une réaction rapide. Cette réaction d'oxydation est inversement proportionnelle à l'activité de la catalase. L'absorbance est mesurée à un spectrophotomètre à plaques (Fluorimètre/ luminomètre Infinite M200 pro TECAN). Enfin, l'activité spécifique de la catalase est exprimée en  $\mu\text{M}$  d'  $\text{H}_2\text{O}_2$  consommé par minutes par mg de protéine.

### b) Vérification de la linéarité de la méthode

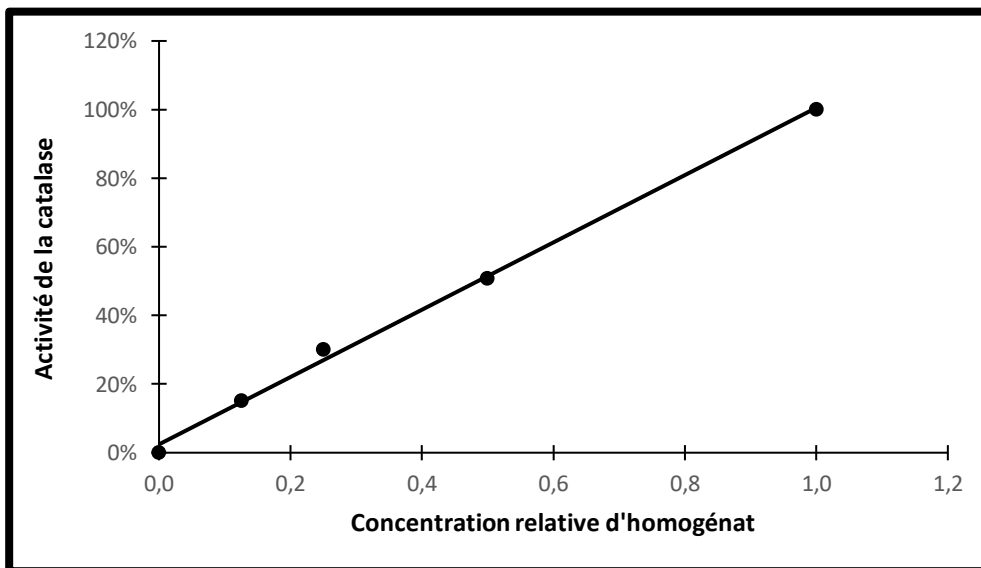
Afin de vérifier la linéarité du test, on a optimisé la méthode en testant des différentes dilutions d'un homogénat de foie de souris préalablement préparé dans un tampon phosphate à 0,1 M et pH 7,4 à différentes dilutions.

Les Figure 44 et Figure 45 montrent une cinétique linéaire mesurée durant 3 minutes de décomposition de  $\text{H}_2\text{O}_2$  par l'homogénat de foie de souris utilisé à trois différentes dilutions 1/1000, 1/2000 et 1/4000. Les valeurs du temps zéro ont été obtenu en inversant l'ordre d'addition de l'acide sulfurique et  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Nous avons évités les conditions de dosages dans lesquelles plus de 80% du  $\text{H}_2\text{O}_2$  était décomposé et ceci c'était le cas en utilisant des dilutions de l'ordre de 1/50, 1/100, 1/200 et 1/500.



**Figure 44:** Figure montrant la cinétique de la décomposition de  $H_2O_2$  par l'homogénat de foie de souris.

L'homogénat a été utilisé à trois différentes dilutions, les valeurs de du temps zéro ont été obtenu en inversant l'ordre d'addition du l'acide sulfurique et  $H_2O_2$ .

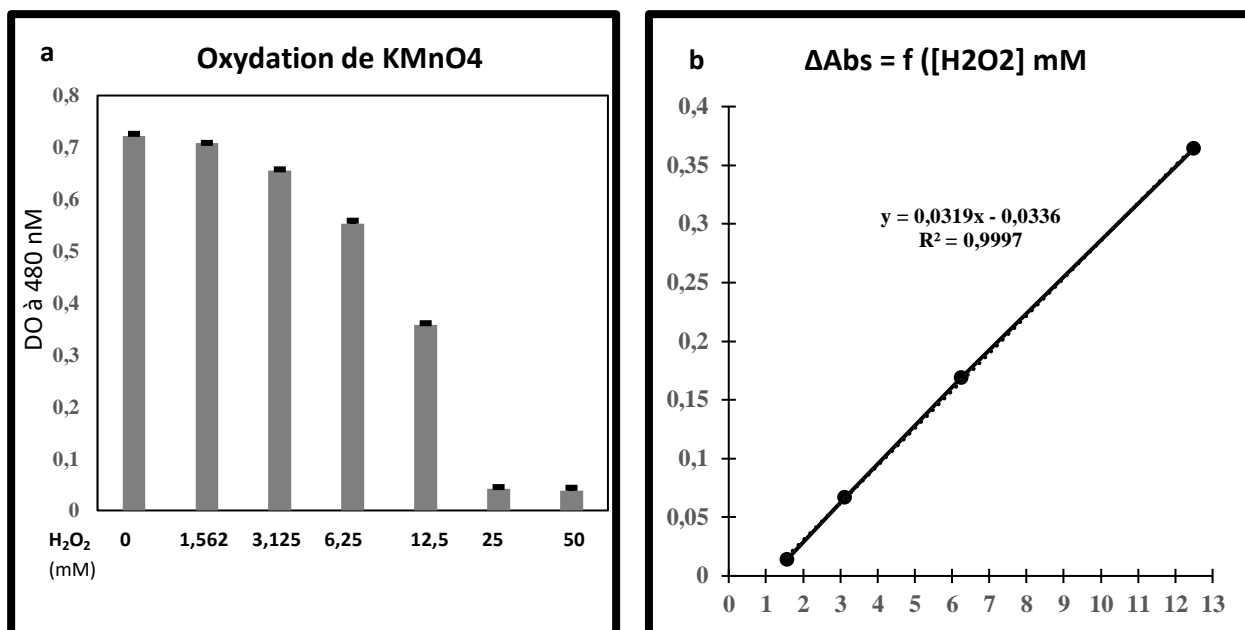


**Figure 45 :** Figure montrant la courbe dose-activité de la décomposition de  $H_2O_2$  par l'homogénat de foie de souris

Courbe concentration homogénats de foie de souris- activité catalase. Les points indiquent la gamme de dilution de l'homogénat de foie de souris. Les dilutions utilisés sont 1/500 (=1), 1/1000 (=0,5), 1/2000 (=0,25) et 1/4000 (=0,125).

Afin de vérifier et mettre au point toutes les conditions et les paramètres du test, nous avons vérifié la concentration de  $H_2O_2$  utilisée dans ce test pour cela nous avons réalisé un test en modifiant les différentes concentrations de  $H_2O_2$  allant de 0 à 50 mM et en utilisant une seule dilution de l'homogénat de foie à 1/2000. Les résultats de la Figure 46 montre que la concentration utilisée 6,25 mM est la bonne concentration car elle se trouve dans la zone linéaire de la courbe obtenue après ce test.

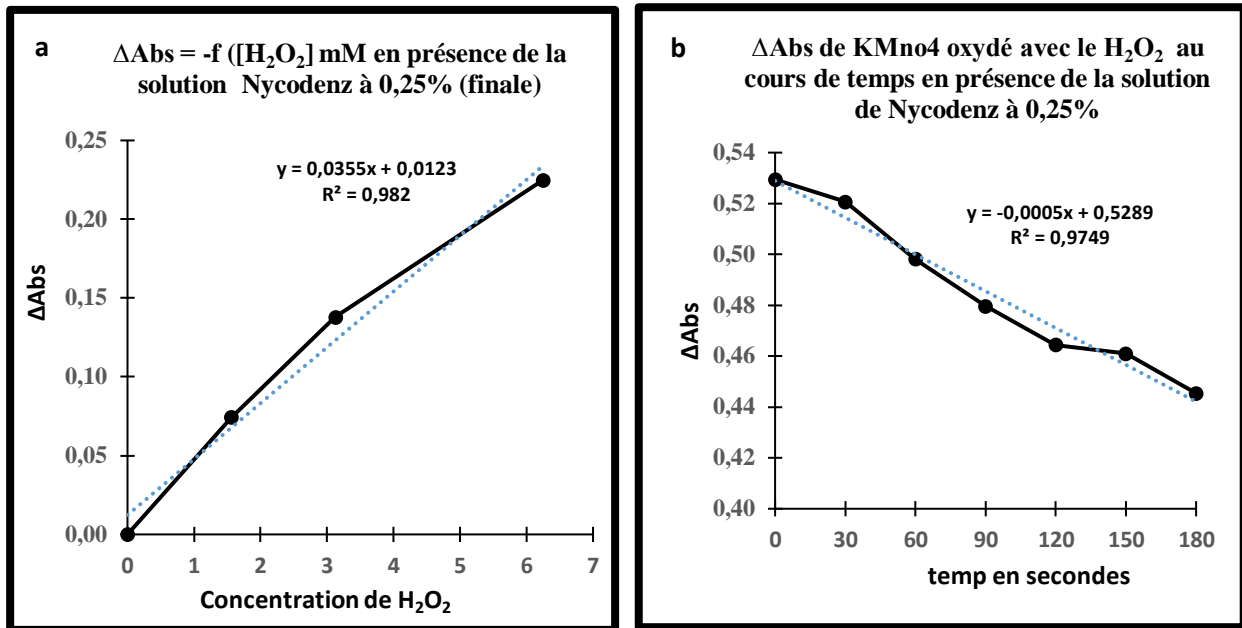




**Figure 46 : Figure montrant les taux d'oxydation de KMnO<sub>4</sub> par les différentes concentrations de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.**

En (a) les valeurs de DO obtenu à 480nm après l'oxydation de KMnO<sub>4</sub> en présence des différentes concentrations de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> restant à l'issue de la réaction. En (b) représentation graphique de la courbe montrant les niveaux d'oxydation de KMnO<sub>4</sub> oxydé par le H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> allant de 1,562 à 12,5 mM.

Après avoir vérifié les principaux paramètres du test, et validé la méthode, notre but est d'optimiser la méthode pour mesurer cette activité dans les fractions du gradient de Nycodenz. Nous avons réalisé le test en utilisant une solution de Nycodenz à 0.25% avec les différentes concentrations de la solution de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> allant de 0 à 50 mM, une dilution de l'homogénat de foie à 1/2000 et au cours de 3 minutes comme temps de réaction comme déjà décrit. Le but de cette manipulation est de vérifier si une interférence entre la solution de Nycodenz et le test de la mesure de l'activité de la catalase en mesurant l'oxydation de KMnO<sub>4</sub> aura lieu. Les résultats obtenus dans la figure 47 montrent qu'il n'y a pas d'interférence entre la solution de Nycodenz et les autres composantes du test et que le test à garder ses propriétés et linéarité au cours de la réaction.



**Figure 47 : Figure montrant les taux d'oxydation de  $KMnO_4$  par les différentes concentrations de  $H_2O_2$  en présence de la solution de Nycodenz à 0,25%.**

En (a) les valeurs de  $\Delta DO$  obtenu à 480nm après l'oxydation de  $KMnO_4$  en présence des différentes concentrations de  $H_2O_2$  allant de 0 à 6,25mM restant à l'issue de la réaction. En (b) représentation graphique de la courbe montrant les niveaux d'oxydation de  $KMnO_4$  oxydé par le  $H_2O_2$  pendant les 3 minutes de la réaction.

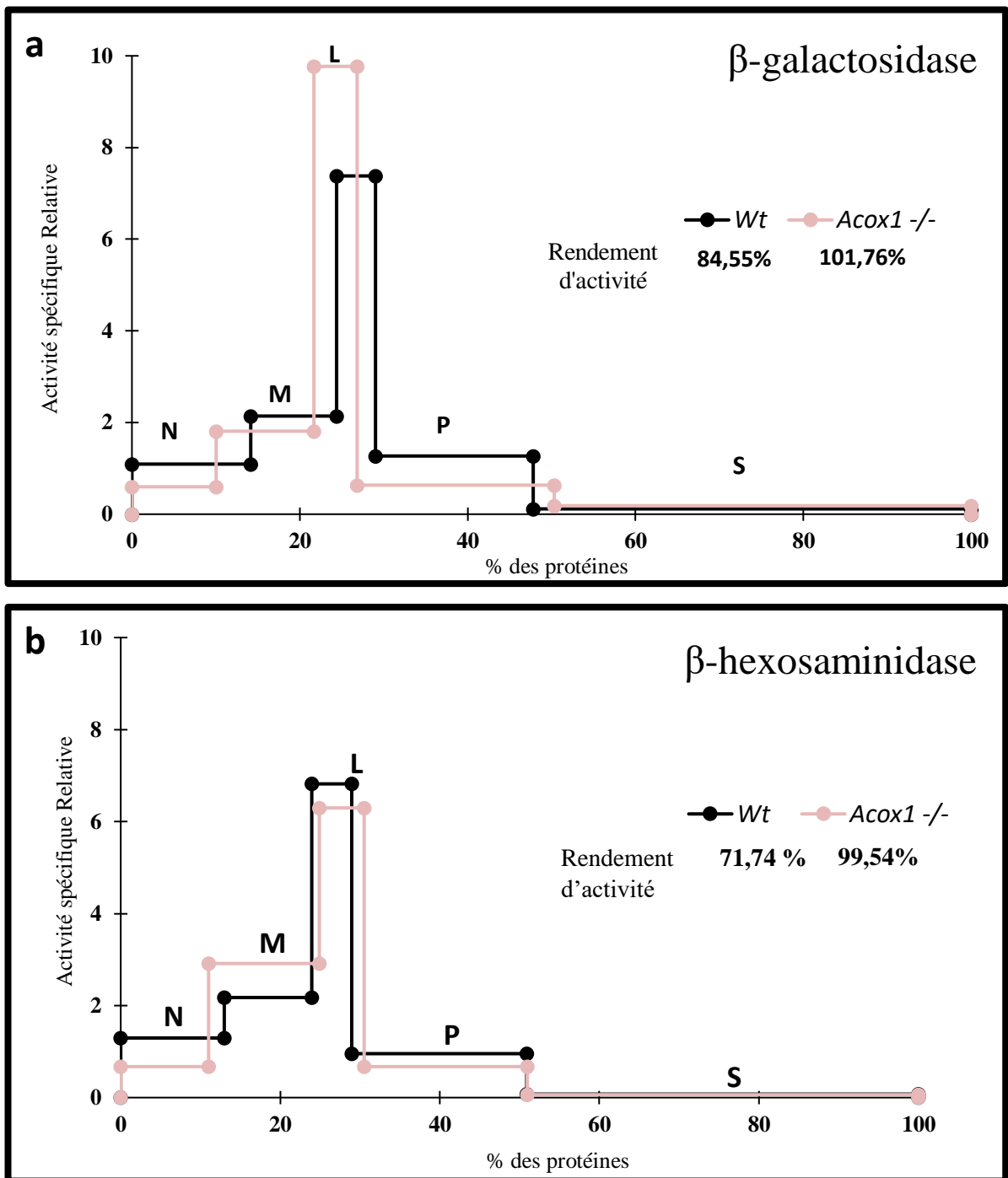
Cette technique de la mesure de l'activité de la catalase a été décrite pour la première fois par Goldblith et Proctor en 1950 (Goldblith & Proctor, 1950). Dans une revue publiée par Maehlyel et ses collaborateurs en 1954, a décrit un historique des différentes techniques et méthodes utilisées pour la mesure de l'activité de la catalase (Maehly & Chance, 1954). En conclusion de cette revue, Maehlyel a recommandé la mesure de cette activité en utilisant le  $KMnO_4$ . Nous avons mis au point cette technique pour qu'elle soit appliquée pour mesurer l'activité de la catalase dans tous les tissus et les cellules. Nos tests ont été réalisés en utilisant un homogénat de Foie de souris et les lysats des cellules de BV-2 et nous avons mis au point cette technique pour mesurer cette activité dans les fractions de Nycodenz.

## E. Déficience en ACOX1 et distribution d'organites subcellulaires dans les cellules BV-2

Pour mieux caractériser les cellules BV-2 sauvages (Wt) et les cellules BV-2 *Acox1*<sup>-/-</sup> (déficientes en ACOX1) et comprendre l'effet de cette déficience en ACOX1 sur le contenu cellulaire en peroxysomes, nous avons réalisé des expériences de fractionnement subcellulaire de deux types de cellules BV-2 *Wt* et BV-2 *Acox1*<sup>-/-</sup>. Ces travaux ont été réalisés au Laboratoire de Chimie Physiologique à L'Université de Namur. Connaissant les liens décrits dans la littérature entre déficience en ACOX1 et biogenèse du peroxysome, nous avons entrepris des expériences de fractionnement cellulaire de BV-2 pour comprendre l'existence ou non de modifications de la distribution après fractionnement des peroxysomes et des autres organites cellulaires dans chaque lignée BV-2. La distribution des organites cellulaires dans différentes fractions obtenues a été suivie grâce aux mesures des différentes activités des enzymes marqueurs caractéristiques de chaque organite.

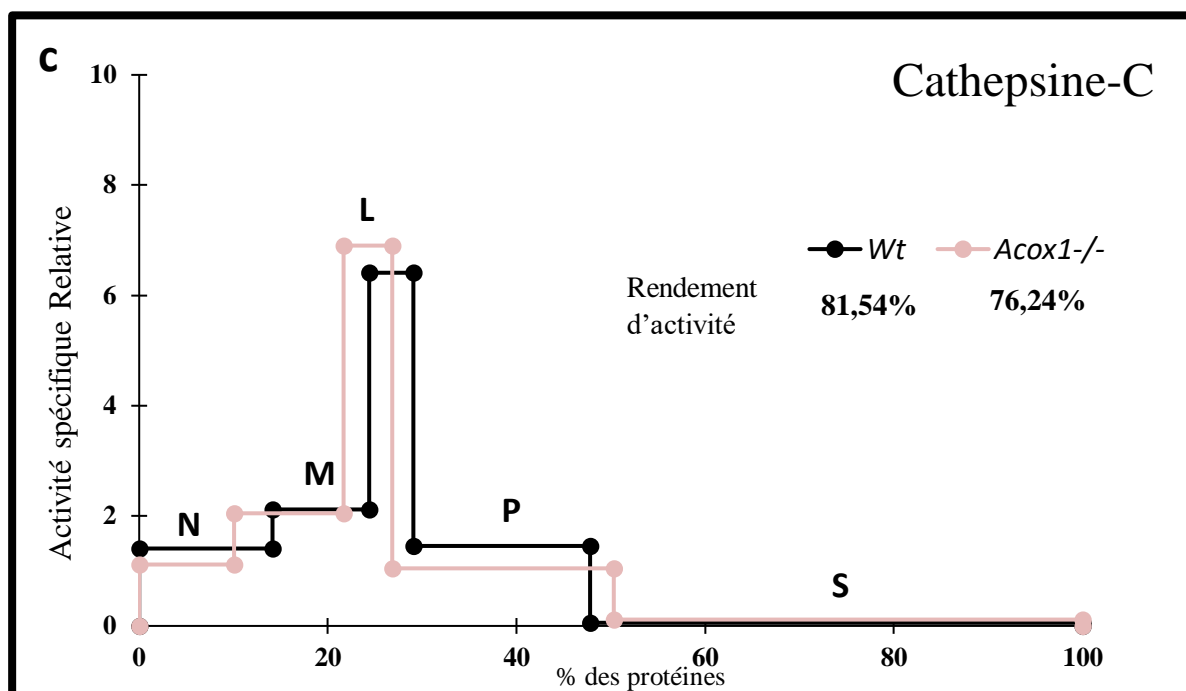
Le fractionnement des cellules BV-2 a été réalisé par centrifugation différentielle comme décrit dans le chapitre Matériel et Méthodes. Nous avons mesuré les activités spécifiques relatives des différentes enzymes marqueurs dans chaque fraction obtenue. L'aspect qualitatif de ce fractionnement a été estimé par l'activité spécifique relative qui nous renseigne sur le degré de pureté de chaque fraction (Figure 48). Elle indique le rapport de l'activité spécifique mesurée dans la fraction sur l'activité spécifique mesurée dans l'homogénat total. Les résultats présentés dans la figure 49 en fonction des enzymes marqueurs pour chaque organite montrent :

La mesure des activités d'enzymes marqueurs des lysosomes à savoir : la  $\beta$ -galactosidase, la  $\beta$ -hexosaminidase et la cathepsine-C montre une distribution homogène de ces trois activités dans la fraction L (dite de Mitochondries légères selon de Duve). Ceci indique un enrichissement en lysosomes dans cette fraction L. La distribution des activités lysosomales ne semble pas être perturbée par la déficience en ACOX1, même si l'activité spécifique relative de la  $\beta$ -galactosidase est plus importante dans la fraction L de BV-2 *Acox1*<sup>-/-</sup> par rapport aux BV-2 *Wt* (Figure 48a, b et Figure 50 c).



**Figure 48: distribution des différentes enzymes caractéristiques des organites cellulaires dans les cellules BV-2 Wt et Acox1-/- après fractionnement subcellulaire.**

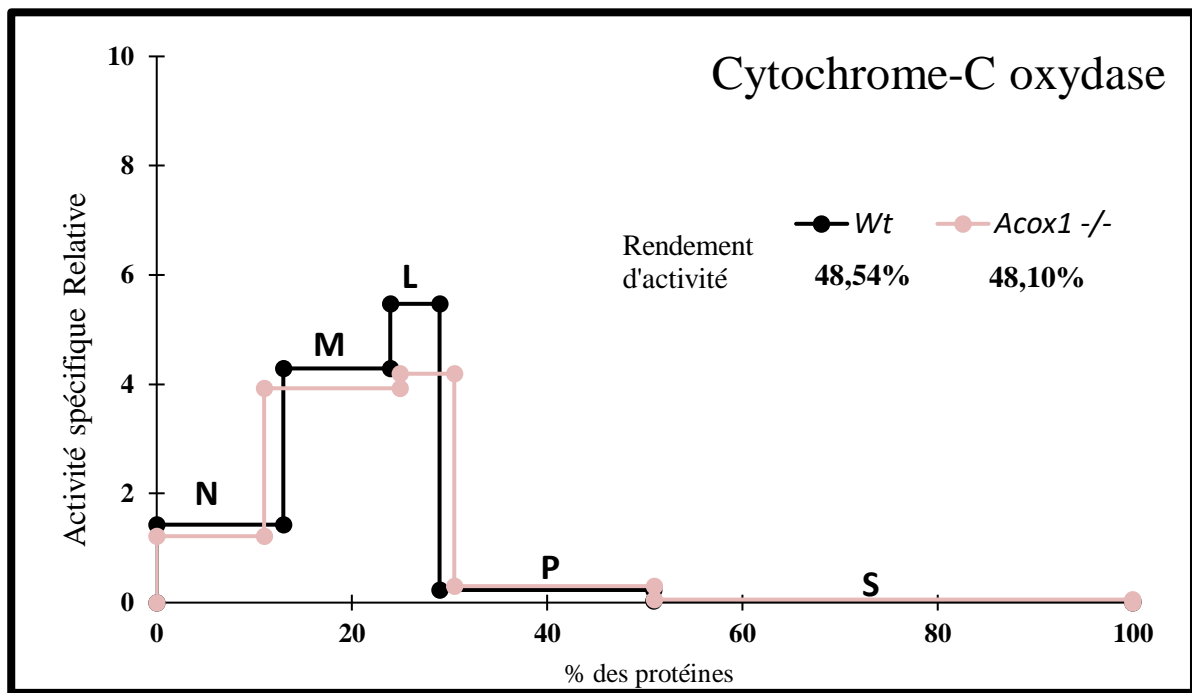
L'axe des abscisses exprime le pourcentage cumulé des protéines de différentes fractions obtenues par centrifugation différentielle. L'axe des ordonnées représente l'activité spécifique relative de chaque fraction en fonction l'activité totale dans l'homogénat. Les cellules BV-2 : Wt et Acox1-/- ont été homogénéisées dans du tampon saccharose à 250 mM isotonique glacé. Les homogénats cellulaires ont été soumis à une centrifugation différentielle pour obtenir les cinq fractions subcellulaires : N, M, L, P et S. Les différentes activités enzymatiques ont été dosées dans chaque fraction. Les graphiques représentent les activités spécifiques relatives en fonction des pourcentages cumulés des protéines (n = 6). Les enzymes marqueurs des lysosomes sont représentées en (a) la  $\beta$ -galactosidase et en (b) la  $\beta$ -hexosaminidase.



**Figure 49: distribution des différentes enzymes caractéristiques des organites cellulaires dans les cellules BV-2 Wt et Acox1-/- après fractionnement subcellulaire.**

L'axe des abscisses exprime le pourcentage cumulé des protéines de différentes fractions obtenues par centrifugation différentielle. L'axe des ordonnées représente l'activité spécifique relative de chaque fraction en fonction l'activité totale dans l'homogénat. Les cellules BV-2 : Wt et Acox1-/- ont été homogénéisées dans du tampon saccharose à 250 mM isotonique glacé. Les homogénats cellulaires ont été soumis à une centrifugation différentielle pour obtenir les cinq fractions subcellulaires : N, M, L, P et S. Les différentes activités enzymatiques ont été dosées dans chaque fraction. Les graphiques représentent les activités spécifiques relatives en fonction des pourcentages cumulés des protéines (n = 6). Les enzymes marqueurs des lysosomes sont représentées en (c) pour la Cathepsine-C.

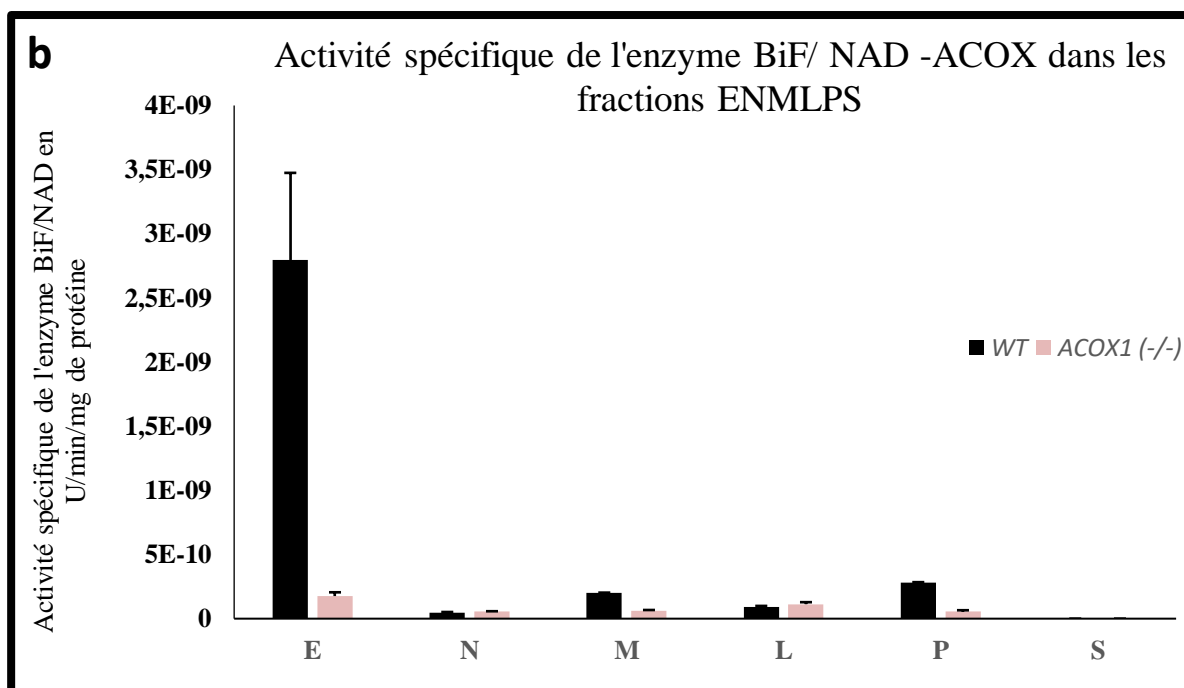
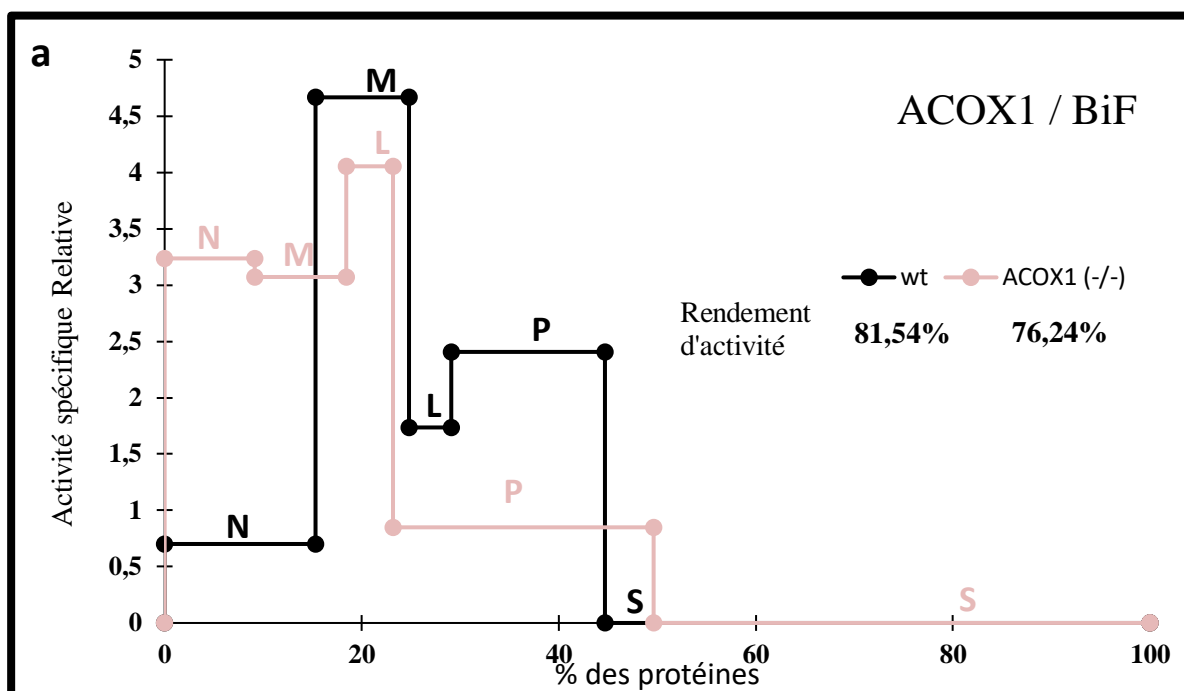
La cytochrome C oxydase est une enzyme marqueur des mitochondries, c'est une enzyme de la membrane interne mitochondriale. Le maximum d'activité est distribué entre les deux fractions L et M (mitochondries lourdes) comme étant successivement les deux fractions mitochondriales lourde et légère (Figure 50). La Déficience en ACOX1 se traduit par une diminution de l'activité relative cytochrome C oxydase plus marquée dans la fraction L que dans la fraction M.



**Figure 50: Distribution des différentes enzymes caractéristiques des organites cellulaires dans les cellules BV-2 Wt et Acox1<sup>-/-</sup> après fractionnement subcellulaire.**

L'axe des abscisses exprime le pourcentage cumulé des protéines de différentes fractions obtenues par centrifugation différentielle. L'axe des ordonnées représente l'activité spécifique relative de chaque fraction en fonction l'activité totale dans l'homogénat. Les cellules BV-2 : Wt et Acox1<sup>-/-</sup> ont été homogénéisées dans du tampon saccharose à 250 mM isotonique glacé. Les homogénats cellulaires ont été soumis à une centrifugation différentielle pour obtenir les cinq fractions subcellulaires : N, M, L, P et S. Les différentes activités enzymatiques ont été dosées dans chaque fraction. Les graphiques représentent les activités spécifiques relatives en fonction des pourcentages cumulés des protéines (n = 6). L'enzyme marqueur de la membrane mitochondriale : la cytochrome-C oxydase est en (d).

Concernant l'activité de l'enzyme ACOX1, nous avons mesuré l'activité spécifique relative dans chaque fractions ENMLPS des cellules BV-2 (Wt) et déficientes en ACOX1, afin de montrer la répartition de cette activité dans les différentes lignées. La Figure 51 a montré que cette activité est fortement mesurée dans les deux fractions M et P des cellules BV-2 Wt tandis que cette activité mesurée entre la fraction M et L dans les cellules déficientes en ACOX1. Cette activité est relative par rapport à l'activité totale mesurée dans la fraction E (Lysat totale). Le calcul de la mesure de l'activité spécifique dans chaque fraction montre une très faible activité d'oxydation dans les fractions ENMLPS des cellules BV-2 déficiente en ACOX1 par rapport aux cellules BV-2 contrôles. Cette activité présente le bruit de fond du test comme le montre la Figure 51 b.

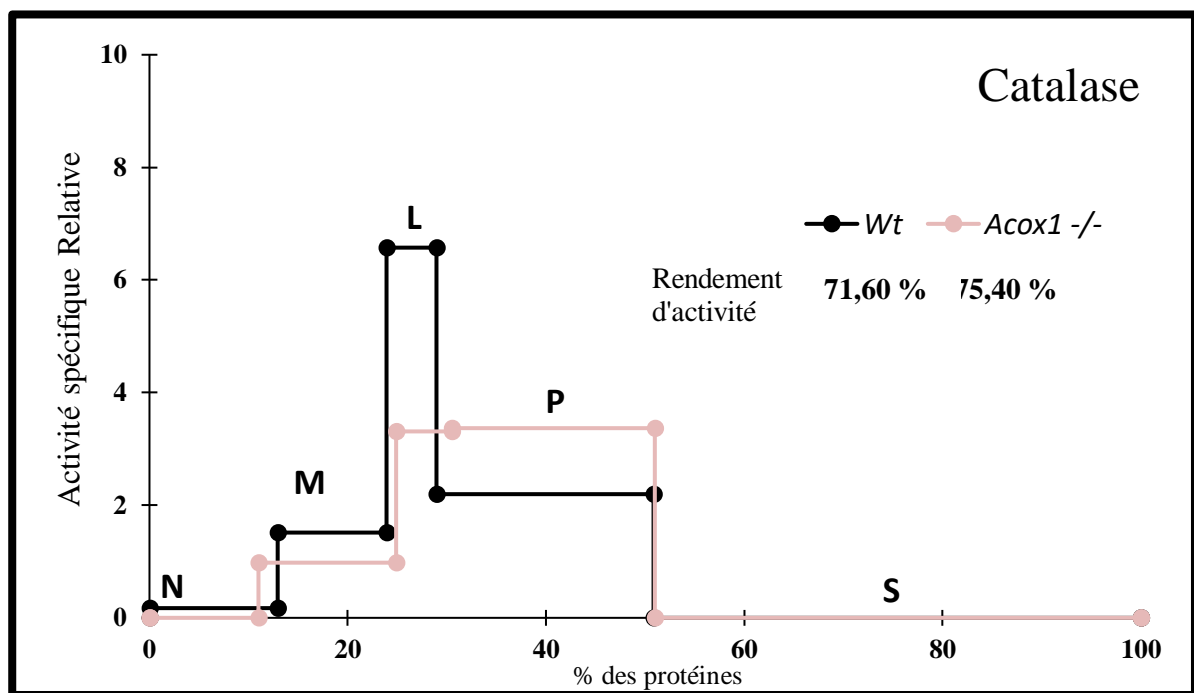


**Figure 51: Distribution des différentes enzymes caractéristiques des organites cellulaires dans les cellules BV-2 Wt et Acox1-/- après fractionnement subcellulaire.**

L'axe des abscisses exprime le pourcentage cumulé des protéines de différentes fractions obtenues par centrifugation différentielle. L'axe des ordonnées représente l'activité spécifique relative de chaque fraction en fonction l'activité totale dans l'homogénat. Les cellules BV-2 : Wt et Acox1-/- ont été homogénéisées dans du tampon saccharose à 250 mM isotonique glacé. Les homogénats cellulaires ont été soumis à une centrifugation différentielle pour obtenir les cinq fractions subcellulaires : N, M, L, P et S. Les différentes activités enzymatiques ont été dosées dans chaque fraction. Les graphiques représentent les activités spécifiques relatives en fonction des pourcentages cumulés des protéines (n = 6). L'activité spécifique relative de l'enzyme BiF/ ACOX1 dans les deux types cellules BV-2 représentées en (a) l'activité spécifique de cette enzyme est représenté en (b).



L'enzyme marqueur des peroxysomes, la catalase montre une distribution différente entre la lignée BV-2 *Acox1*<sup>-/-</sup> et la lignée BV-2 *Wt*. En effet, chez les BV-2 *Wt* l'activité catalase est distribuée entre les fractions M, L et P avec une forte activité dans la fraction L. Alors que dans les BV-2 *Acox1*<sup>-/-</sup>, la distribution de l'activité catalase est profondément modifiée : une diminution significative dans les fractions M et L et une augmentation dans la fraction P. Ce résultat suggérerait une modification de la taille et de la densité des peroxysomes les BV-2 *Acox1*<sup>-/-</sup> (Figure 52).



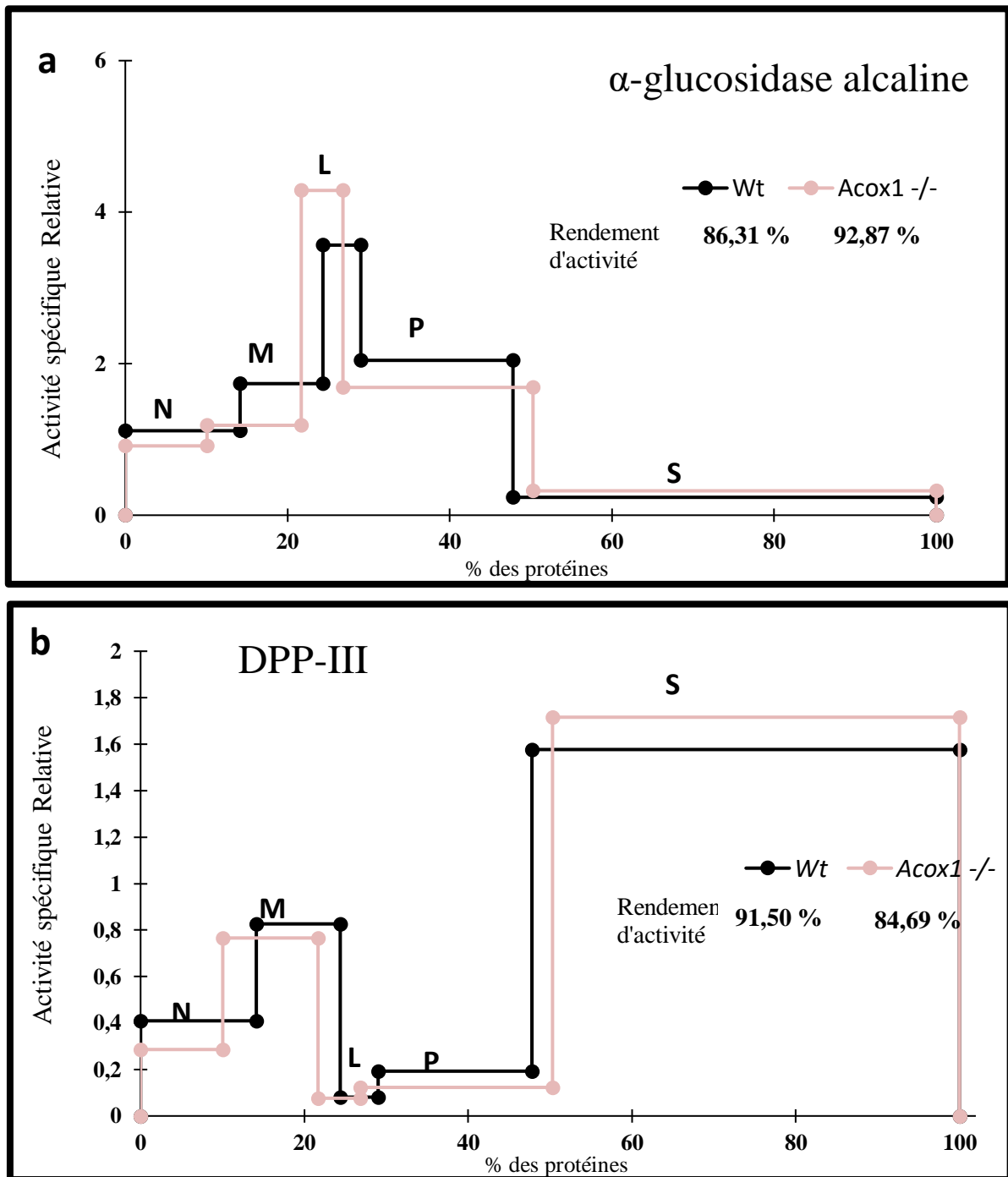
**Figure 52: Distribution des différentes enzymes caractéristiques des organites cellulaires dans les cellules BV-2 *Wt* et *Acox1*<sup>-/-</sup> après fractionnement subcellulaire.**

L'axe des abscisses exprime le pourcentage cumulé des protéines de différentes fractions obtenues par centrifugation différentielle. L'axe des ordonnées représente l'activité spécifique relative de chaque fraction en fonction l'activité totale dans l'homogénat. Les cellules BV-2 : *Wt* et *Acox1*<sup>-/-</sup> ont été homogénéisées dans du tampon saccharose à 250 mM isotonique glacé. Les homogénats cellulaires ont été soumis à une centrifugation différentielle pour obtenir les cinq fractions subcellulaires : N, M, L, P et S. Les différentes activités enzymatiques ont été dosées dans chaque fraction. Les graphiques représentent les activités spécifiques relatives en fonction des pourcentages cumulés des protéines (n = 6). Le graphique représente l'activité spécifique relative de la catalase.

La distribution de la fraction microsomiale a été suivie grâce à l'activité de l' $\alpha$ -glucosidase alcaline, enzyme marqueur du réticulum endoplasmique. La distribution est similaire dans les deux lignées BV-2 *Acox1*<sup>-/-</sup> et la lignée BV-2 *Wt* et les microsomes sont majoritairement retrouvés dans la fraction P avec une partie dans la fraction L. Ce qui montre que la fraction P est enrichie en microsomes parmi d'autres organites cellulaires (Figure 53a)

La dipeptidyl peptidase III (DPP-III) est l'enzyme marqueur du cytosol et son activité est majoritairement distribuée dans la fraction soluble S. L'activité retrouvée dans les autres fractions, principalement N et M, est vraisemblablement due au volume de surnageant gardé dans ces fractions au cours de la récupération des culots après centrifugation (Figure 53b).

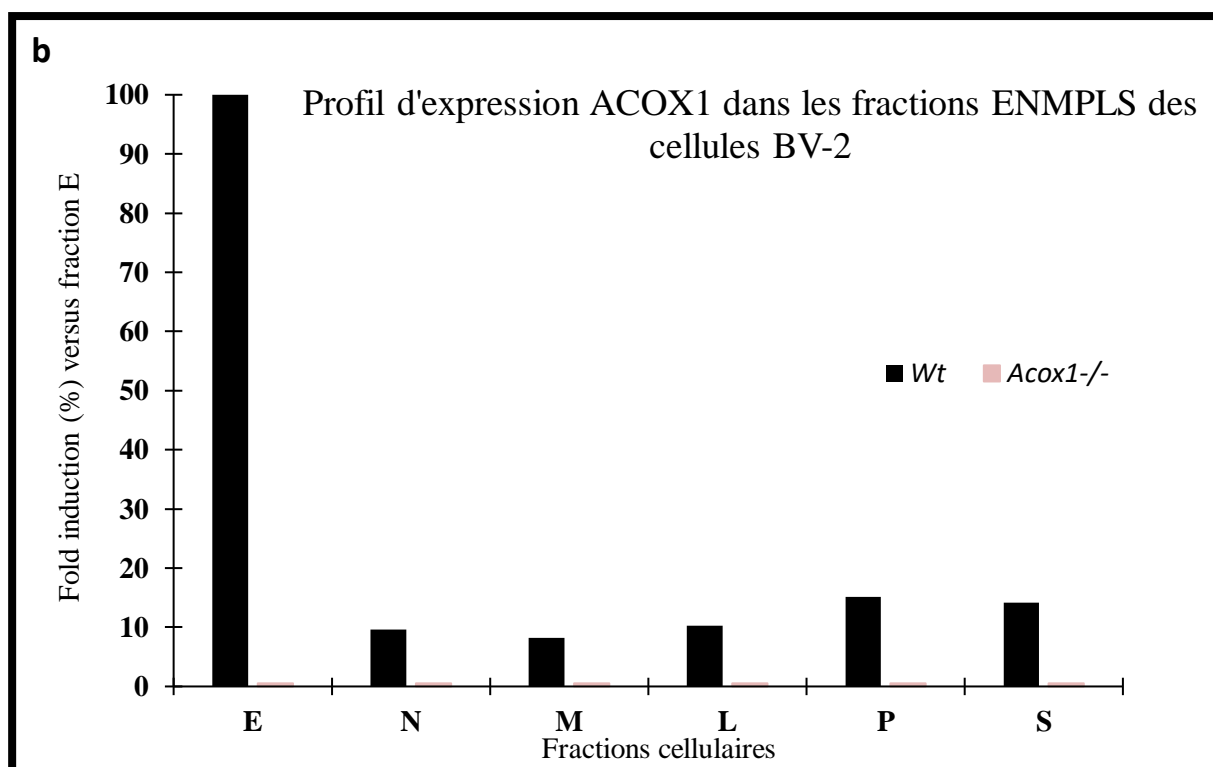
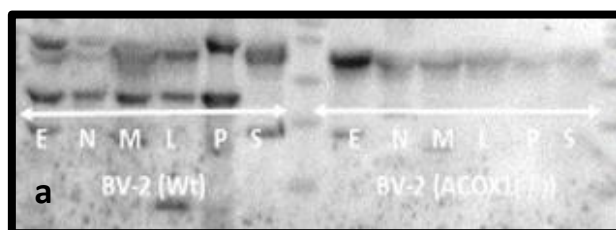
À la suite de cette analyse des activités spécifiques relatives et la distribution des différents organites cellulaires après fractionnement, nous avons choisi d'utiliser la fraction L en ultracentrifugation sur un gradient linéaire de Nycodenz. En effet, dans cette fraction L, l'activité catalase indique que les peroxyssomes ont été purifiés environ 7 fois dans les cellules BV-2 *Wt* et de 3,5 fois dans les cellules BV-2 *Acox1*<sup>-/-</sup>.



**Figure 53: Distribution des différentes enzymes caractéristiques des organites cellulaires dans les cellules BV-2 Wt et Acox1<sup>-/-</sup> après fractionnement subcellulaire.**

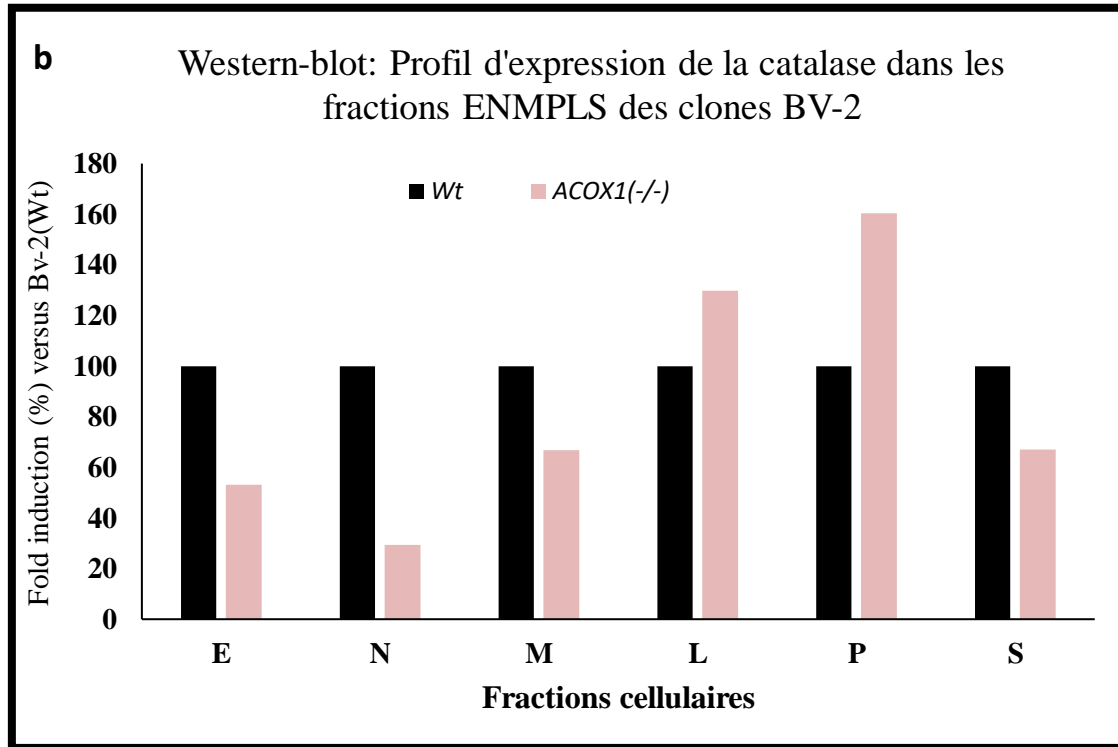
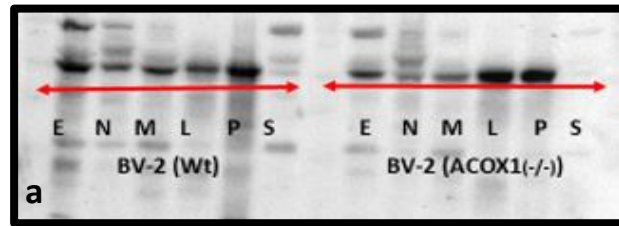
L'axe des abscisses exprime le pourcentage cumulé des protéines de différentes fractions obtenues par centrifugation différentielle. L'axe des ordonnées représente l'activité spécifique relative de chaque fraction en fonction l'activité totale dans l'homogénat. Les cellules BV-2 : Wt et Acox1<sup>-/-</sup> ont été homogénéisées dans du tampon saccharose à 250 mM isotonique glacé. Les homogénats cellulaires ont été soumis à une centrifugation différentielle pour obtenir les cinq fractions subcellulaires : N, M, L, P et S. Les différentes activités enzymatiques ont été dosées dans chaque fraction. Les graphiques représentent les activités spécifiques relatives en fonction des pourcentages cumulés des protéines (n = 6). En (a) l'activité de l' $\alpha$ -glucosidase alcaline enzyme de la fraction microsomiale et en (b) l'activité de la DPP-III enzyme marqueur de la fraction cytosolique.

À partir des fractions obtenues par centrifugation différentielle, nous avons analysé l'expression protéique de la catalase et de l'ACOX1 par western blotting. Le profil d'expression de la catalase dans les fractions ENMLPS des cellules BV-2 est présenté dans la figure 54 et la figure 55. Ce profil montre qu'aussi bien l'ACOX1 (bande à 50 kDa ; figure 54 a ) que la catalase (bande à 66 kDa, Figure 55 a) sont détectées dans toutes les fractions N, M, L, P et S obtenues à partir des cellules BV-2 Wt et elles sont particulièrement exprimées dans les fractions L et P. Dans les fractions obtenues à partir de l'homogénat des cellules BV-2 Acox1<sup>-/-</sup>, nous observons l'absence de l'expression d'ACOX1 dans toutes ces fractions testées. Ceci atteste que la déficience de l'activité ACOX1 est liée à l'absence d'expression de la protéine dans la lignée BV-2 Acox1<sup>-/-</sup>.



**Figure 54: La distribution de la protéine ACOX1 dans les cellules BV-2 Wt et Acox1<sup>-/-</sup> après le fractionnement subcellulaire complet.**

Les cellules BV-2 Wt et Acox1<sup>-/-</sup> ont été homogénéisées dans du tampon sucrose 250 mM et soumise à une ultracentrifugation. L'ACOX1 a été détectées par western-blot après séparation en PAGE-SDS et électrotransfert sur des membranes PVDF. L'immunodéttection a été réalisée à l'aide des anticorps primaires (anti ACOX1) et secondaires conjugués à la HRP. 50 µg de chaque fraction ont été utilisés pour la PAGE-SDS. Les résultats de la densitométrie obtenus sont analysés sur Chemidoc par rapport au lysat total des deux cellules BV-2. En (a) (b) bande correspondant à ACOX1 et en (b) les profils de niveau d'expression de cette protéine.



**Figure 55: La distribution de la protéine Catalase dans les cellules BV-2 Wt et Acox1 -/- après le fractionnement subcellulaire complet.**

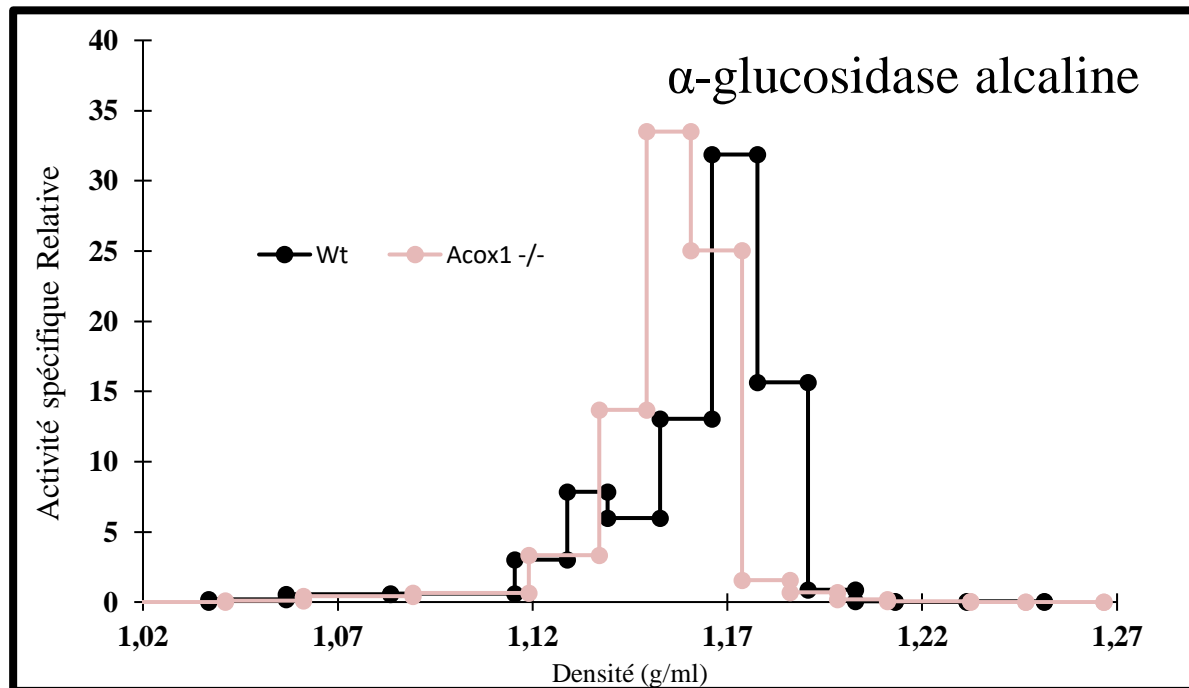
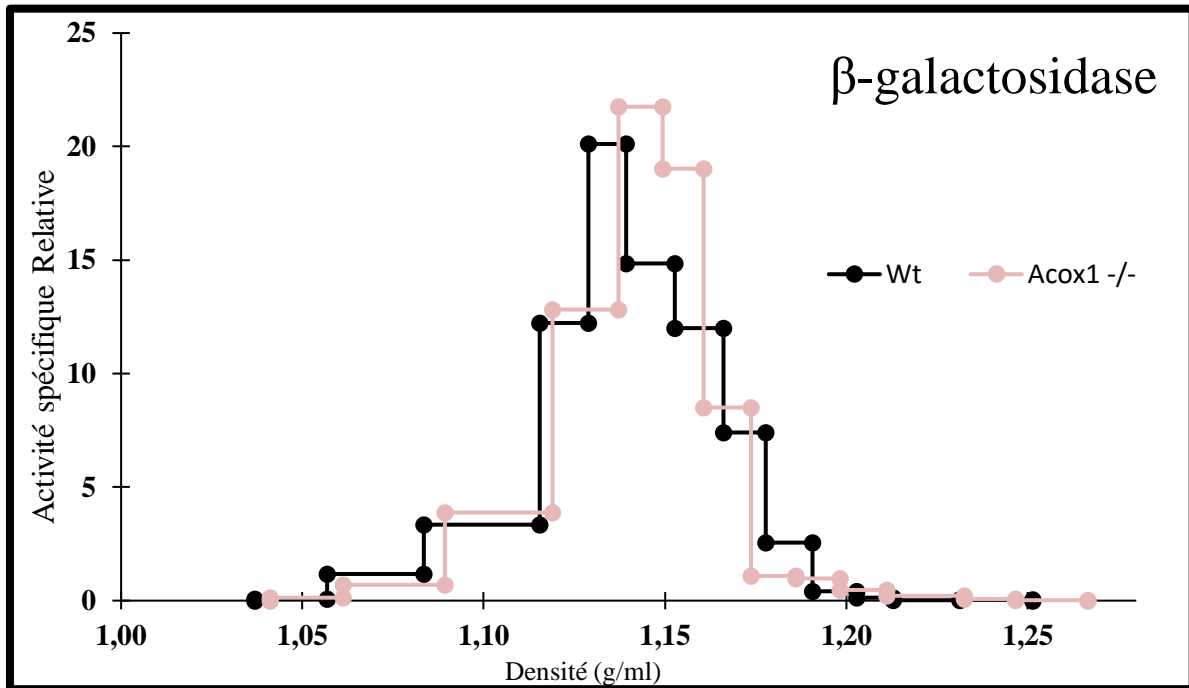
Les cellules BV-2 Wt et Acox1 -/- ont été homogénéisées dans du tampon sucrose 250 mM et soumise à une ultracentrifugation. La catalase a été détectée par western-blot après séparation en PAGE-SDS et électrotransfert sur des membranes PVDF. L'immunodétéction a été réalisée à l'aide des anticorps primaires (anti catalase) et secondaires conjugués à la HRP. 50 µg de chaque fraction ont été utilisée pour la PAGE-SDS. Les résultats de la densitométrie obtenus sont analysés sur Chemidoc par rapport au lysat total des deux cellules BV-2. En (a) bande correspondant à catalase et en (b) les profils de niveau d'expression de cette protéine.

La distribution des enzymes marqueurs dans les 13 fractions, après ultracentrifugation d'une fraction L des cellules BV-2 *Wt* ou *Acox1*<sup>-/-</sup> sur un gradient linéaire de Nycodenz (réalisé à partir de deux solutions de Nycodenz ayant respectivement des densités de 1,07 et 1,28 g/ml) est représenté dans les Figure 56, Figure 57 et Figure 58.

D'après la répartition de chaque type de particules en fonction de la densité, l'activité catalase indique que les peroxysomes migrent au cours de la centrifugation vers les régions les plus denses du gradient de Nycodenz et se retrouve répartie entre les fractions 7 à 12 (1,1607 et 1,2194 g/ml) dans les cellules BV-2 *Wt* avec une forte activité les fractions 8 et 9 (1,1801 et 1,1928 g/ml).

La mesure de l'activité déshydrogénase de l'enzyme bifonctionnelle montre que la répartition des peroxysomes est plus restreinte aux fractions 8 à 10 avec une densité allant de 1,1720 à 1,1980 g/ml. Dans les cellules BV-2 *Acox1*<sup>-/-</sup>, la répartition de l'activité catalase, et donc des peroxysomes, se trouve plus centrée sur les fractions 7 et 8 (1,1672 à 1,1801 g/ml) et la mesure de l'activité de l'enzyme bifonctionnelle confirme l'absence de l'activité ACOX1 dans les cellules BV-2 *Acox1*<sup>-/-</sup> et donc de la déficience ACOX1 dans cette lignée. En se basant sur l'activité catalase, nous observons un déplacement de la densité d'équilibre de la fraction peroxysomale dans le gradient Nycodenz indiquant des particules moins denses et probablement de plus petite taille en tenant compte également des résultats de centrifugation différentielle.

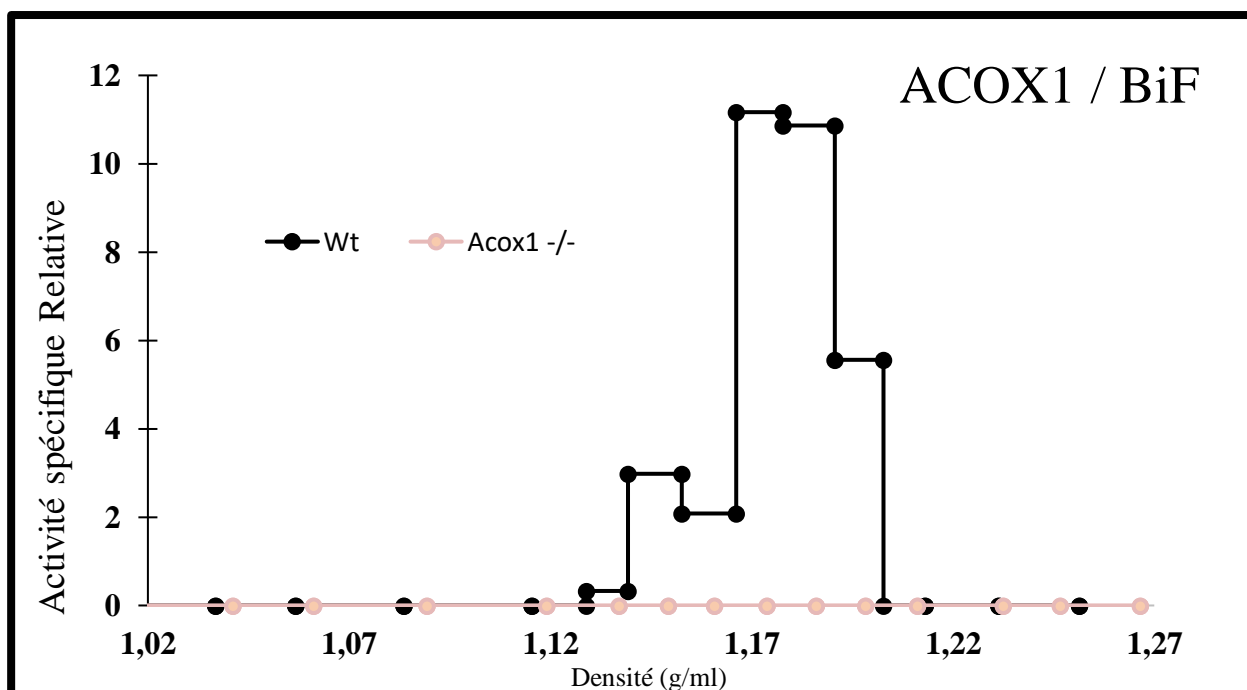
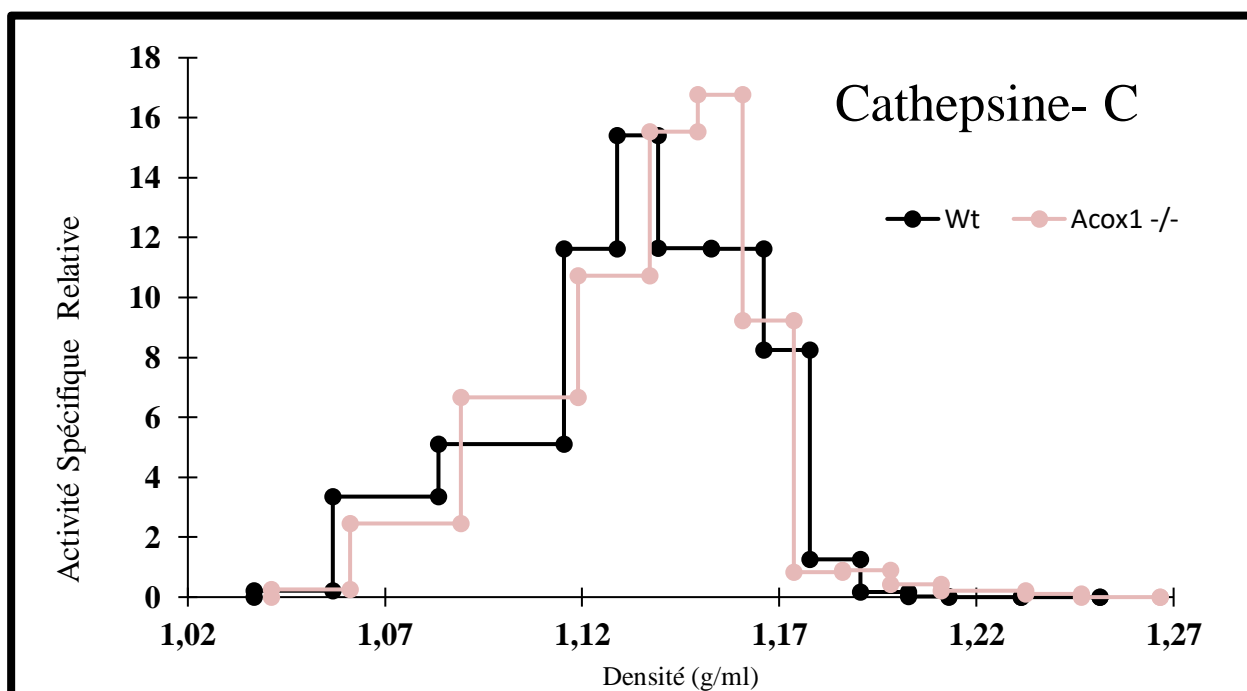
Concernant les cellules BV-2 *Wt*, les activités lysosomales  $\beta$ -galactosidase et cathepsine C montrent une répartition dans le gradient Nycodenz dans les fractions 4 à 8 pour la  $\beta$ -galactosidase et 3 à 8 pour la cathepsine C avec des maximums centrés sur les fractions 5 à 7 pour ces deux activités à un intervalle de densité entre 1,1331 et 1,1607 g/ml. Ceci indiquerait que les lysosomes se retrouvent principalement dans les fractions 4 à 7. La répartition des lysosomes dans le gradient Nycodenz, à partir de la fraction de «L» préparée des BV-2 *Acox1*<sup>-/-</sup>, montre un déplacement des activités lysosomales ( $\beta$ -galactosidase et cathepsine C) vers des densités d'équilibre plus grande 1,1445 à 1,1672 g/ml. Ceci suggérerait que la déficience en ACOX1 se traduit par une modification du contenu lysosomal influençant son comportement isopycnique.



**Figure 56: Distribution des enzymes dans la fraction L après la centrifugation dans le gradient de densité différentielle de Nycodenz.**

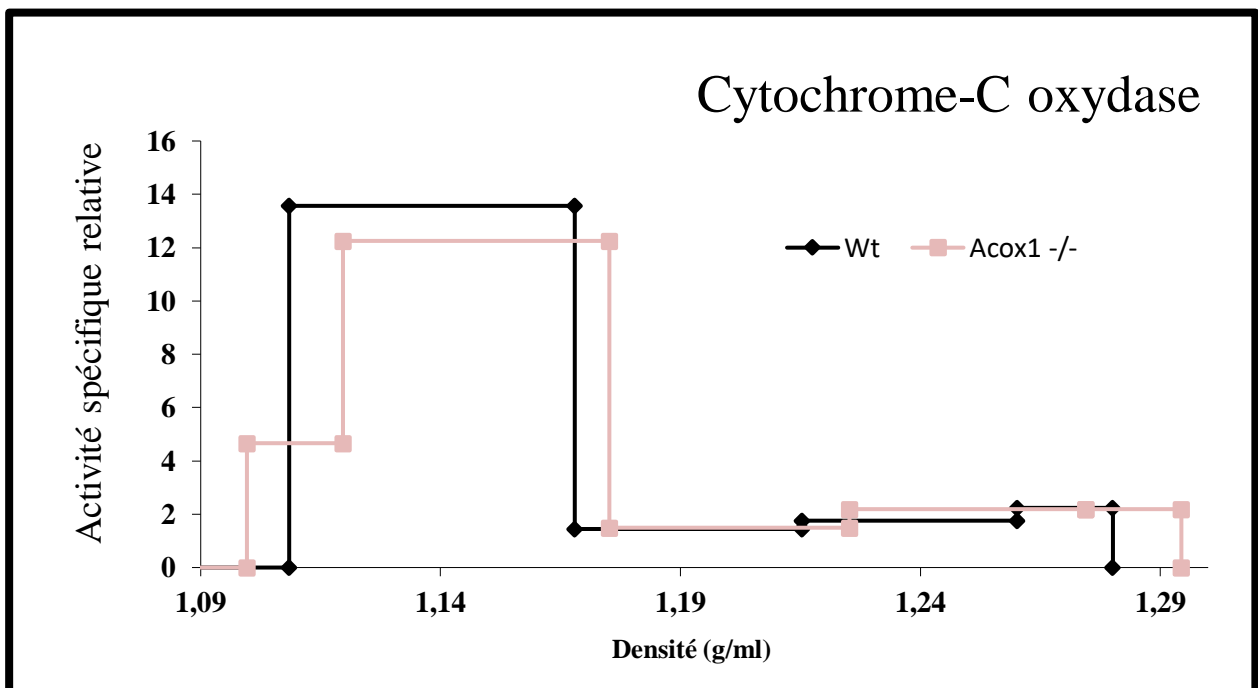
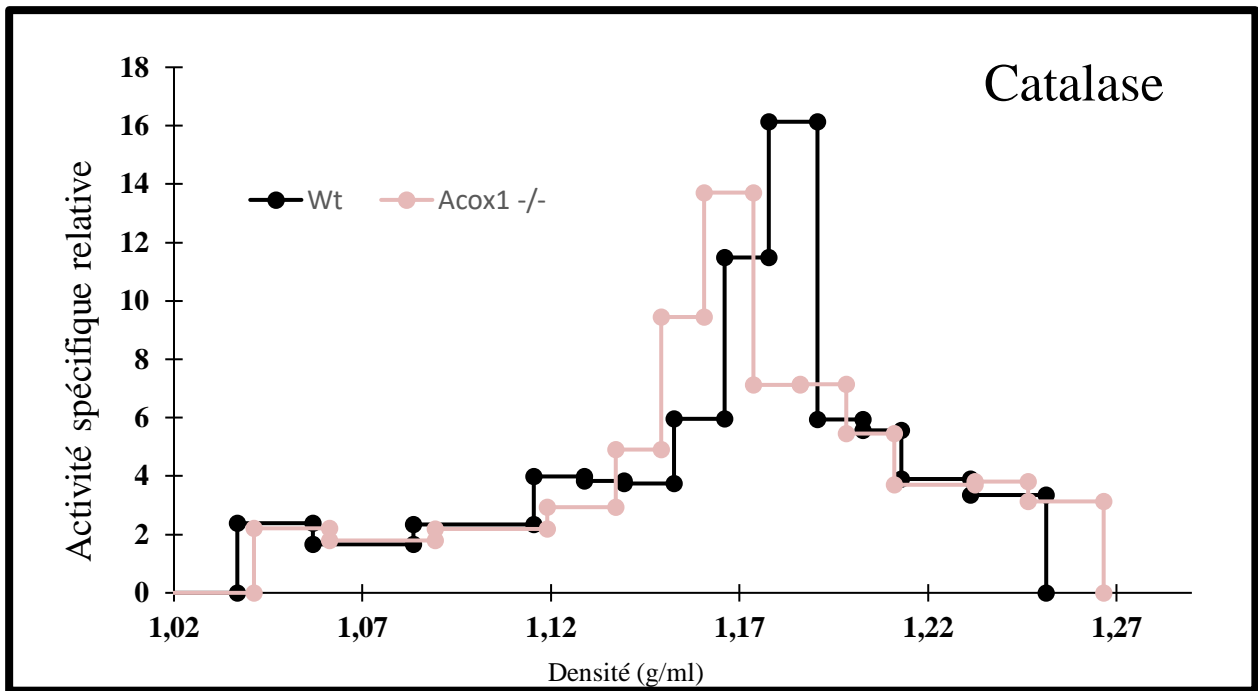
La fraction L obtenue après le fractionnement complet des cellules BV-2 : Wt et ACOX1 (-/-) a été déposée sur un gradient de Nycodenz isotonique allant de 1,03 à 1,28 g/ml et centrifugé à 39000g pendant 2h30. 13 fractions ont été recueillies. Ainsi, les activités de la β-galactosidase en (a), α-glucosidase alcaline en (b) ont été mesurées. Les lignes en rose et en noir correspondent aux BV-2 Wt ACOX1 (-/-) respectivement.





**Figure 57: Distribution des enzymes dans la fraction L après la centrifugation dans le gradient de densité différentielle de Nycodenz.**

La fraction L obtenue après le fractionnement complet des cellules BV-2 : Wt et ACOX1 (-/-) a été déposée sur un gradient de Nycodenz isotonique allant de 1,03 à 1,28 g/ml et centrifugé à 39000g pendant 2h30. 13 fractions ont été recueillies. Ainsi, les activités de la Cathepsine-C en (a), ACOX1/ BiF en (b) ont été mesurées. Les lignes en rose et en noir correspondent aux BV-2 Wt ACOX1 (-/-) respectivement.



**Figure 58: Distribution des enzymes dans la fraction L après la centrifugation dans le gradient de densité différentielle de Nycodenz.**

La fraction L obtenue après le fractionnement complet des cellules BV-2 : Wt et ACOX1 (-/-) a été déposée sur un gradient de Nycodenz isotonique allant de 1,03 à 1,28 g/ml et centrifugé à 39000g pendant 2h30. 13 fractions ont été recueillies. Ainsi, les activités de la catalase en (a), Cytochrome-C oxydase en (d) ont été mesurées. Les lignes en rose et en noir correspondent aux BV-2 Wt ACOX1 (-/-) respectivement. La mesure de l'activité de la cytochrome -C oxydase a été réalisé sur un gradient de Nycodenz coupé uniquement en 5 fractions au contraire des autres activités qui ont été mesurer sur un gradient de 13 fractions.

# *Discussion Générale*

---

## V. Discussion

Les peroxysomes sont des organites multifonctionnels hautement dynamiques dans les cellules eucaryotes de toutes les espèces y compris chez l'homme. Ils assurent ainsi plusieurs fonctions et contribuent à plusieurs voies cellulaires anaboliques et cataboliques, ce qui les rend essentielles pour la santé et le développement chez les mammifères. L'une des caractéristiques remarquables des peroxysomes est leur capacité à réagir aux différents stimuli cellulaires et/ou environnementaux en modifiant toutes les propriétés qui les caractérisent à savoir : leur biogenèse, leur morphologie, leur nombre, leur composition en protéines et leur activité métabolique. La majorité des connaissances actuelles sur ces organites cellulaires et leurs rôles physiologiques proviennent des différentes études sur les maladies génétiques et neurodégénératives provoquées par un dysfonctionnement de peroxysomes, ou bien par une déficience de l'un des enzymes qui les contiennent.

La composition et la structure cellulaire des peroxysomes sont simple mais les fonctions qui les assurent sont complexes et restent encore à étudier malgré plusieurs décennies des recherches sur cet organite cellulaire. En effet, les peroxysomes contiennent plus de 60 protéines qui remplissent diverses fonctions biologiques et qui rendent le peroxysome un organite indispensable à la synthèse des acides biliaires et des phospholipides membranaires, à la synthèse du cholestérol, à la dégradation de l'acide urique, à l'oxydation des acides gras et métabolisme du peroxyde d'hydrogène. Ces deux dernières fonctions étant les plus conservées chez tous les organismes des levures à l'homme.

Les peroxysomes contiennent un ensemble d'oxydases génératrices de  $H_2O_2$ , telles que l'acyl-CoA oxydase1 et l'urate oxydase responsables d'environ 20% de la consommation d'oxygène dans le foie, mais également une batterie complexe de défenses antioxydantes impliquées dans la régulation de l'accumulation de  $H_2O_2$  et de radicaux superoxydes et évitant leur toxicité pour la cellule. Les deux enzymes capitales des peroxysomes sont l'acyl-CoA oxydase 1 et la catalase. La première est l'enzyme clé d'une voie métabolique importante, la  $\beta$ -oxydation des AGTLC, et la deuxième enzyme est l'enzyme qui intervient dans la dégradation du peroxyde d'hydrogène. Une déficience de la première provoque une accumulation des AGTLC au niveau plasmatique, une démyélinisation et une neuro-inflammation qui sont les caractéristiques majeures de l'une des maladies peroxysomales, la P-NALD. Ainsi, une déficience en activité catalase provoque un stress oxydant suite à une accumulation des ROS, un résultat conséquent qui peut être lié à la déficience en ACOX1.

Des études ont été réalisées chez les souris *Acox1*<sup>-/-</sup> ont montré que les souris ont développé une hépatomégalie avec une stéatose hépatique sévère. Elles présentent aussi une augmentation du taux de peroxyde d'hydrogène au niveau hépatique avec une forte prolifération des peroxysomes, et une augmentation dans la production des cytokines et macrophages montrant la stimulation du système inflammatoire ce qui mène à la fin au développement d'un hépatocarcinome suite à l'activation soutenue du PPAR $\alpha$ . D'autres études ont montré que la déficience en ACOX1 entraîne chez le modèle murin *Acox1*<sup>-/-</sup> des importants changements au niveau hépatique notamment une stéatose inflammatoire par l'activation des gènes régulés par PPAR. Cette déficience induit également un stress du RE dû à l'accumulation des AGTLC et une perturbation dans la voie de l'oxydation des acides gras responsable de ce stress.

Dans le cadre de la caractérisation des effets bénéfiques pour la santé de substances issues de cactus, nous avons réalisé une étude *in vivo* chez la souris. Cette étude portait sur le rôle protecteur des substances naturelles dans la régulation du stress oxydatif et du processus inflammatoire induit par les LPS chez la souris. Nous avons essayé de mettre en évidence l'effet protecteur des différentes substances naturelles à savoir l'huile de graine de cactus, les poudres de la raquette et de la graine cactus contre le stress oxydatif induit par les LPS. Au cours de ce traitement, nous avons utilisé d'autres substances naturelles comme les huiles d'olive et d'argan dont certains effets sont déjà bien connus. Les souris ont reçu une alimentation mixée soit avec de la poudre de graine de cactus ; soit avec de l'huile pendant 25 jours. Malheureusement, à cause d'un mauvais fonctionnement de congélateur, les résultats obtenus à partir de ces échantillons se sont révélés inexploitable.

Cependant, le rôle protecteur des extraits de cactus a été étudié *in cellulo* grâce au modèle de cellules microgliales BV-2. Ces résultats ont été présentés dans le chapitre 3. L'exploration du potentiel préventif des extraits issus de la cladode de cactus. a montré que ces extraits empêchent la diminution de l'activité de la catalase dans les cellules activées avec les LPS. Cette étude a montré également un fort effet préventif sur la production de NO par le LPS dans les cellules BV-2. Durant nos études, nous avons montré que les extraits de la cladode d'*Opuntia ficus indica* révèlent une grande capacité antioxydante et anti-inflammatoire dans la modulation de l'activité de la catalase peroxysomale et des propriétés anti-inflammatoire. Nous avons également pu montrer un effet différentiel en fonction de la structure du LPS utilisé sur les activités peroxysomales, en particulier sur la catalase et l'ACOX1. Le mécanisme lié à cette régulation différentielles reste inconnu. Cependant, les résultats rapportés dans la littérature au niveau hépatique pointent le rôle des cellules de Kupffer (des macrophages hépatiques

résidents) dans la réponse du foie vis-à-vis du LPS par la réduction de l'activité ACOX1. La diminution de cette activité dans les cellules microgliales et sa répercussion sur la capacité peroxysomale de b-oxydation des acides gras pourrait avoir des conséquences délétères sur les fonctions cérébrales en particulier dans le cadre de la neuroinflammation et les maladies neurodégénératives peroxysomales.

Un autre objectif de ce travail de thèse a été la caractérisation d'une lignée cellulaire des cellules BV-2, présentant des caractéristiques de la microglie, déficiente en ACOX1. Cette lignée déficiente en ACOX1 a été obtenue au laboratoire à Dijon en utilisant une nouvelle technologie CRISPR/Cas-9 pour inactiver notre gène d'intérêt ACOX1. Une partie des résultats de ce chapitre a fait l'objet d'une publication scientifique.

Après confirmation par séquençage de mutation introduite dans le gène *Acox1*, nous avons dans un premier temps validé cette déficience par l'absence de protéine ACOX1 par Western blot et de son activité enzymatique. La mesure de l'oxydation de la palmitoyl-CoA a été réalisée grâce au suivi de la réduction du NAD<sup>+</sup> au niveau de l'enzyme bifonctionnelle, deuxième enzyme du système de  $\beta$ -oxydation peroxysomal et nous avons pu démontrer la quasi-absence d'activité enzymatique dans les extraits cellulaires de BV-2 déficientes en ACOX1, tandis que l'activité de la catalase augmentait dans ces cellules. Ce paradoxe apparent avait déjà été signalé dans le foie de souris *Acox1*<sup>-/-</sup> (Chu et coll., 2004) ou après inhibition spécifique de l'activité de l'ACOX1 chez le rat (Zeng et coll., 2017). En réalité, une telle augmentation pourrait être causée par une modification du statut RedOx, telle que rapportée précédemment chez les souris *Acox1*<sup>-/-</sup>, par l'augmentation du taux hépatique de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Fan et coll., 1998). En outre, l'expression et l'activité de la catalase sont très sensibles au stress oxydatif (Glorieux, et coll., 2015). Il a été prouvé que le déficit en ACOX1 chez les souris ou le l'absence d'ACOX1 dans des oligodendrocytes 158N génèrent un stress oxydatif (Baarine et coll., 2012; Huang et coll., 2012). Des régulations épigénétiques ou post-transcriptionnelles peuvent être considérées comme des explications possibles de l'activité accrue de la catalase (Glorieux et coll., 2015). Compte tenu de l'augmentation du nombre de peroxysomes et des mitochondries et de la diminution de la taille des mitochondries observée dans les cellules déficientes en ACOX1, une activation éventuelle de PPAR $\alpha$  serait également possible. Les peroxysomes et les mitochondries partagent des mécanismes de division et de prolifération très similaires qui dépendent en partie de l'activation de PPAR $\alpha$  (Schrader et coll., 2016). Une étude de l'activité enzymatique mitochondriale via la mesure des activités des complexes mitochondriaux est en cours pourrait nous aider à mieux expliquer cette relation entre les peroxysomes et les

mitochondries dans le cadre de cette déficience. Dans le foie des souris *Acox1*<sup>-/-</sup>, une activation prolongée des voies de PPAR $\alpha$  a été observée (Fan et coll., 1998). L'hypothèse la plus admise est qu'un ou plusieurs substrats d'ACOX1 s'accumulent et servent d'activateurs de PPAR $\alpha$  (Huang et coll., 2012). Parmi ces substrats, les VLCFA ont été décrits en tant que ligands de PPAR $\alpha$  (Hostetler, et coll., 2006; Hostetler, et coll., 2005). L'analyse lipidique des cellules déficientes en ACOX1 a confirmé l'accumulation de VLCFA (C26: 0, C24: 0, C26: 1, C24: 1). Bien que nous ayons observé quelques modifications des taux de AGPI dans les cellules déficientes en ACOX1, aucune modification évidente des AGPI n'a été observée contrairement aux fibroblastes des patients ou aux souris *Acox1*<sup>-/-</sup> chez qui les concentrations plasmatiques de DHA et d'AA étaient diminuées (Vluggens et coll., 2010; Abe, et coll., 2014). Dans notre modèle cellulaire, une analyse préliminaire de gènes sensibles à PPAR $\alpha$ , tels qu'ACOX1 ou Pex11b, a montré une induction faible qui ne permet pas de démontrer clairement l'implication de PPAR $\alpha$  (données non présentées). Il est à noter que des mécanismes de prolifération des peroxysomes indépendants de PPAR $\alpha$  ont déjà été décrits (Gondcaille et coll., 2005; Schrader et coll., 2016; Bagattin, et coll. 2010).

Le fractionnement subcellulaire complet et la purification sur un gradient de densité de Nycodenz réalisés sur les cellules BV-2 déficientes en ACOX1 ont été réalisés pour la première fois. Ils ont pour objectif de comparer et vérifier les différences entre les organites de ces cellules à savoir la répartition et la distribution de leurs activités enzymatiques dans les cellules BV-2 *Acox1*<sup>-/-</sup>, avec un intérêt particulier pour les peroxysomes.

Globalement, les résultats du fractionnement complet des cellules ont montré que la distribution des organites n'a pas été affecté avec cette déficience mais avec des niveaux différents des activités des enzymes marqueurs.

Pour la fraction L suivie grâce à la présence de trois enzymes marqueurs : la  $\beta$ -galactosidase, la  $\beta$ -hexosaminidase et la cathepsine-C ; les résultats montrent le même profil de distribution des organites de ces trois enzymes dans les fractions avec un maximum d'activité dans la fraction L d'intérêt. On remarque aussi une légère augmentation de l'activité spécifique relative de la  $\beta$ -galactosidase lysosomale dans les cellules BV-2 déficiente en ACOX1 par rapport aux cellules contrôles.

Concernant la fraction mitochondriale lourde M, une fraction enrichie en mitochondries, dans laquelle l'activité enzymatique de la cytochrome C oxydase devrait être maximale. Or, dans les cellules BV-2, les résultats montrent que cette activité est répartie entre les deux



fractions M et L, et ne montrent aucune différence pour la distribution de cette activité entre les deux lignées de cellules BV-2 Wt et BV-2 *Acox1*<sup>-/-</sup>. Le fait de ne pas avoir un pic d'activité dans cette fraction comme le cas des activités des enzymes lysosomales peut être expliqué par la présence de plus de mitochondries dans la fraction L. Ces résultats devraient être confirmés ou infirmés par les mesures des activités des complexes mitochondriaux dans ces fractions qui sont en cours.

Les résultats sont un peu surprenants concernant la distribution de l'activité de la mesure de l'enzyme ACOX1 dans ces fractions, il était connu depuis longtemps que la fraction « L » dite mitochondriale légère est une fraction enrichie des lysosomes et peroxysomes et comme ACOX1 est une enzyme peroxysomale, on s'attend à avoir un maximum d'activité ACOX1 dans la fraction L. Or, nos résultats montrent une activité dans deux fractions M mitochondriale lourde et la fraction P microsomale mais une faible activité dans la fraction L dans les cellules BV-2 Wt. L'ensemble des activités dans les deux fractions des BV-2 Wt reste remarquablement plus élevé par rapport aux activités détectées dans les fractions des cellules BV-2 *Acox1*<sup>-/-</sup>. Ces résultats sont confirmés par la distribution et le profil d'expression de cette enzyme dans les différentes fractions qui montre une forte intensité dans les deux fractions M et P des cellules Wt avec l'absence de cette intensité dans toutes les fractions issues des cellules BV-2 *Acox1*<sup>-/-</sup>. L'absence de cette activité ACOX1 est aussi démontré par les résultats de mesure de cette activité dans les fractions de gradient de Nycodenz.

L'activité de la catalase mesurée dans chaque fraction des deux cellules BV-2 montre qu'un maximum de cette activité est présent dans la fraction L mitochondriale légère enrichie des lysosomes et peroxysomes dans les cellules Wt. Mais, cette activité est quasiment la même pour les deux fractions « L » et « P » dite la fraction microsomale enrichie du RE et qui peut aussi contenir des peroxysomes de petite taille. Ceci pourrait expliquer les résultats obtenus par western blot et l'intensité du signal mesuré dans ces fractions cellulaires. D'autres études suggèrent que la déficience en ACOX1 induit un stress oxydant au niveau du RE.

La mesure de l'activité de  $\alpha$ -glucosidase alcaline enzyme marqueur du RE, dont l'activité est attendue dans la fraction « L » avec les lysosomes et les peroxysomes mais aussi dans la fraction « P » ou peut exister des RE de petites tailles ou bien dont la forme et la structure sont abimés suite au processus de fractionnement. La distribution de l'activité enzymatique est quasiment la même dans les deux types cellulaires avec une légère augmentation de cette activité dans les cellules BV-2 *Acox1*<sup>-/-</sup>.

La DPP-III, enzyme marqueur de la fraction cytosolique la distribution et la qualité du fractionnement. Les résultats montrent une activité maximale de cette enzyme dans la fraction S contient uniquement le cytosol avec l'absence des autres organites. Nous n'observons pas de différence entre les deux types de cellules. À signaler que dans cette fraction, aucune des autres activités ne devraient être détectées, ce qui montre la qualité du fractionnement.

Durant la présente étude, nous n'avons pas constaté de changement ni de la taille, ni de la densité des peroxysomes comme les montre les résultats du fractionnement sur le gradient de Nycodenz ; les cellules BV-2 présentent une déficience en ACOX1 ont gardé la même densité après avoir déposé les mêmes fractions enrichies en peroxysomes des cellules BV-2 Wt ou BV-2 *Acox1*<sup>-/-</sup> sur le gradient de densité Nycodenz. Il a été suggéré dans le cas de la déficience en ACOX1, que l'accumulation des AGTLC pourrait perturber les membranes peroxysomales et interférer avec le mécanisme d'import des protéines peroxysomales menant ainsi à des morphologies anormales ou bien à l'agrégation de plusieurs organites (Fan et coll., 1996; Funato et coll., 2006). Une analyse plus approfondie est nécessaire pour clarifier ce point qui est probablement associé aux différences entre les tissus ou les espèces.

L'analyse de l'expression en RT-qPCR de l'ARNm de l'ACOX1 des cellules BV-2 *Acox1*<sup>-/-</sup> montre une expression comparable à celle des cellules BV-2 contrôles. Dans ces cellules BV-2 *Acox1*<sup>-/-</sup>, l'absence d'activité et de la protéine sont dus à l'insertion d'un nucléotide T provoquant un décalage du cadre de lecture au cours de la traduction de l'ARNm muté *Acox1*.

L'expression génique de l'ACOX1 est dépendante de la coactivation transcriptionnelle par le coactiovateur PGC-1 $\alpha$ . L'analyse de l'expression de du gène codant pour la PGC-1 $\alpha$  n'est pas affecté par cette déficience et ne montre aucune différence du niveau d'expression de PGC-1 $\alpha$  dans les cellules BV-2 *Acox1*<sup>-/-</sup> par rapport au BV-2 Wt. Le PGC-1 $\alpha$  est également connu comme étant un coactivateur des facteurs intervenant dans la biogenèse et le métabolisme mitochondriale. Le même résultat a été déjà montré dans notre équipe (donnée non publié) dans le cadre de la déficience en ACOX1 dans les fibroblastes des patients atteint de la P-NALD. Dans ces fibroblastes P-NALD, Le taux d'expression de l'ARNm PGC-1 $\alpha$  ne montre pas de variation.

Une étude préliminaire réalisée en absence de tout stimulus pour la mesure de l'expression de ARNm des cytokines inflammatoire a montré l'augmentation de l'expression des IL-1 $\beta$  et IL-4 avec une diminution du niveau de l'expression de TNF- $\alpha$  et IL-6. Alors qu'il n'y a pas de

différence dans le niveau d'expression d'IL-10 dans les cellules BV-2 *Acox1*<sup>-/-</sup> par rapport au BV-2Wt. Or, ces résultats restent à confirmer par d'autres expériences en présence d'un stimulus comme le LPS. Des résultats déjà publiés ont montré l'induction d'IL-1 $\beta$  et d'IL-6 dans des les cellules BV-2 lors d'une stimulation par LPS (Qin et coll., 2016). L'induction observée de l'IL-1 $\beta$  et la répression de l'IL-6 sont inhabituelles et suggérant que le défaut peroxysomal a déclenché une voie inhabituelle de régulation de l'inflammation.

# *Conclusions & Perspectives*

---

# Conclusion et perspectives

## I. Conclusion

Les travaux réalisés au cours de cette thèse soulignent les effets et les propriétés antioxydantes et anti-inflammatoires d'extraits issus de la raquette de cactus évalué dans les cellules BV-2 de la microglie, les différents types de LPS ont utilisé pour activer les cellules BV-2 en raison de l'hétérogénéité des structures des différents sérotypes de LPS utilisés.

Dans un premier temps, nous avons caractérisé l'effet protecteur de différents extraits issus de cactus ainsi que les effets des différents types de LPS sur les fonctions peroxysomales. Nous avons montré les points suivants :

- Nous avons montré que trois sérotypes ont révélé une légère augmentation de la viabilité des cellules BV-2.
- Un effet différentiel du LPS entre les deux activités peroxysomales ACOX1 et catalase dans les cellules microgliales BV-2.
- Le LPS issu *Salmonella minnesota* a un effet uniquement sur l'activité catalase mais aucun effet sur l'activité ACOX1.
- Les extraits issus de la raquette de cactus empêchent la réduction associée aux traitements LPS des activités catalase et ACOX1.
- Les différents extraits de cactus ont montré un puissant effet préventif sur la production de NO par le LPS des cellules BV-2. Les extraits sont capables d'inhiber la réponse inflammatoire induite par le LPS dans ces cellules microgliales.
- Les différentes formes de LPS issus des 4 types de LPS favorisent les réponses différentielles entre l'oxydation des AG peroxysomaux et la fonction antioxydante peroxysomale.

Dans le but d'étudier les conséquences d'un déficit peroxysomal, le deuxième volet des travaux de cette thèse a consisté à caractériser des cellules BV-2 microgliale déficiente en ACOX1 préparé dans notre laboratoire en utilisant une nouvelle technologie CRISPR/Cas9 pour invalider le gène ACOX1. Ces travaux ont montré :

- L'absence de la protéine ACOX1 a été confirmée par western blot et la mesure de l'activité spécifique de cette enzyme.
- L'augmentation de l'activité de la catalase dans ces cellules causée par une modification du statut RedOx en lien avec le stress oxydatif.
- Peu de changement de la taille et de la densité des peroxysomes dans les cellules BV-2 déficientes en ACOX1 comme les montrent les résultats du fractionnement sur le gradient Nycodenz.
- Des modifications dans la plupart des activités enzymatiques qui caractérisent les différents organites à savoir les activités mitochondriales et lysosomales comme les montrent la mesure de ces activités dans les fractions subcellulaires purifiées.
- Une augmentation dans les niveaux de la production de certaines cytokines inflammatoires dans les cellules BV-2 *Acox1*<sup>-/-</sup> en absence de tout autre stimulus.

## II. Perspectives

La nouvelle lignée microgliale BV-2 déficiente en ACOX1 a été bien caractérisée sur le plan biochimique qui ressemble à certaines caractéristiques mesurées dans les fibroblastes de patients déficient en ACOX1. Des modifications des fonctions des peroxysomes et de mitochondries ont été observées dans les fibroblastes *ACOX1*<sup>-/-</sup> et il serait important d'étudier l'existence de ces observations dans la nouvelle ligne BV-2 *Acox1*<sup>-/-</sup>.

Il sera intéressant d'évaluer l'effet de la déficience en ACOX1 sur le métabolisme mitochondrial par l'étude des différentes activités des complexes mitochondriaux. Dans ces cellules BV-2 déficiente en ACOX1, il serait indispensable de décortiquer le mécanisme qui

fait un lien entre cette déficience en ACOX1 et les altérations des fonctions mitochondriales, à savoir l'étude de l'état de respiration mitochondriales, le potentiel membranaire mitochondriale et l'état du stress oxydant par la mesure des activités des autres enzymes.

Il serait essentiel aussi de réaliser une étude détaillée des différentes fractions M et P afin de comparer les niveaux des activités dans ces trois fractions et trouver une explication de la présence des activités peroxysomales dans ces fractions.

Nous avons montré que les extraits issus de cactus sont caractérisés par leur pouvoir antioxydant et antiinflammatoire. Il est donc important de faire une évaluation des effets sur la régulation de la biogenèse et les voies du métabolisme de la mitochondrie.

Il est important d'identifier les composants responsables de ces effets dans les extraits de cactus et l'utilisation du modèle de cellules BV-2 pourrait s'avérer cruciale dans le criblage des activités de molécules purifiées à partir de cette plante.

Il sera essentiel de poursuivre l'étude de ces effets anti-inflammatoires et antioxydants chez un modèle animal comme la souris.



# *Références Bibliographiques*

---

## Bibliographies



- Achucarro, N. (1913). Notas sobre la estructura y funciones de la neuroglia y en particular de la neuroglia de la corteza cerebral humana. *Academia.edu*.
- Afzelius, B. A. (1965). The occurrence and structure of microbodies. *The Journal of Cell Biology*, 26(3), 835-843.
- Ahmad, A., Davies, J., Randall, S., & Skinner, G. R. (1996). Antiviral properties of extract of *Opuntia streptacantha*. *Antiviral Research*, 30(2-3), 75-85.
- Ames, B. N., Cathcart, R., Schwiers, E., & Hochstein, P. (1981). Uric acid provides an antioxidant defense in humans against oxidant- and radical-caused aging and cancer: a hypothesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 78(11), 6858-6862.
- Angermüller, S., Bruder, G., Völkl, A., Wesch, H., & Fahimi, H. D. (1987). Localization of xanthine oxidase in crystalline cores of peroxisomes. A cytochemical and biochemical study. *European Journal of Cell Biology*, 45(1), 137-144.
- Angermüller, S., & Fahimi, H. D. (1988). Heterogenous staining of D-amino acid oxidase in peroxisomes of rat liver and kidney. A light and electron microscopic study. *Histochemistry*, 88(3-6), 277-285.
- Angermüller, S., Leupold, C., Völkl, A., & Fahimi, H. D. (1986). Electron microscopic cytochemical localization of alpha-hydroxyacid oxidase in rat liver. Association with the crystalline core and matrix of peroxisomes. *Histochemistry*, 85(5), 403-409.
- Angermüller, S., Leupold, C., Zaar, K., & Fahimi, H. D. (1986). Electron microscopic cytochemical localization of alpha-hydroxyacid oxidase in rat kidney cortex. Heterogeneous staining of peroxisomes. *Histochemistry*, 85(5), 411-418.
- Antonenkov, V. D., & Hiltunen, J. K. (2012). Transfer of metabolites across the peroxisomal membrane. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1822(9), 1374-1386.
- Aspinall, G. O., Fujimoto, S., McDonald, A. G., Pang, H., Kurjanczyk, L. A., & Penner, J. L. (1994). Lipopolysaccharides from *Campylobacter jejuni* associated with Guillain-Barré syndrome patients mimic human gangliosides in structure. *Infection and Immunity*, 62(5), 2122-2125.
- Astudillo, L., Sabourdy, F., Touati, G., & Levade, T. (2016). Maladies peroxysomales. </data/revues/07554982/v45i3/S0755498215003036/>.
- Ayorinde, F. O., Garvin, K., & Saeed, K. (2000). Determination of the fatty acid composition of saponified vegetable oils using matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry: RCM*, 14(7), 608-615.

- Baes, M., Gressens, P., Baumgart, E., Carmeliet, P., Casteels, M., Franssen, M., ... Mannaerts, G. P. (1997). A mouse model for Zellweger syndrome. *Nature Genetics*, *17*(1), 49-57.
- Barbera, G. (ed ), Inglese, P. (ed ), & Pimienta-Barrios, E. (ed ). (1995). Agro-ecology, cultivation and uses of cactus pear. *FAO Plant Production and Protection Paper (FAO)*.
- Barka, N., Ouzaouit, K., Abdennouri, M., & Makhfouk, M. E. (2013). Dried prickly pear cactus (*Opuntia ficus indica*) cladodes as a low-cost and eco-friendly biosorbent for dyes removal from aqueous solutions. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*, *1*(44), 52-60
- Barth, P. G., Majoie, C. B. L. M., Gootjes, J., Wanders, R. J. A., Waterham, H. R., van der Knaap, M. S., ... Poll-The, B. T. (2004). Neuroimaging of peroxisome biogenesis disorders (Zellweger spectrum) with prolonged survival. *Neurology*, *62*(3), 439-444.
- Baudhuin, P., Beaufay, H., & de Duve, C. (1965). Combined biochemical and morphological study of particulate fractions from rat liver. *The Journal of Cell Biology*, *26*(1), 219-243.
- Baumgart, E., Vanhorebeek, I., Grabenbauer, M., Borgers, M., Declercq, P. E., Fahimi, H. D., & Baes, M. (2001). Mitochondrial alterations caused by defective peroxisomal biogenesis in a mouse model for Zellweger syndrome (PEX5 knockout mouse). *The American Journal of Pathology*, *159*(4), 1477-1494.
- Bhaumik, P., Koski, M. K., Glumoff, T., Hiltunen, J. K., & Wierenga, R. K. (2005). Structural biology of the thioester-dependent degradation and synthesis of fatty acids. *Current Opinion in Structural Biology*, *15*(6), 621-628.
- Blinzinger, K., & Kreutzberg, G. (1968). Displacement of synaptic terminals from regenerating motoneurons by microglial cells. *Zeitschrift Für Zellforschung Und Mikroskopische Anatomie*, *85*(2), 145-157.
- Block, M. L., Zecca, L., & Hong, J.-S. (2007). Microglia-mediated neurotoxicity: uncovering the molecular mechanisms. *Nature Reviews. Neuroscience*, *8*(1), 57-69.
- Bonekamp, N. A., Völkl, A., Fahimi, H. D., & Schrader, M. (2009). Reactive oxygen species and peroxisomes: struggling for balance. *BioFactors (Oxford, England)*, *35*(4), 346-355.
- Boveris, A., Oshino, N., & Chance, B. (1972). The cellular production of hydrogen peroxide. *The Biochemical Journal*, *128*(3), 617-630.
- Brade, H., Brade, L., & Rietschel, E. T. (1988). Structure-activity relationships of bacterial lipopolysaccharides (endotoxins). Current and future aspects. *Zentralblatt Fur Bakteriologie, Mikrobiologie, Und Hygiene. Series A, Medical Microbiology, Infectious Diseases, Virology, Parasitology*, *268*(2), 151-179.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, *72*(1), 248-254.
- Braverman, N. E., & Moser, A. B. (2012). Functions of plasmalogen lipids in health and disease. *Biochimica Et Biophysica Acta*, *1822*(9), 1442-1452.

- Brites, P., Waterham, H. R., & Wanders, R. J. A. (2004). Functions and biosynthesis of plasmalogens in health and disease. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1636(2-3), 219-231.
- Brown, L.-A., & Baker, A. (2008). Shuttles and cycles: transport of proteins into the peroxisome matrix. *Molecular Membrane Biology*, 25(5), 363-375.
- Buchert, R., Tawamie, H., Smith, C., Uebe, S., Innes, A. M., Al Hallak, B., ... Abou Jamra, R. (2014). A peroxisomal disorder of severe intellectual disability, epilepsy, and cataracts due to fatty acyl-CoA reductase 1 deficiency. *American Journal of Human Genetics*, 95(5), 602-610.
- Busquets, S., Sanchís, D., Alvarez, B., Ricquier, D., López-Soriano, F. J., & Argilés, J. M. (1998). In the rat, tumor necrosis factor alpha administration results in an increase in both UCP2 and UCP3 mRNAs in skeletal muscle: a possible mechanism for cytokine-induced thermogenesis? *FEBS Letters*, 440(3), 348-350.
- Bustos, O. E. (1981). Alcoholic Beverage from Chilean Opuntia Ficus Indica. *American Journal of Enology and Viticulture*, 32(3), 228-229.



- Caira, F., Clémencet, M. C., Cherkaoui-Malki, M., Dieuaide-Noubhani, M., Pacot, C., Van Veldhoven, P. P., & Latruffe, N. (1998). Differential regulation by a peroxisome proliferator of the different multifunctional proteins in guinea pig: cDNA cloning of the guinea pig D-specific multifunctional protein 2. *The Biochemical Journal*, 330 ( Pt 3), 1361-1368.
- Caira, F., Pacot, C., Bardot, O., Cherkaoui Malki, M., & Latruffe, N. (1995). Transcriptional and post-transcriptional analysis of peroxisomal protein encoding genes from rat treated with an hypolipemic agent, ciprofibrate. Effect of an intermittent treatment and influence of obesity. *Biochemical Pharmacology*, 49(5), 611-619.
- Carrozzo, R., Bellini, C., Lucioli, S., Deodato, F., Cassandrini, D., Cassanello, M., ... Bonioli, E. (2008). Peroxisomal acyl-CoA-oxidase deficiency: two new cases. *American Journal of Medical Genetics. Part A*, 146A(13), 1676-1681.
- Cartier, N., Hacein-Bey-Abina, S., Bartholomae, C. C., Veres, G., Schmidt, M., Kutschera, I., ... Aubourg, P. (2009). Hematopoietic stem cell gene therapy with a lentiviral vector in X-linked adrenoleukodystrophy. *Science (New York, N.Y.)*, 326(5954), 818-823.
- Casteels, M., Schepers, L., Van Veldhoven, P. P., Eyssen, H. J., & Mannaerts, G. P. (1990). Separate peroxisomal oxidases for fatty acyl-CoAs and trihydroxycoprostanoyl-CoA in human liver. *Journal of Lipid Research*, 31(10), 1865-1872.
- Castellanos-Santiago, E., & Yahia, E. M. (2008). Identification and quantification of betalains from the fruits of 10 mexican prickly pear cultivars by high-performance liquid chromatography and electrospray ionization mass spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(14), 5758-5764.
- Charrouf, Z., & Guillaume, D. (2007). Phenols and Polyphenols from *Argania spinosa*. *American Journal of Food Technology*, 2(7), 679-683.

- Chu, R., Varanasi, U., Chu, S., Lin, Y., Usuda, N., Rao, M. S., & Reddy, J. K. (1995). Overexpression and characterization of the human peroxisomal acyl-CoA oxidase in insect cells. *The Journal of Biological Chemistry*, 270(9), 4908-4915.
- Cunningham, C. (2013). Microglia and neurodegeneration: the role of systemic inflammation. *Glia*, 61(1), 71-90.

## D

- De Duve, C., & Baudhuin, P. (1966). Peroxisomes (microbodies and related particles). *Physiological Reviews*, 46(2), 323-357. <https://doi.org/10.1152/physrev.1966.46.2.323>
- De Duve, C., Pressman, B. C., Gianetto, R., Wattiaux, R., & Appelmans, F. (1955). Tissue fractionation studies. 6. Intracellular distribution patterns of enzymes in rat-liver tissue. *The Biochemical Journal*, 60(4), 604-617.
- de Lima, M. N. M., Polydoro, M., Laranja, D. C., Bonatto, F., Bromberg, E., Moreira, J. C. F., ... Schröder, N. (2005). Recognition memory impairment and brain oxidative stress induced by postnatal iron administration. *The European Journal of Neuroscience*, 21(9), 2521-2528.
- Della Valle, M. C., Sleat, D. E., Zheng, H., Moore, D. F., Jadot, M., & Lobel, P. (2011). Classification of Subcellular Location by Comparative Proteomic Analysis of Native and Density-shifted Lysosomes. *Molecular & Cellular Proteomics : MCP*, 10(4).
- Dieuaide-Noubhani, M., Novikov, D., Baumgart, E., Vanhooren, J. C., Franssen, M., Goethals, M., ... Mannaerts, G. P. (1996). Further characterization of the peroxisomal 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenases from rat liver. Relationship between the different dehydrogenases and evidence that fatty acids and the C27 bile acids di- and tri-hydroxycoprostanic acids are metabolized by separate multifunctional proteins. *European Journal of Biochemistry*, 240(3), 660-666.
- Dieuaide-Noubhani, M., Novikov, D., Vandekerckhove, J., Veldhoven, P. P., & Mannaerts, G. P. (1997). Identification and characterization of the 2-enoyl-CoA hydratases involved in peroxisomal beta-oxidation in rat liver. *Biochemical Journal*, 321(Pt 1), 253-259.
- Dimitrov, L., Lam, S. K., & Schekman, R. (2013). The Role of the Endoplasmic Reticulum in Peroxisome Biogenesis. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 5(5). <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a013243>
- Dirkx, R., Vanhorebeek, I., Martens, K., Schad, A., Grabenbauer, M., Fahimi, D., ... Baes, M. (2005). Absence of peroxisomes in mouse hepatocytes causes mitochondrial and ER abnormalities. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 41(4), 868-878.

## E

- Eichler, F. S., Ren, J.-Q., Cossoy, M., Rietsch, A. M., Nagpal, S., Moser, A. B., ... Ransohoff, R. M. (2008). Is microglial apoptosis an early pathogenic change in cerebral X-linked adrenoleukodystrophy? *Annals of Neurology*, 63(6), 729-742.

- El Hajj, H. I., Vluggens, A., Andreoletti, P., Ragot, K., Mandard, S., Kersten, S., ... Cherkaoui-Malki, M. (2012). The inflammatory response in acyl-CoA oxidase 1 deficiency (pseudoneonatal adrenoleukodystrophy). *Endocrinology*, *153*(6), 2568-2575.
- El Kharrassi, Y., Mazri, M. A., Benyahia, H., Benaouda, H., Nasser, B., & El Mzouri, E. H. (2016). Fruit and juice characteristics of 30 accessions of two cactus pear species (*Opuntia ficus indica* and *Opuntia megacantha*) from different regions of Morocco. *LWT - Food Science and Technology*, *65*, 610-617.
- El Kossori, R. L., Villaume, C., El Boustani, E., Sauvaire, Y., & Méjean, L. (1998). Composition of pulp, skin and seeds of prickly pears fruit (*Opuntia ficus indica* sp.). *Plant Foods for Human Nutrition (Dordrecht, Netherlands)*, *52*(3), 263-270.
- Elgersma, Y., & Tabak, H. F. (1996). Proteins involved in peroxisome biogenesis and functioning. *Biochimica Et Biophysica Acta*, *1286*(3), 269-283.
- El-Mostafa, K., El Kharrassi, Y., Badreddine, A., Andreoletti, P., Vamecq, J., El Kebbjaj, M., ... Cherkaoui-Malki, M. (2014). Nopal Cactus (*Opuntia ficus-indica*) as a Source of Bioactive Compounds for Nutrition, Health and Disease. *Molecules*, *19*(9), 14879-14901. <https://doi.org/10.3390/molecules190914879>
- Engelen, M., Barbier, M., Dijkstra, I. M. E., Schür, R., de Bie, R. M. A., Verhamme, C., ... Kemp, S. (2014). X-linked adrenoleukodystrophy in women: a cross-sectional cohort study. *Brain: A Journal of Neurology*, *137*(Pt 3), 693-706.
- Engelen, M., Kemp, S., de Visser, M., van Geel, B. M., Wanders, R. J. A., Aubourg, P., & Poll-The, B. T. (2012). X-linked adrenoleukodystrophy (X-ALD): clinical presentation and guidelines for diagnosis, follow-up and management. *Orphanet Journal of Rare Diseases*, *7*, 51.
- Engelen, M., Kemp, S., & Poll-The, B.-T. (2014). X-linked adrenoleukodystrophy: pathogenesis and treatment. *Current Neurology and Neuroscience Reports*, *14*(10), 486.
- Engerson, T. D., McKelvey, T. G., Rhyne, D. B., Boggio, E. B., Snyder, S. J., & Jones, H. P. (1987). Conversion of xanthine dehydrogenase to oxidase in ischemic rat tissues. *Journal of Clinical Investigation*, *79*(6), 1564-1570.
- Epsinosa-A, J., Borrocal-A, R., Jara, M., Zorilla-G, C., Zanabria-P, C., & Medina-T, J. (1973). Quelques propriétés et essais préliminaires de conservation des fruits et du jus de figue de Barbarie (*Opuntia ficus indica*). *Fruits*.

## F

- Faber, K. N., Haan, G. J., Baerends, R. J. S., Kram, A. M., & Veenhuis, M. (2002). Normal peroxisome development from vesicles induced by truncated *Hansenula polymorpha* Pex3p. *The Journal of Biological Chemistry*, *277*(13), 11026-11033.
- Fahimi, H. D. (1968). Cytochemical localization of peroxidase activity in rat hepatic microbodies. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, *16*(8), 547-550.
- Fahimi, H. D. (1969). Cytochemical localization of peroxidatic activity of catalase in rat hepatic microbodies (peroxisomes). *The Journal of Cell Biology*, *43*(2), 275-288.



- Fan, C. Y., Pan, J., Chu, R., Lee, D., Kluckman, K. D., Usuda, N., ... Reddy, J. K. (1996). Hepatocellular and hepatic peroxisomal alterations in mice with a disrupted peroxisomal fatty acyl-coenzyme A oxidase gene. *The Journal of Biological Chemistry*, 271(40), 24698-24710.
- Fan, C. Y., Pan, J., Usuda, N., Yeldandi, A. V., Rao, M. S., & Reddy, J. K. (1998). 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. *The Journal of Biological Chemistry*, 273(25), 15639-15645.
- Färber, K., & Kettenmann, H. (2006). Purinergic signaling and microglia. *Pflugers Archiv: European Journal of Physiology*, 452(5), 615-621. <https://doi.org/10.1007/s00424-006-0064-7>
- Ferdinandusse, S., Barker, S., Lachlan, K., Duran, M., Waterham, H. R., Wanders, R. J. A., & Hammans, S. (2010). Adult peroxisomal acyl-coenzyme A oxidase deficiency with cerebellar and brainstem atrophy. *Journal of Neurology, Neurosurgery and Psychiatry*, 81.
- Ferdinandusse, S., Denis, S., Mooijer, P. A., Zhang, Z., Reddy, J. K., Spector, A. A., & Wanders, R. J. (2001). Identification of the peroxisomal beta-oxidation enzymes involved in the biosynthesis of docosahexaenoic acid. *Journal of Lipid Research*, 42(12), 1987-1995.
- Ferdinandusse, S., Kostopoulos, P., Denis, S., Rusch, H., Overmars, H., Dillmann, U., ... Marziniak, M. (2006). Mutations in the Gene Encoding Peroxisomal Sterol Carrier Protein X (SCPx) Cause Leukencephalopathy with Dystonia and Motor Neuropathy. *American Journal of Human Genetics*, 78(6), 1046-1052.
- Ferdinandusse, Sacha, Denis, S., Hogenhout, E. M., Koster, J., van Roermund, C. W. T., IJlst, L., ... Waterham, H. R. (2007). Clinical, biochemical, and mutational spectrum of peroxisomal acyl-coenzyme A oxidase deficiency. *Human Mutation*, 28(9), 904-912.
- Ferdinandusse, Sacha, Denis, S., Mooyer, P. A. W., Dekker, C., Duran, M., Soorani-Lunsing, R. J., ... Poll-The, B. T. (2006). Clinical and biochemical spectrum of D-bifunctional protein deficiency. *Annals of Neurology*, 59(1), 92-104. <https://doi.org/10.1002/ana.20702>
- Ferdinandusse, Sacha, Meissner, T., Wanders, R. J. A., & Mayatepek, E. (2002). Identification of the peroxisomal beta-oxidation enzymes involved in the degradation of leukotrienes. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 293(1), 269-273.
- Fernandez-Lopez, J. A., Gimenez, P. J., Angosto, J. M., & Moreno, J. I. (2012). *A process of recovery of a natural yellow colourant from Opuntia fruits.(scientific note)(Report)* (Article; Article/Report) (p. 246(6)).
- Feugang, J. M., Konarski, P., Zou, D., Stintzing, F. C., & Zou, C. (2006). Nutritional and medicinal use of Cactus pear (*Opuntia* spp.) cladodes and fruits. *Frontiers in Bioscience: A Journal and Virtual Library*, 11, 2574-2589.
- Filip, S., Hribar, J., & Vidrih, R. (2011). Influence of natural antioxidants on the formation of trans-fatty-acid isomers during heat treatment of sunflower oil. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 113(2), 224-230.



- Fransen, M., Nordgren, M., Wang, B., & Apanasets, O. (2012). Role of peroxisomes in ROS/RNS-metabolism: implications for human disease. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1822(9), 1363-1373.
- Funato, M., Shimozawa, N., Nagase, T., Takemoto, Y., Suzuki, Y., Imamura, Y., ... Kondo, N. (2006). Aberrant peroxisome morphology in peroxisomal beta-oxidation enzyme deficiencies. *Brain & Development*, 28(5), 287-292.

## G

- Gabaldón, T. (2010). Peroxisome diversity and evolution. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 365(1541), 765-773.
- Gentile, C., Tesoriere, L., Allegra, M., Livrea, M. A., & D'Alessio, P. (2004). Antioxidant betalains from cactus pear (*Opuntia ficus-indica*) inhibit endothelial ICAM-1 expression. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1028, 481-486.
- Geuze, H. J., Murk, J. L., Stroobants, A. K., Griffith, J. M., Kleijmeer, M. J., Koster, A. J., ... Tabak, H. F. (2003). Involvement of the Endoplasmic Reticulum in Peroxisome Formation. *Molecular Biology of the Cell*, 14(7), 2900-2907.
- Goldblith, S. A., & Proctor, B. E. (1950). Photometric determination of catalase activity. *The Journal of Biological Chemistry*, 187(2), 705-709.
- Gondcaille, C., Depreter, M., Fourcade, S., Lecca, M. R., Leclercq, S., Martin, P. G. P., ... Bugaut, M. (2005). Phenylbutyrate up-regulates the adrenoleukodystrophy-related gene as a nonclassical peroxisome proliferator. *The Journal of Cell Biology*, 169(1), 93-104.
- Gonzalez, F. J., Peters, J. M., & Cattley, R. C. (1998). Mechanism of action of the nongenotoxic peroxisome proliferators: role of the peroxisome proliferator-activator receptor alpha. *Journal of the National Cancer Institute*, 90(22), 1702-1709.

## H

- Hamer, I., & Jadot, M. (2005). Endolysosomal transport of newly-synthesized cathepsin D in a sucrose model of lysosomal storage. *Experimental Cell Research*, 309(2), 284-295.
- Hashimoto, T. (1996). Peroxisomal beta-oxidation: enzymology and molecular biology. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 804, 86-98.
- Hashimoto, T., Fujita, T., Usuda, N., Cook, W., Qi, C., Peters, J. M., ... Reddy, J. K. (1999). Peroxisomal and mitochondrial fatty acid beta-oxidation in mice nullizygous for both peroxisome proliferator-activated receptor alpha and peroxisomal fatty acyl-CoA oxidase. Genotype correlation with fatty liver phenotype. *The Journal of Biological Chemistry*, 274(27), 19228-19236.
- Hassan, M., Blanc, P. J., Pareilleux, A., & Goma, G. (1995). Production of cocoa butter equivalents from prickly-pear juice fermentation by an unsaturated fatty acid auxotroph of *Cryptococcus curvatus* grown in batch culture. *Process Biochemistry*, 30(7), 629-634.

- Hegwood, D. A. (1990). Human Health Discoveries with *Opuntia* sp. (Prickly Pear). *HORTSCIENCE*, 25, 2.
- Heine, H., Müller-Loennies, S., Brade, L., Lindner, B., & Brade, H. (2003). Endotoxic activity and chemical structure of lipopolysaccharides from *Chlamydia trachomatis* serotypes E and L2 and *Chlamydia psittaci* 6BC. *European Journal of Biochemistry*, 270(3), 440-450.
- Hitchcock, P. J., Leive, L., Mäkelä, P. H., Rietschel, E. T., Strittmatter, W., & Morrison, D. C. (1986). Lipopolysaccharide nomenclature--past, present, and future. *Journal of Bacteriology*, 166(3), 699-705.
- Ho, Y.-S., Xiong, Y., Ma, W., Spector, A., & Ho, D. S. (2004). Mice lacking catalase develop normally but show differential sensitivity to oxidant tissue injury. *The Journal of Biological Chemistry*, 279(31), 32804-32812.
- Hoepfner, D., Schildknecht, D., Braakman, I., Philippsen, P., & Tabak, H. F. (2005). Contribution of the Endoplasmic Reticulum to Peroxisome Formation. *Cell*, 122(1), 85-95.
- Hofmann, B., Hecht, H.-J., & Flohé, L. (2002). Peroxiredoxins. *Biological Chemistry*, 383(3-4), 347-364.
- Hora, K., Ohno, S., Oguchi, H., Furukawa, T., & Furuta, S. (1990). Three-dimensional study of glomerular slit diaphragm by the quick-freezing and deep-etching replica method. *European Journal of Cell Biology*, 53(2), 402-406.
- Hruban, Z., Vigil, E. L., Slesers, A., & Hopkins, E. L. (1972). Microbodies: constituent organelles of animal cells.
- Huang, A. H. C. (1983). *Plant Peroxisomes*.
- Huang, J., Viswakarma, N., Yu, S., Jia, Y., Bai, L., Vluggens, A., ... Reddy, J. K. (2011). Progressive endoplasmic reticulum stress contributes to hepatocarcinogenesis in fatty acyl-CoA oxidase 1-deficient mice. *The American Journal of Pathology*, 179(2), 703-713.
- Huybrechts, S. J., Van Veldhoven, P. P., Brees, C., Mannaerts, G. P., Los, G. V., & Franssen, M. (2009). Peroxisome dynamics in cultured mammalian cells. *Traffic (Copenhagen, Denmark)*, 10(11), 1722-1733.
- Hwang, I., Lee, J., Huh, J. Y., Park, J., Lee, H. B., Ho, Y.-S., & Ha, H. (2012). Catalase deficiency accelerates diabetic renal injury through peroxisomal dysfunction. *Diabetes*, 61(3), 728-738.
- Inestrosa, N. C., Bronfman, M., & Leighton, F. (1979). Detection of peroxisomal fatty acyl-coenzyme A oxidase activity. *The Biochemical Journal*, 182(3), 779-788.
- Islinger, M., Grille, S., Fahimi, H. D., & Schrader, M. (2012). The peroxisome: an update on mysteries. *Histochemistry and Cell Biology*, 137(5), 547-574.

## I

- Ito, M., Blumberg, B. M., Mock, D. J., Goodman, A. D., Moser, A. B., Moser, H. W., ... Powers, J. M. (2001). Potential environmental and host participants in the early white matter lesion of adreno-leukodystrophy: morphologic evidence for CD8 cytotoxic T

cells, cytolysis of oligodendrocytes, and CD1-mediated lipid antigen presentation. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*, 60(10), 1004-1019.

Ivashchenko, O., Van Veldhoven, P. P., Brees, C., Ho, Y.-S., Terlecky, S. R., & Fransen, M. (2011). Intraperoxisomal redox balance in mammalian cells: oxidative stress and interorganellar cross-talk. *Molecular Biology of the Cell*, 22(9), 1440-1451.

## J

Jabri karoui, I., & Marzouk, B. (2013). Characterization of Bioactive Compounds in Tunisian Bitter Orange (*Citrus aurantium* L.) Peel and Juice and Determination of Their Antioxidant Activities. *BioMed Research International*, 2013.

Jacques, M. (1996). Role of lipo-oligosaccharides and lipopolysaccharides in bacterial adherence. *Trends in Microbiology*, 4(10), 408-409.

Jiang, L. L., Kurosawa, T., Sato, M., Suzuki, Y., & Hashimoto, T. (1997). Physiological role of D-3-hydroxyacyl-CoA dehydratase/D-3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase bifunctional protein. *Journal of Biochemistry*, 121(3), 506-513.

Joklik, W. K., Willett, H. P., Amos, D. B., & Zinsser, H. (1984). *Zinsser microbiology*. East Norwalk, Conn: Appleton-Century-Crofts.

Jung, D. Y., Lee, H., Jung, B.-Y., Ock, J., Lee, M.-S., Lee, W.-H., & Suk, K. (2005). TLR4, but not TLR2, signals autoregulatory apoptosis of cultured microglia: a critical role of IFN-beta as a decision maker. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 174(10), 6467-6476.

## K

Kallio, H., Yang, B., Peippo, P., Tahvonen, R., & Pan, R. (2002). Triacylglycerols, glycerophospholipids, tocopherols, and tocotrienols in berries and seeds of two subspecies (ssp. *sinensis* and *mongolica*) of Sea Buckthorn (*Hippophaë rhamnoides*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(10), 3004-3009.

Kaushal, V., & Schlichter, L. C. (2008). Mechanisms of microglia-mediated neurotoxicity in a new model of the stroke penumbra. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 28(9), 2221-2230.

Keller, G. A., Warner, T. G., Steimer, K. S., & Hallewell, R. A. (1991). Cu,Zn superoxide dismutase is a peroxisomal enzyme in human fibroblasts and hepatoma cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 88(16), 7381-7385.

Kemp, S., Berger, J., & Aubourg, P. (2012). X-linked adrenoleukodystrophy: clinical, metabolic, genetic and pathophysiological aspects. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1822(9), 1465-1474.

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

- Khallouki, F., Younos, C., Soulimani, R., Oster, T., Charrouf, Z., Spiegelhalder, B., ... Owen, R. W. (2003). Consumption of argan oil (Morocco) with its unique profile of fatty acids, tocopherols, squalene, sterols and phenolic compounds should confer valuable cancer chemopreventive effects. *European Journal of Cancer Prevention: The Official Journal of the European Cancer Prevention Organisation (ECP)*, 12(1), 67-75.
- Khan, M., Pahan, K., Singh, A. K., & Singh, I. (1998). Cytokine-induced accumulation of very long-chain fatty acids in rat C6 glial cells: implication for X-adrenoleukodystrophy. *Journal of Neurochemistry*, 71(1), 78-87.
- Khan, S. N., Shaeib, F., Najafi, T., Kavdia, M., Gonik, B., Saed, G. M., ... Abu-Soud, H. M. (2015). Diffused Intra-Oocyte Hydrogen Peroxide Activates Myeloperoxidase and Deteriorates Oocyte Quality. *PloS One*, 10(7), e0132388.
- Kharrassi, Y. E., Mazri, M. A., Mabrouk, A., Nasser, B., & Mzouri, E. H. E. (2015). Flowering and fruiting phenology, and physico-chemical characteristics of 2-year-old plants of six species of *Opuntia* from eight regions of Morocco. *The Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, 90(6), 682-688.
- Kim, B., Choi, Y.-E., & Kim, H.-S. (2014). *Eruca sativa* and its flavonoid components, quercetin and isorhamnetin, improve skin barrier function by activation of peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)- $\alpha$  and suppression of inflammatory cytokines. *Phytotherapy Research: PTR*, 28(9), 1359-1366.
- Kim, J.-E., Lee, D.-E., Lee, K. W., Son, J. E., Seo, S. K., Li, J., ... Lee, H. J. (2011). Isorhamnetin suppresses skin cancer through direct inhibition of MEK1 and PI3-K. *Cancer Prevention Research (Philadelphia, Pa.)*, 4(4), 582-591.
- Koch, A., Schneider, G., Lüers, G. H., & Schrader, M. (2004). Peroxisome elongation and constriction but not fission can occur independently of dynamin-like protein 1. *Journal of Cell Science*, 117(Pt 17), 3995-4006.
- Koepke, J. I., Wood, C. S., Terlecky, L. J., Walton, P. A., & Terlecky, S. R. (2008). Progeric effects of catalase inactivation in human cells. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 232(1), 99-108.
- Kono, K., Kamijo, Y., Hora, K., Takahashi, K., Higuchi, M., Kiyosawa, K., ... Aoyama, T. (2009). PPAR $\alpha$  attenuates the proinflammatory response in activated mesangial cells. *American Journal of Physiology. Renal Physiology*, 296(2), F328-336.
- Kreutzberg, G. W. (1996). Microglia: a sensor for pathological events in the CNS. *Trends in Neurosciences*, 19(8), 312-318.

## L

- Laughton, M. J., Evans, P. J., Moroney, M. A., Houlst, J. R., & Halliwell, B. (1991). Inhibition of mammalian 5-lipoxygenase and cyclo-oxygenase by flavonoids and phenolic dietary additives. Relationship to antioxidant activity and to iron ion-reducing ability. *Biochemical Pharmacology*, 42(9), 1673-1681.
- Lazarow, P. B., & De Duve, C. (1976). A fatty acyl-CoA oxidizing system in rat liver peroxisomes; enhancement by clofibrate, a hypolipidemic drug. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 73(6), 2043-2046.

- Lazarow, P. B., & Fujiki, Y. (1985). Biogenesis of Peroxisomes. *Annual Review of Cell Biology*, 1, 489-530.
- Legakis, J. E., Koepke, J. I., Jedeszko, C., Barlaskar, F., Terlecky, L. J., Edwards, H. J., ... Terlecky, S. R. (2002). Peroxisome senescence in human fibroblasts. *Molecular Biology of the Cell*, 13(12), 4243-4255.
- Leighton, F., Poole, B., Beaufay, H., Baudhuin, P., Coffey, J. W., Fowler, S., & De Duve, C. (1968). The large-scale separation of peroxisomes, mitochondria, and lysosomes from the livers of rats injected with triton WR-1339. Improved isolation procedures, automated analysis, biochemical and morphological properties of fractions. *The Journal of Cell Biology*, 37(2), 482-513.
- Li, J., Baud, O., Vartanian, T., Volpe, J. J., & Rosenberg, P. A. (2005). Peroxynitrite generated by inducible nitric oxide synthase and NADPH oxidase mediates microglial toxicity to oligodendrocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(28), 9936-9941.
- Li, Y., Tharappel, J. C., Cooper, S., Glenn, M., Glauert, H. P., & Spear, B. T. (2000). Expression of the hydrogen peroxide-generating enzyme fatty acyl CoA oxidase activates NF-kappaB. *DNA and Cell Biology*, 19(2), 113-120.
- Lieber, D. S., Hershman, S. G., Slate, N. G., Calvo, S. E., Sims, K. B., Schmahmann, J. D., & Mootha, V. K. (2014). Next generation sequencing with copy number variant detection expands the phenotypic spectrum of HSD17B4-deficiency. *BMC Medical Genetics*, 15, 30.
- Lines, M. A., Jobling, R., Brady, L., Marshall, C. R., Scherer, S. W., Rodriguez, A. R., ... Canadian Pediatric Genetic Disorders Sequencing Consortium (FORGE Canada). (2014). Peroxisomal D-bifunctional protein deficiency: three adults diagnosed by whole-exome sequencing. *Neurology*, 82(11), 963-968.
- Litwin, J. A., Beier, K., Völkl, A., Hofmann, W. J., & Fahimi, H. D. (1999). Immunocytochemical investigation of catalase and peroxisomal lipid beta-oxidation enzymes in human hepatocellular tumors and liver cirrhosis. *Virchows Archiv: An International Journal of Pathology*, 435(5), 486-495.
- Liu, B., Wang, K., Gao, H. M., Mandavilli, B., Wang, J. Y., & Hong, J. S. (2001). Molecular consequences of activated microglia in the brain: overactivation induces apoptosis. *Journal of Neurochemistry*, 77(1), 182-189.
- Lodhi, I. J., & Semenkovich, C. F. (2014). Peroxisomes: a nexus for lipid metabolism and cellular signaling. *Cell Metabolism*, 19(3), 380-392.
- Loro, J. F., del Rio, I., & Pérez-Santana, L. (1999). Preliminary studies of analgesic and anti-inflammatory properties of *Opuntia dillenii* aqueous extract. *Journal of Ethnopharmacology*, 67(2), 213-218.

## M

- Ma, C., Agrawal, G., & Subramani, S. (2011). Peroxisome assembly: matrix and membrane protein biogenesis. *The Journal of Cell Biology*, 193(1), 7-16.
- Maehly, A. C., & Chance, B. (1954). The assay of catalases and peroxidases. *Methods of Biochemical Analysis*, 1, 357-424.



- Marshall, P. A., Krimkevich, Y. I., Lark, R. H., Dyer, J. M., Veenhuis, M., & Goodman, J. M. (1995). Pmp27 promotes peroxisomal proliferation. *The Journal of Cell Biology*, *129*(2), 345-355.
- Mayatepek, E., Lehmann, W. D., Fauler, J., Tsikas, D., Frölich, J. C., Schutgens, R. B., ... Keppler, D. (1993). Impaired degradation of leukotrienes in patients with peroxisome deficiency disorders. *The Journal of Clinical Investigation*, *91*(3), 881-888.
- McCoy, M. K., & Tansey, M. G. (2008). TNF signaling inhibition in the CNS: implications for normal brain function and neurodegenerative disease. *Journal of Neuroinflammation*, *5*, 45.
- McGuinness, M. C., Lu, J.-F., Zhang, H.-P., Dong, G.-X., Heinzer, A. K., Watkins, P. A., ... Smith, K. D. (2003). Role of ALDP (ABCD1) and mitochondria in X-linked adrenoleukodystrophy. *Molecular and Cellular Biology*, *23*(2), 744-753.
- McGuinness, M. C., Powers, J. M., Bias, W. B., Schmeckpeper, B. J., Segal, A. H., Gowda, V. C., ... Smith, K. D. (1997). Human leukocyte antigens and cytokine expression in cerebral inflammatory demyelinating lesions of X-linked adrenoleukodystrophy and multiple sclerosis. *Journal of Neuroimmunology*, *75*(1-2), 174-182.
- McMillan, H. J., Worthylake, T., Schwartzentruber, J., Gottlieb, C. C., Lawrence, S. E., MacKenzie, A., ... Boycott, K. M. (2012). Specific combination of compound heterozygous mutations in 17 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase type 4 (HSD17B4) defines a new subtype of D-bifunctional protein deficiency. *Orphanet Journal of Rare Diseases*, *7*, 90.
- Medina, E. M. D., Rodríguez, E. M. R., & Romero, C. D. (2007). Chemical characterization of *Opuntia dillenii* and *Opuntia ficus indica* fruits. *Food Chemistry*, *103*(1), 38-45.
- Möller, G., Leenders, F., van Grunsven, E. G., Dolez, V., Qualmann, B., Kessels, M. M., ... Adamski, J. (1999). Characterization of the HSD17B4 gene: D-specific multifunctional protein 2/17beta-hydroxysteroid dehydrogenase IV. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, *69*(1-6), 441-446.
- Mori, T., Tsukamoto, T., Mori, H., Tashiro, Y., & Fujiki, Y. (1991). Molecular cloning and deduced amino acid sequence of nonspecific lipid transfer protein (sterol carrier protein 2) of rat liver: a higher molecular mass (60 kDa) protein contains the primary sequence of nonspecific lipid transfer protein as its C-terminal part. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *88*(10), 4338-4342.
- Morita, M., & Imanaka, T. (2012). Peroxisomal ABC transporters: structure, function and role in disease. *Biochimica Et Biophysica Acta*, *1822*(9), 1387-1396.
- Mosser, D. M., & Edwards, J. P. (2008). Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nature Reviews. Immunology*, *8*(12), 958-969.
- Motley, A. M., & Hettema, E. H. (2007). Yeast peroxisomes multiply by growth and division. *The Journal of Cell Biology*, *178*(3), 399-410.
- Moussa-Ayoub, T. E., El-Samahy, S. K., Kroh, L. W., & Rohn, S. (2011). Identification and quantification of flavonol aglycons in cactus pear (*Opuntia ficus indica*) fruit using a commercial pectinase and cellulase preparation. *Food Chemistry*, *124*(3), 1177-1184.

## N

- Nakayama, M., Aihara, M., Chen, Y.-N., Araie, M., Tomita-Yokotani, K., & Iwashina, T. (2011). Neuroprotective effects of flavonoids on hypoxia-, glutamate-, and oxidative stress-induced retinal ganglion cell death. *Molecular Vision*, *17*, 1784-1793.
- Napoli, I., & Neumann, H. (2009). Microglial clearance function in health and disease. *Neuroscience*, *158*(3), 1030-1038.
- Neidhardt, F. C. (1987). *Escherichia coli and Salmonella typhimurium: cellular and molecular biology*. American Society for Microbiology.
- Nell, H. J., Au, J. L., Giordano, C. R., Terlecky, S. R., Walton, P. A., Whitehead, S. N., & Cechetto, D. F. (2017). Targeted Antioxidant, Catalase-SKL, Reduces Beta-Amyloid Toxicity in the Rat Brain. *Brain Pathology (Zurich, Switzerland)*, *27*(1), 86-94.
- Neuspiel, M., Schauss, A. C., Braschi, E., Zunino, R., Rippstein, P., Rachubinski, R. A., ... McBride, H. M. (2008). Cargo-selected transport from the mitochondria to peroxisomes is mediated by vesicular carriers. *Current Biology: CB*, *18*(2), 102-108.
- Novikoff, A. B., & Goldfischer, S. (1969). Visualization of peroxisomes (microbodies) and mitochondria with diaminobenzidine. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, *17*(10), 675-680.
- Novikoff, A. B., & Novikoff, P. M. (1982). MICROPEROXISOMES AND PEROXISOMES IN RELATION TO LIPID METABOLISM. *Annals of the New York Academy of Sciences*, *386*(1 Peroxisomes a), 138-152.
- Novikoff, A., & Shin, W.-Y. (1964). The endoplasmic reticulum in the Golgi zone and its relations to microbodies, Golgi apparatus and autophagic vacuoles in rat liver cells. *J Microsc*, p. 187–206.
- Novikoff, P. M., & Novikoff, A. B. (1972). Peroxisomes in absorptive cells of mammalian small intestine. *The Journal of Cell Biology*, *53*(2), 532-560.
- Ntanios, F. (2001). Plant sterol-ester-enriched spreads as an example of a new functional food. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.*, *5*.

## O

- Oaxaca-Castillo, D., Andreoletti, P., Vluggens, A., Yu, S., van Veldhoven, P. P., Reddy, J. K., & Cherkaoui-Malki, M. (2007). Biochemical characterization of two functional human liver acyl-CoA oxidase isoforms 1a and 1b encoded by a single gene. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *360*(2), 314-319.
- Ofman, R., Dijkstra, I. M. E., van Roermund, C. W. T., Burger, N., Turkenburg, M., van Cruchten, A., ... Kemp, S. (2010). The role of ELOVL1 in very long-chain fatty acid homeostasis and X-linked adrenoleukodystrophy. *EMBO Molecular Medicine*, *2*(3),
- Oh, P.-S., & Lim, K.-T. (2006). Glycoprotein (90 kDa) isolated from *Opuntia ficus-indica* var. saboten MAKINO lowers plasma lipid level through scavenging of intracellular radicals in Triton WR-1339-induced mice. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, *29*(7), 1391-1396.



- Opaliński, Ł., Veenhuis, M., & van der Klei, I. J. (2011). Peroxisomes: membrane events accompanying peroxisome proliferation. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 43(6), 847-851.
- Orth, T., Reumann, S., Zhang, X., Fan, J., Wenzel, D., Quan, S., & Hu, J. (2007). The PEROXIN11 protein family controls peroxisome proliferation in Arabidopsis. *The Plant Cell*, 19(1), 333-350.
- Oshino, N., Chance, B., Sies, H., & Bücher, T. (1973). The role of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> generation in perfused rat liver and the reaction of catalase compound I and hydrogen donors. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 154(1), 117-131.
- Osorio-Esquivel, O., Alicia-Ortiz, -Moreno, Álvarez, Valente, B., Dorantes-Álvarez, L., & Giusti, M., M. (2011). Phenolics, betacyanins and antioxidant activity in Opuntia joconostle fruits |. *Food Research International*, p. 2160-2168.
- Osumi, T., Hashimoto, T., & Ui, N. (1980). Purification and properties of acyl-CoA oxidase from rat liver. *Journal of Biochemistry*, 87(6), 1735-1746.

**P**

- Paintlia, A. S., Gilg, A. G., Khan, M., Singh, A. K., Barbosa, E., & Singh, I. (2003). Correlation of very long chain fatty acid accumulation and inflammatory disease progression in childhood X-ALD: implications for potential therapies. *Neurobiology of Disease*, 14(3), 425-439.
- Paintlia, M. K., Paintlia, A. S., Contreras, M. A., Singh, I., & Singh, A. K. (2008). Lipopolysaccharide-induced peroxisomal dysfunction exacerbates cerebral white matter injury: attenuation by N-acetyl cysteine. *Experimental Neurology*, 210(2), 560-576.
- Palevitch, D., Earon, G., & Levin, I. (1993). Treatment of benign prostatic hypertrophy with Opuntia ficus-indica (L.) Miller. *Journal of Herbs, Spices and Medicinal Plants (USA)*.
- Paoletti, F., Aldinucci, D., Mocali, A., & Caparrini, A. (1986). A sensitive spectrophotometric method for the determination of superoxide dismutase activity in tissue extracts. *Analytical Biochemistry*, 154(2), 536-541.
- Pascual, O., Achour, S. B., Rostaing, P., Triller, A., & Bessis, A. (2012). Microglia activation triggers astrocyte-mediated modulation of excitatory neurotransmission. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(4), E197-E205.
- Pawate, S., Shen, Q., Fan, F., & Bhat, N. R. (2004). Redox regulation of glial inflammatory response to lipopolysaccharide and interferongamma. *Journal of Neuroscience Research*, 77(4), 540-551.
- Peeters, A., Fraisl, P., van den Berg, S., Ver Loren van Themaat, E., Van Kampen, A., Rider, M. H., ... Baes, M. (2011). Carbohydrate metabolism is perturbed in peroxisome-deficient hepatocytes due to mitochondrial dysfunction, AMP-activated protein kinase (AMPK) activation, and peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  coactivator 1 $\alpha$  (PGC-1 $\alpha$ ) suppression. *The Journal of Biological Chemistry*, 286(49), 42162-42179.

- Peeters, A., Shinde, A. B., Dirkx, R., Smet, J., De Bock, K., Espeel, M., ... Baes, M. (2015). Mitochondria in peroxisome-deficient hepatocytes exhibit impaired respiration, depleted DNA, and PGC-1 $\alpha$  independent proliferation. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1853(2), 285-298.
- Pencreac'h, G., Devos, M., Poisson, L., Herault, J., Loiseau, C., & Ergan, F. (2004). Les microalgues marines : source alternative d'acide eicosapentaénoïque (EPA) et d'acide docosahexaénoïque (DHA). *Oléagineux, Corps gras, Lipides*, 11(2), 118-122.
- Perry, V. H., & Teeling, J. (2013). Microglia and macrophages of the central nervous system: the contribution of microglia priming and systemic inflammation to chronic neurodegeneration. *Seminars in Immunopathology*, 35(5), 601-612.
- Peters, T. J., Müller, M., & de Duve, A. C. (1972). LYSOSOMES OF THE ARTERIAL WALL. *The Journal of Experimental Medicine*, 136(5), 1117-1139.
- Platta, H. W., El Magraoui, F., Schlee, D., Grunau, S., Girzalsky, W., & Erdmann, R. (2007). Ubiquitination of the peroxisomal import receptor Pex5p is required for its recycling. *The Journal of Cell Biology*, 177(2), 197-204.
- Poirier, Y., Antonenkov, V. D., Glumoff, T., & Hiltunen, J. K. (2006). Peroxisomal beta-oxidation--a metabolic pathway with multiple functions. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1763(12), 1413-1426.
- Poljsak, B., & Milisav, I. (2012). The neglected significance of « antioxidative stress ». *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2012, 480895.
- Poll-The, B. T., Roels, F., Ogier, H., Scotto, J., Vamecq, J., Schutgens, R. B., ... Schram, A. W. (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.
- Poll-The, Bwee Tien, & Gärtner, J. (2012). Clinical diagnosis, biochemical findings and MRI spectrum of peroxisomal disorders. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1822(9), 1421-1429.
- Poll-The, Bwee Tien, Gootjes, J., Duran, M., De Klerk, J. B. C., Wenniger-Prick, L. J. M. de B., Admiraal, R. J. C., ... Barth, P. G. (2004). Peroxisome biogenesis disorders with prolonged survival: phenotypic expression in a cohort of 31 patients. *American Journal of Medical Genetics. Part A*, 126A(4), 333-338.
- Powers, J. M., Liu, Y., Moser, A. B., & Moser, H. W. (1992). The inflammatory myelinopathy of adreno-leukodystrophy: cells, effector molecules, and pathogenetic implications. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*, 51(6), 630-643.
- Psomiadou, E., & Tsimidou, M. (2001). Pigments in Greek virgin olive oils: occurrence and levels. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 81(7), 640-647.
- Purdue, P. E., & Lazarow, P. B. (1996). Targeting of human catalase to peroxisomes is dependent upon a novel COOH-terminal peroxisomal targeting sequence. *The Journal of Cell Biology*, 134(4), 849-862.
- Purdue, P. Edward, & Lazarow, P. B. (2001). Peroxisome Biogenesis. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 17(1), 701-752.

## Q

- Qin, Y. M., Poutanen, M. H., Helander, H. M., Kvist, A. P., Siivari, K. M., Schmitz, W., ... Hiltunen, J. K. (1997). Peroxisomal multifunctional enzyme of beta-oxidation metabolizing D-3-hydroxyacyl-CoA esters in rat liver: molecular cloning, expression and characterization. *Biochemical Journal*, 321(Pt 1), 21-28.

## R

- Ramadan, M. F., & Mörsel, J.-T. (2003). Recovered lipids from prickly pear [*Opuntia ficus-indica* (L.) Mill] peel: a good source of polyunsaturated fatty acids, natural antioxidant vitamins and sterols. *Food Chemistry*, 83(3), 447-456.
- Rao, M. S., & Reddy, J. K. (1987). Peroxisome proliferation and hepatocarcinogenesis. *Carcinogenesis*, 8(5), 631-636.
- Reddy, J. K., Goel, S. K., Nemali, M. R., Carrino, J. J., Laffler, T. G., Reddy, M. K., ... Lalwani, N. D. (1986). Transcription regulation of peroxisomal fatty acyl-CoA oxidase and enoyl-CoA hydratase/3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase in rat liver by peroxisome proliferators. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 83(6), 1747-1751.
- Reddy, J. K., & Hashimoto, T. (2001). Peroxisomal beta-oxidation and peroxisome proliferator-activated receptor alpha: an adaptive metabolic system. *Annual Review of Nutrition*, 21, 193-230.
- Reddy, J. K., & Mannaerts, G. P. (1994). Peroxisomal lipid metabolism. *Annual Review of Nutrition*, 14, 343-370. <https://doi.org/10.1146/annurev.nu.14.070194.002015>
- Reeves, P. (1995). Role of O-antigen variation in the immune response. *Trends in Microbiology*, 3(10), 381-386.
- Reyes-Aguero, J. A., Aguirre-Rivera, J. R., & Hernandez, H. M. (2005). Systematic notes and detailed description of *Opuntia ficus-indica* (L.) Mill. (Cactaceae). *Agrociencia*.
- Rhodin, J. A. G. (1954). *Correlation of ultrastructural organization: and function in normal and experimentally changed proximal convoluted tubule cells of the mouse kidney: an electron microscopic study*. Dept. of Anatomy, Karolinska Institutet, Stockholm.
- Rimm, E. B., Stampfer, M. J., Ascherio, A., Giovannucci, E., Colditz, G. A., & Willett, W. C. (1993). Vitamin E consumption and the risk of coronary heart disease in men. *The New England Journal of Medicine*, 328(20), 1450-1456.
- Rottensteiner, H., & Theodoulou, F. L. (2006). The ins and outs of peroxisomes: Co-ordination of membrane transport and peroxisomal metabolism. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 1763(12), 1527-1540.
- Rouiller, C., & Bernhard, W. (1956). « Microbodies » and the problem of mitochondrial regeneration in liver cells. *The Journal of Biophysical and Biochemical Cytology*, 2(4), 355-360.

- Saenz, C. (2000). Processing technologies: an alternative for cactus pear (*Opuntia* spp.) fruits and cladodes. *Journal of Arid Environments*, 46(3), 209-225.
- Salido, E., Pey, A. L., Rodriguez, R., & Lorenzo, V. (2012). Primary hyperoxalurias: disorders of glyoxylate detoxification. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1822(9), 1453-1464.
- Salpietro, V., Phadke, R., Saggari, A., Hargreaves, I. P., Yates, R., Fokoloros, C., ... Kinali, M. (2015). Zellweger syndrome and secondary mitochondrial myopathy. *European Journal of Pediatrics*, 174(4), 557-563.
- Sánchez, E., García, S., & Heredia, N. (2010). Extracts of edible and medicinal plants damage membranes of *Vibrio cholerae*. *Applied and Environmental Microbiology*, 76(20), 6888-6894.
- Sawaya, W. N., Khalil, J. K., & Al-Mohammad, M. M. (1983). Nutritive value of prickly pear seeds, *Opuntia ficus-indica*. *Plant Foods for Human Nutrition*, 33(1), 91-97.
- Sawaya, W. N., Khatchadourian, H. A., Safi, W. M., & Al-Muhammad, H. M. (1983). Chemical characterization of prickly pear pulp, *Opuntia ficus-indica*, and the manufacturing of prickly pear jam. *International Journal of Food Science & Technology*, 18(2), 183-193.
- Schackmann, M. J. A., Ofman, R., Dijkstra, I. M. E., Wanders, R. J. A., & Kemp, S. (2015). Enzymatic characterization of ELOVL1, a key enzyme in very long-chain fatty acid synthesis. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1851(2), 231-237.
- Schaffer, S., Schmitt-Schillig, S., Müller, W. E., & Eckert, G. P. (2005). Antioxidant properties of Mediterranean food plant extracts: geographical differences. *Journal of Physiology and Pharmacology: An Official Journal of the Polish Physiological Society*, 56 Suppl 1, 115-124.
- Schrader, M., & Fahimi, H. D. (2004). Mammalian peroxisomes and reactive oxygen species. *Histochemistry and Cell Biology*, 122(4), 383-393.
- Schrader, M., & Fahimi, H. D. (2008). The peroxisome: still a mysterious organelle. *Histochemistry and Cell Biology*, 129(4), 421-440.
- Setoyama, C., Tamaoki, H., Nishina, Y., Shiga, K., & Miura, R. (1995). Functional expression of two forms of rat acyl-CoA oxidase and their substrate specificities. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 217(2), 482-487.
- Shnitka, T. K. (1966). Comparative ultrastructure of hepatic microbodies in some mammals and birds in relation to species differences in uricase activity. *Journal of Ultrastructure Research*, 16, 598-625.
- Sies, H. (2017). Hydrogen peroxide as a central redox signaling molecule in physiological oxidative stress: Oxidative eustress. *Redox Biology*, 11, 613-619.
- Singh, I. (1996). Mammalian peroxisomes: metabolism of oxygen and reactive oxygen species. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 804, 612-627.
- Smith, J. J., & Aitchison, J. D. (2009). Regulation of Peroxisome dynamics. *Current opinion in cell biology*, 21(1), 119-126.

- Soel, S. M., Choi, O. S., Bang, M. H., Yoon Park, J. H., & Kim, W. K. (2007). Influence of conjugated linoleic acid isomers on the metastasis of colon cancer cells in vitro and in vivo. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 18(10), 650-657.
- Soltys, Z., Ziaja, M., Pawłński, R., Setkowicz, Z., & Janeczko, K. (2001). Morphology of reactive microglia in the injured cerebral cortex. Fractal analysis and complementary quantitative methods. *Journal of Neuroscience Research*, 63(1), 90-97.
- Song, F., Zeng, K., Liao, L., Yu, Q., Tu, P., & Wang, X. (2016). Schizandrin A Inhibits Microglia-Mediated Neuroninflammation through Inhibiting TRAF6-NF- $\kappa$ B and Jak2-Stat3 Signaling Pathways. *PLoS One*, 11(2), e0149991.
- Stolz, D. B., Zamora, R., Vodovotz, Y., Loughran, P. A., Billiar, T. R., Kim, Y.-M., ... Watkins, S. C. (2002). Peroxisomal localization of inducible nitric oxide synthase in hepatocytes. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 36(1), 81-93.
- Strack, D., Vogt, T., & Schliemann, W. (2003). Recent advances in betalain research. *Phytochemistry*, 62(3), 247-269.
- Suzuki, Y., Iai, M., Kamei, A., Tanabe, Y., Chida, S., Yamaguchi, S., ... Kondo, N. (2002). Peroxisomal acyl CoA oxidase deficiency. *The Journal of Pediatrics*, 140(1), 128-130.
- SZALO, I. M., TAMINIAU, B., & MAINIL, J. (2006). Le lipopolysaccharide d'Escherichia coli : structure, biosynthèse et rôles. *Ann. Méd. Vét.*, 17(150), 108-124.

## T

- Tabak, H. F., Murk, J. L., Braakman, I., & Geuze, H. J. (2003). Peroxisomes start their life in the endoplasmic reticulum. *Traffic (Copenhagen, Denmark)*, 4(8), 512-518.
- Tanamoto, K., Zähringer, U., McKenzie, G. R., Galanos, C., Rietschel, E. T., Lüderitz, O., ... Shiba, T. (1984). Biological activities of synthetic lipid A analogs: pyrogenicity, lethal toxicity, anticomplement activity, and induction of gelation of *Limulus* amoebocyte lysate. *Infection and Immunity*, 44(2), 421-426.
- Terlecky, S. R., Terlecky, L. J., & Giordano, C. R. (2012). Peroxisomes, oxidative stress, and inflammation. *World Journal of Biological Chemistry*, 3(5), 93-97.
- Tesoriere, L., Attanzio, A., Allegra, M., Gentile, C., & Livrea, M. A. (2014). Indicaxanthin inhibits NADPH oxidase (NOX)-1 activation and NF- $\kappa$ B-dependent release of inflammatory mediators and prevents the increase of epithelial permeability in IL-1 $\beta$ -exposed Caco-2 cells. *The British Journal of Nutrition*, 111(3), 415-423.
- Thiemermann, C., Ruetten, H., Wu, C. C., & Vane, J. R. (1995). The multiple organ dysfunction syndrome caused by endotoxin in the rat: attenuation of liver dysfunction by inhibitors of nitric oxide synthase. *British Journal of Pharmacology*, 116(7), 2845-2851.
- Thoms, S., Grønberg, S., & Gärtner, J. (2009). Organelle interplay in peroxisomal disorders. *Trends in Molecular Medicine*, 15(7), 293-302.
- Titorenko, V. (2001). Dynamics of peroxisome assembly and function. *Trends in Cell Biology*, 11, 22-29.
- Tolbert, N. E., & Essner, E. (1981). Microbodies: peroxisomes and glyoxysomes. *The Journal of Cell Biology*, 91(3), 271s-283s.



Tremblay, M.-È., Lecours, C., Samson, L., Sánchez-Zafra, V., & Sierra, A. (2015). From the Cajal alumni Achúcarro and Río-Hortega to the rediscovery of never-resting microglia. *Frontiers in Neuroanatomy*, 9, 45.

V

Vamecq, J., & Draye, J. P. (1989). Pathophysiology of peroxisomal beta-oxidation. *Essays in Biochemistry*, 24, 115-225.

van den Bosch, H., Schutgens, R. B., Wanders, R. J., & Tager, J. M. (1992). Biochemistry of peroxisomes. *Annual Review of Biochemistry*, 61, 157-197.

van Roermund, C. W. T., Visser, W. F., Ijlst, L., Waterham, H. R., & Wanders, R. J. A. (2011). Differential substrate specificities of human ABCD1 and ABCD2 in peroxisomal fatty acid  $\beta$ -oxidation. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1811(3), 148-152.

Van Veldhoven, P. P., & Mannaerts, G. P. (1999). Role and organization of peroxisomal beta-oxidation. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 466, 261-272.

Van Veldhoven, P. P., Vanhove, G., Asselberghs, S., Eyssen, H. J., & Mannaerts, G. P. (1992). Substrate specificities of rat liver peroxisomal acyl-CoA oxidases: palmitoyl-CoA oxidase (inducible acyl-CoA oxidase), pristanoyl-CoA oxidase (non-inducible acyl-CoA oxidase), and trihydroxycoprostanoyl-CoA oxidase. *The Journal of Biological Chemistry*, 267(28), 20065-20074.

Van Veldhoven, Paul P. (2010). Biochemistry and genetics of inherited disorders of peroxisomal fatty acid metabolism. *Journal of Lipid Research*, 51(10), 2863-2895.

Varanasi, U., Chu, R., Chu, S., Espinosa, R., LeBeau, M. M., & Reddy, J. K. (1994). Isolation of the human peroxisomal acyl-CoA oxidase gene: organization, promoter analysis, and chromosomal localization. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 91(8), 3107-3111.

Vetrano, A. M., Heck, D. E., Mariano, T. M., Mishin, V., Laskin, D. L., & Laskin, J. D. (2005). Characterization of the oxidase activity in mammalian catalase. *The Journal of Biological Chemistry*, 280(42), 35372-35381.

von Bernhardi, R., Eugenín-von Bernhardi, L., & Eugenín, J. (2015). Microglial cell dysregulation in brain aging and neurodegeneration. *Frontiers in Aging Neuroscience*, 7, 124.

W

Walker, F. R., Beynon, S. B., Jones, K. A., Zhao, Z., Kongsui, R., Cairns, M., & Nilsson, M. (2014). Dynamic structural remodelling of microglia in health and disease: a review of the models, the signals and the mechanisms. *Brain, Behavior, and Immunity*, 37, 1-14.

Walton, P. A., & Pizzitelli, M. (2012). Effects of peroxisomal catalase inhibition on mitochondrial function. *Frontiers in Physiology*, 3, 108.

Wanders, B. J., Denis, S. W., & Dacremont, G. (1993). Studies on the substrate specificity of the inducible and non-inducible acyl-CoA oxidases from rat kidney peroxisomes. *Journal of Biochemistry*, 113(5), 577-582.

- Wanders, R. J. A., Ferdinandusse, S., Brites, P., & Kemp, S. (2010). Peroxisomes, lipid metabolism and lipotoxicity. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1801(3), 272-280.
- Wanders, R. J., & Tager, J. M. (1998). Lipid metabolism in peroxisomes in relation to human disease. *Molecular Aspects of Medicine*, 19(2), 69-154.
- Wanders, R. J., van Roermund, C. W., Brul, S., Schutgens, R. B., & Tager, J. M. (1992). Bifunctional enzyme deficiency: identification of a new type of peroxisomal disorder in a patient with an impairment in peroxisomal beta-oxidation of unknown aetiology by means of complementation analysis. *Journal of Inherited Metabolic Disease*, 15(3), 385-388.
- Wanders, Ronald J. A. (2013). Peroxisomes in human health and disease: metabolic pathways, metabolite transport, interplay with other organelles and signal transduction. *Sub-Cellular Biochemistry*, 69, 23-44.
- Wanders, Ronald J. A., Komen, J., & Ferdinandusse, S. (2011). Phytanic acid metabolism in health and disease. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1811(9), 498-507.
- Wanders, Ronald J. A., & Waterham, H. R. (2006a). Biochemistry of mammalian peroxisomes revisited. *Annual Review of Biochemistry*, 75, 295-332.
- Wanders, Ronald J. A., & Waterham, H. R. (2006b). Peroxisomal disorders: the single peroxisomal enzyme deficiencies. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1763(12), 1707-1720.
- Wang, B., Van Veldhoven, P. P., Brees, C., Rubio, N., Nordgren, M., Apanasets, O., ... Fransen, M. (2013). Mitochondria are targets for peroxisome-derived oxidative stress in cultured mammalian cells. *Free Radical Biology & Medicine*, 65, 882-894.
- Wang, T., Liu, B., Qin, L., Wilson, B., & Hong, J. S. (2004). Protective effect of the SOD/catalase mimetic MnTMPyP on inflammation-mediated dopaminergic neurodegeneration in mesencephalic neuronal-glia cultures. *Journal of Neuroimmunology*, 147(1-2), 68-72.
- Wang, Y., Gao, H., Zhang, W., Zhang, W., & Fang, L. (2015). Thymoquinone inhibits lipopolysaccharide-induced inflammatory mediators in BV2 microglial cells. *International Immunopharmacology*, 26(1), 169-173.
- Waterham, H. R., Ferdinandusse, S., & Wanders, R. J. A. (2016). Human disorders of peroxisome metabolism and biogenesis. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1863(5), 922-933.
- Wilson, B. A., Salyers, A. A., Whitt, D. D., & Winkler, M. E. (2011). Bacterial pathogenesis: a molecular approach. *Bacterial Pathogenesis: A Molecular Approach.*, (Ed. 3).
- Yang, B., & Kallio, H. P. (2001). Fatty acid composition of lipids in sea buckthorn (*Hippophaë rhamnoides* L.) berries of different origins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(4), 1939-1947.

## Y

- Yeldandi, A. V., Yeldandi, V., Kumar, S., Murthy, C. V., Wang, X. D., Alvares, K., ... Reddy, J. K. (1991). Molecular evolution of the urate oxidase-encoding gene in hominoid primates: nonsense mutations. *Gene*, 109(2), 281-284., Y. (2015). Pex11mediates



peroxisomal proliferation by promoting deformation of the lipid membrane. *Biology Open*, 4(6), 710-721.

You, B. R., & Park, W. H. (2010). Gallic acid-induced lung cancer cell death is related to glutathione depletion as well as reactive oxygen species increase. *Toxicology in Vitro: An International Journal Published in Association with BIBRA*, 24(5), 1356-1362.

## Z

Zaar, K., Angermüller, S., Völkl, A., & Fahimi, H. D. (1986). Pipecolic acid is oxidized by renal and hepatic peroxisomes. Implications for Zellweger's cerebro-hepato-renal syndrome (CHRS). *Experimental Cell Research*, 164(1), 267-271.

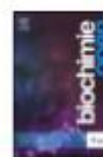
Zaar, Kurt, Köst, H.-P., Schad, A., Völkl, A., Baumgart, E., & Fahimi, H. D. (2002). Cellular and subcellular distribution of D-aspartate oxidase in human and rat brain. *The Journal of Comparative Neurology*, 450(3), 272-282.

Zarrouk, H., Karibian, D., Bodie, S., Perry, M. B., Richards, J. C., & Caroff, M. (1997). Structural characterization of the lipids A of three *Bordetella bronchiseptica* strains: variability of fatty acid substitution. *Journal of Bacteriology*, 179(11), 3756-3760.

Zou, D., Brewer, M., Garcia, F., Feugang, J. M., Wang, J., Zang, R., ... Zou, C. (2005). Cactus pear: a natural product in cancer chemoprevention. *Nutrition Journal*, 4(1), 25.

# *Annexes*

---



Research paper

# Argan oil prevents down-regulation induced by endotoxin on liver fatty acid oxidation and gluconeogenesis and on peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator-1 $\alpha$ , (PGC-1 $\alpha$ ), peroxisome proliferator-activated receptor $\alpha$ (PPAR $\alpha$ ) and estrogen related receptor $\alpha$ (ERR $\alpha$ )

Riad El Kebbaj<sup>a,b,c</sup>, Pierre Andreoletti<sup>a</sup>, Hammam I. El Hajj<sup>a</sup>, Youssef El Kharrassi<sup>a,b</sup>, Joseph Vamecq<sup>d</sup>, Stéphane Mandard<sup>e</sup>, Fatima-Ezzahra Saih<sup>a,b</sup>, Norbert Latruffe<sup>a</sup>, M'Hammed Saïd El Kebbaj<sup>f</sup>, Gérard Lizard<sup>a</sup>, Boubker Nasser<sup>b</sup>, Mustapha Cherkaoui-Malki<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup>Univ. Bourgogne-Franche Comté, Laboratoire BioPeroxII. (Biochimie du Peroxysome, Inflammation et Métabolisme Lipidique), EA 7270, 21000 Dijon, France

<sup>b</sup>Laboratoire de Biochimie et Neurosciences, Faculté des Sciences et Techniques, Université Hassan I, BP 577, 26 000 Settat, Morocco

<sup>c</sup>Laboratoire des Sciences et Technologies de la Santé, Institut supérieur des sciences de la santé Université Hassan I, Route de Casablanca, 14 BP 539, 26 000 Settat, Morocco

<sup>d</sup>INSERM and HMNO, CBP, CHRU Lille, 59037 Lille and RADEME EA 7364, Faculté de Médecine, Université de Lille 2, 59045 Lille, France

<sup>e</sup>Lipness Team, INSERM, Research Center UMR866 and LabEx LipSTIC, Université de Bourgogne-Franche Comté, Dijon, France

<sup>f</sup>Laboratoire de recherche sur les lipoprotéines et l'Athérosclérose, Faculté des Sciences Ben M'sik, Avenue Cdt Driss El Harti, BP 7955, Université Hassan II-Mohammedia-Casablanca, Morocco

Received 15 May 2015; accepted 20 October 2015

Available online 31 October 2015

## Abstract

In patients with sepsis, liver metabolism and its capacity to provide other organs with energetic substrates are impaired. This and many other pathophysiological changes seen in human patients are reproduced in mice injected with purified endotoxin (lipopolysaccharide, LPS). In the present study, down-regulation of genes involved in hepatic fatty acid oxidation (FAOx) and gluconeogenesis in mice exposed to LPS was challenged by nutritional intervention with Argan oil. Mice given a standard chow supplemented or not with either 6% (w/w) Argan oil (AO) or 6% (w/w) olive oil (OO) prior to exposure to LPS were explored for liver gene expressions assessed by mRNA transcript levels and/or enzyme activities. AO (or OO) food supplementation reveals that, in LPS-treated mice, hepatic expression of genes involved in FAOx and gluconeogenesis was preserved. This preventive protection might be related to the recovery of the gene expressions of nuclear receptors peroxisome proliferator-activated receptor  $\alpha$  (PPAR $\alpha$ ) and estrogen related receptor  $\alpha$  (ERR $\alpha$ ) and their coactivator peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator-1 $\alpha$ , (PGC-1 $\alpha$ ). These preventive mechanisms conveyed by AO against LPS-induced metabolic dysregulation might add new therapeutic potentialities in the management of human sepsis.

© 2015 The Authors. Published by Elsevier B.V. on behalf of Société Française de Biochimie et Biologie Moléculaire (SFBBM).

This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

**Keywords:** Argan oil; Beta-oxidation; Coactivator; Gluconeogenesis; Nuclear receptor.

**Abbreviations:** ACADS, acyl CoA dehydrogenase short-chain; ACADM, acyl CoA dehydrogenase medium-chain; ACADL, acyl CoA dehydrogenase long-chain; AO, Argan oil; ACOX1, acyl-CoA oxidase 1; ERR $\alpha$ , estrogen related receptor  $\alpha$ ; G6PH, glucose-6-phosphatase; Glut2, glucose transporter 2; Glut4, glucose transporter 4; HNF-4 $\alpha$ , hepatic nuclear factor-4 $\alpha$ ; OO, olive oil; LPS, lipopolysaccharide; PGC-1 $\alpha$ , peroxisome proliferator-

activated receptor  $\gamma$  coactivator-1 $\alpha$ ; PEPCCK, phosphoenolpyruvate carboxykinase; PPAR $\alpha$ , peroxisome proliferator-activated receptor  $\alpha$ .

\* Corresponding author. Laboratoire BioPeroxII, EA7270, Univ. Bourgogne-Franche Comté, Faculté des Sciences Gabriel, 6 Bd Gabriel, 21000 Dijon, France. Tel.: +33 380396205.

E-mail address: [malki@u-bourgogne.fr](mailto:malki@u-bourgogne.fr) (M. Cherkaoui-Malki).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.biopen.2015.10.002>

2214-0085/© 2015 The Authors. Published by Elsevier B.V. on behalf of Société Française de Biochimie et Biologie Moléculaire (SFBBM). This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

## 1. Introduction

Bacterial infection is a common cause of sepsis, a pathological state inducing a severe organ dysfunction and a high mortality rate, and requiring intensive care [1–3]. This acute syndrome is associated with systemic inflammation and disturbed metabolism [4,5]. During bacterial infection, release in the host of endotoxins (lipopolysaccharides, LPS) from gram-negative bacteria membrane generates a potent inflammatory cytokine response and severely impairs lipid metabolism, inducing reduced serum high density lipoprotein (HDL), increased plasma free fatty acids and triglycerides levels [3]. These metabolic changes are mainly accounted for by enhanced hepatic triglyceride synthesis and adipose tissue lipolysis combined with a drop in fatty acid oxidation (FAOx) in several tissues including heart, kidney, liver and skeletal muscle [3,6–10]. The downregulation of FAOx by LPS is correlated with decreased expressions of the nuclear receptor Peroxisome Proliferator-Activated Receptor (PPAR) $\alpha$  and its coactivator PPAR $\gamma$  Coactivator (PGC)-1 $\alpha$ , which physiologically work in concert to regulate FAOx-related gene expressions [11,12]. In this respect, ligand-dependent activation of the nuclear receptor PPAR $\alpha$  prompts its heterodimerization with Retinoid X Receptor (RXR) $\alpha$  [13,14]. The PPAR $\alpha$ /RXR $\alpha$  complex binds to PPAR $\alpha$ -response elements (PPRE) of target genes which may code for mitochondrial and peroxisomal enzymes involved in fatty acid  $\beta$ -oxidation pathways such as carnitine palmitoyl transferase 1 (CPT1a and CPT1b), short-, medium-, long- and very long-chain acyl CoA dehydrogenases (ACADS, ACADM, ACADL and ACADVL) [15–19], acyl-CoA oxidase 1 (ACOX1) [17,20,21] and other proteins [12,22]. On the other hand, Lipin-1, a phosphatidate phosphatase, has arisen as an additional transcriptional co-regulator of PPAR $\alpha$ -PGC-1 $\alpha$ -directed gene expression [23]. Its interaction with PPAR $\alpha$ -PGC1 $\alpha$  complex promotes the induction of FAOx genes [24]. Beside PPAR $\alpha$ , estrogen related receptor (ERR)  $\alpha$  or (ESRR $\alpha$ ), an orphan nuclear receptor, has been also shown to regulate energy metabolism gene expression [25,26], particularly genes involved in FAOx [27,28]. This transcriptional regulation involves interaction with PCG-1 $\alpha$  coactivator through a protein motif specifically dedicated to ERR $\alpha$  [29,30]. In liver, another interaction of PGC-1 $\alpha$  is also observed for hepatic nuclear factor-4 $\alpha$  (HNF-4 $\alpha$ ) to control genes coding gluconeogenesis proteins (phosphoenolpyruvate carboxykinase (PEPCK), glucose-6-phosphatase (G6PH)) and glucose transporter 4 (Glut4) [31].

More than 20% of patients with sepsis develop liver dysfunction [1] and hence dysregulation of hepatic metabolism and reduced energy supply for other organs. In mouse models of sepsis, injection of purified LPS triggers many pathophysiological changes resembling those described in human patients [32]. Though down-regulatory mechanisms by which LPS impacts FAOx have been extensively studied, little attention has been actually paid to mechanisms capable of preserving normal FAOx and inflammation status. Interestingly, supplementation of parenteral nutrition with fish oil to patients, during the postoperative period, revealed lowest levels of circulating inflammatory mediators [33–35]. Accordingly, polyunsaturated fatty acid-rich diet

has been reported to reduce acute inflammation and to promote anti-inflammatory process in mice [36]. Therefore, lipid nutritional support might help the prevention of not only inflammatory damages but also disrupted lipid homeostasis.

Argan edible oil (AO) is obtained by cold-pressure of roasted kernels from *Argania spinosa* [L.] Skeels, a singular Mediterranean species growing in the southwestern region of Morocco. Argan oil is used as a traditional food ingredient in the 'Amazigh diet', bringing almost 25% of total diet fat intake to indigenous consumers [37]. Accordingly, early clinical studies on Argan oil reported a decrease in plasma low density lipoprotein-cholesterol (LDL-cholesterol) and lipid hydroperoxides along with a rise in plasma tocopherol concentration [38]. Health benefits of this delectable virgin oil have been highlighted by several studies documenting its cardiovascular protective potential including hypocholesterolemic and hypotriglyceridemic properties in consumer populations [39–41]. AO has been also shown to reduce circulating LDL-cholesterol and ApoB and, in AO consumers, to increase HDL and ApoAI [40,41] whereas in human macrophages it increases HDL-mediated cholesterol efflux and reduces LDL-lipid peroxidation [38,39].

Therefore, in an attempt to test our hypothesis regarding the preventive effects of Argan oil against LPS-induced FAOx downregulation, mice pretreated with AO were subsequently injured by LPS to determine whether an experimental support may be or not given to this working hypothesis. The effects of AO against sepsis-associated liver hyperlipidemia are compared to those of olive oil (OO), a more usual ingredient in Mediterranean diets. We report here that, in fact, AO-enriched diet prevents LPS-associated hyperlipidemic effect through the induction of the hepatic expressions of PPAR $\alpha$ , ERR $\alpha$  and their coactivator PGC-1 $\alpha$  along with the up-regulation of their mitochondrial (ACADS, ACADM, ACADVL) and peroxisomal (ACOX1) target genes.

## 2. Material and methods

### 2.1. Argan oil treatment

Swiss OF1 mice (12–16 week-old) were obtained from IFFA CREDO (Casablanca). They were acclimatized in the laboratory for 10 days at  $22 \pm 2$  °C with standard chow and water *ad libitum*. Animal studies were conducted in accordance with the protocols of Animal Use and Care of the University of Hassan 1st, Settat, Morocco. The virgin Argan oil used in this work was obtained from the Aklim area in the northeast of Morocco. Six groups of mice (5 mice/group) received during 25 days: a standard chow (2 groups, control); a standard chow supplemented with 6% (w/w) of Argan oil (2 groups, AO) or a standard chow supplemented with 6% (w/w) of olive oil (2 groups, OO). Oils were included in the diets by direct mixing with the standard animal chow. Sixteen hours before euthanasia and during the fed state, one group from control (+LPS), AO (AO + LPS) and OO (OO + LPS) respectively received (5 mg/kg) intraperitoneal injections of 100  $\mu$ g of *Escherichia coli* 0111:B4 LPS (Sigma) resuspended in phosphate-buffered saline (PBS) or an equal volume of PBS alone.



## 2.2. Composition of oils

Both Argan and olive oils (AO and OO) contain mono and polyunsaturated fatty acids. However, Argan oil has 35% of C18:2n-6 and 45% of C18:1n-9 while olive oil shows only 6% of C18:2n-6 and more than 75% of C18:1n-9, leading to a higher unsaturation index of AO (120.4) versus OO (108.3) [42].

## 2.3. Quantitative PCR analysis

Total RNA from liver was extracted using the RNeasy Mini kit (Qiagen) following the manufacturer's instructions. cDNA was generated by reverse transcription using Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase (Promega) according to the manufacturer's protocol and analyzed by quantitative PCR using the GoTaq<sup>®</sup> qPCR Master Mix (Promega), and a StepOnePlus Real-Time PCR System (Applied Biosystem). The primer sequences were chosen using the Beacon Designer Software (Bio-Rad). Oligonucleotide sequences are shown in the [Supplementary Table 1](#). PCR reactions were carried out in duplicate in a final volume of 12.5  $\mu$ L containing 6.25  $\mu$ L of MESA Green qPCR Master mix (Eurogentec), 2.5  $\mu$ L of cDNA and forward and reverse primers at 300 nM. The PCR enzyme (*Taq* DNA polymerase) was heat-activated at 95 °C for 10 min, and the DNA was amplified for 40 cycles at 95 °C for 15 s, 60 °C for 30 s, and 72 °C for 30 s, followed by a melting curve analysis to control the absence of nonspecific products. For each transcript, the amplification efficiency was determined by the slope of the standard curve generated from two fold serial dilutions of cDNA. Gene expression was quantified using cycle to threshold (Ct) values and normalized by the reference gene, *36B4* encoding the acidic ribosomal phosphoprotein P0. To this end, the quantitative gene expression was determined according to  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  with  $\Delta Ct = (Ct \text{ of the gene studied}) - (Ct \text{ of the } 36B4 \text{ gene})$ .

## 2.4. Enzymatic activity measurements

One hundred mg of liver tissue were homogenized by a Potter-Elvehjelm homogenizer in 0.2 ml of a buffer containing 250 mmol/L sucrose, 20 mmol/L Tris-HCl pH 7.5 and 2 mmol/L EDTA. After centrifugation at 600 g for 5 min at 4 °C, the supernatant was collected and stored at -80 °C until use. Peroxisomal acyl-CoA oxidase (ACOX1) activity was measured by the fluorometric assay using palmitoyl-CoA as a substrate as described previously [43]. Catalase activity was monitored at 240 nm as described elsewhere [44]. Mitochondrial acyl-CoA dehydrogenase activities were followed at 600 nm on acyl-CoAs of different chain lengths (for experimental details, see legends to figures) [45].

## 2.5. Statistical analysis

Statistical analyses to compare two experimental groups were performed with, an unpaired, two-tailed, Student-t test (Excel software) for calculating the probability values and data were considered statistically different at a P-value of 0.05 or less.

## 3. Results

### 3.1. Body weight under experimental diets

[Fig. S1](#) shows the time-course of body weights evolution during the nutritional intervention. Each group of mice was weighted at four different time points during the 3 weeks that precede the LPS administration; no significant differences in body weight have been found between the different experimental groups.

### 3.2. Argan oil modulates the expression of PPAR $\alpha$ , PGC-1 $\alpha$ and related target genes

Interestingly, polyunsaturated fatty acids are known to be activators of PPAR $\alpha$ , a nuclear receptor which governs lipid metabolism and fatty acid oxidation [46]. Here we report ([Fig. 1A](#)) that mice treated with AO or OO showed a significant increase in hepatic PPAR $\alpha$  mRNA, while the mRNA expression of ERR $\alpha$  displayed no significant variation ([Fig. 1B](#)). Intriguingly, the expression of PGC-1 $\alpha$  mRNA was specifically down regulated by AO ([Fig. 1C](#)). However, the expression of PPAR $\alpha$  target genes (i.e. *ACOX1* and *ACADM*) was clearly induced by both AO and OO, while *ACADS* mRNA level was only increased by AO ([Fig. 1E, F](#)). Regarding the mitochondrial fatty acid beta-oxidation activities, only short (C4:0)-, long (C12:0)- and very long (C16:0)-acyl-CoA mitochondrial dehydrogenases were increased but not the medium (C:8) acyl-CoA dehydrogenase activity ([Fig. 2C, D](#)). By contrast to mitochondria, peroxisomal palmitoyl-CoA oxidase was not changed and only peroxisomal catalase activity was induced by AO or OO ([Fig. 2A](#)). These results support experimentally that AO and OO up-regulate specifically mitochondrial fatty acid  $\beta$ -oxidation (except for the medium chain) and peroxisomal catalase activities ([Fig. 2B](#)).

### 3.3. LPS induces selective changes in mitochondrial and peroxisomal FAOx gene expression

Consistent with previous studies [47,48], treatment with LPS strongly decreased the expression of nuclear receptors, PPAR $\alpha$  and ERR $\alpha$ , mRNA levels in mouse liver ([Fig. 1A, B](#)). LPS also decreased the hepatic expression of mRNA level of PGC-1 $\alpha$ . However in these conditions, lipin-1, which may interact with PGC-1 $\alpha$  [24], showed enhanced mRNA levels ([Fig. 1D](#)). Measurements of the expression of mitochondrial and peroxisomal FAOx gene products at two stages (mRNA levels and enzyme activities) and 16 h after LPS injection showed a selective decrease of *ACADS* without changes in *ACOX1*, *ACADM* and *ACADVL* mRNA expressions ([Fig. 1E, F](#)). In addition, LPS treatment led to a reduction of mitochondrial *ACADS* enzyme activity ([Fig. 2C](#)) and also, as further discussed, of peroxisomal *ACOX1* activity ([Fig. 2A](#)), while the activity of peroxisomal catalase was enhanced ([Fig. 2B](#)).

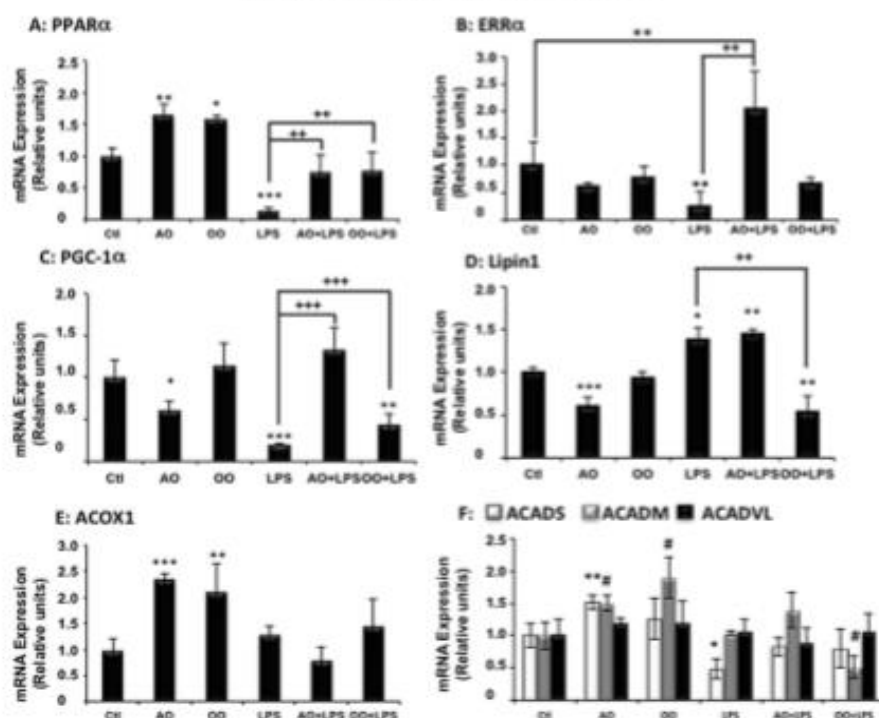


Fig. 1. Argan oil preserves hepatic mRNA expressions of nuclear receptors  $PPAR\alpha$  and  $ERR\alpha$ , coactivator  $PGC-1\alpha$  and target genes during exposure of mice to LPS. Real-time PCR was used to quantify the hepatic mRNA levels of  $PPAR\alpha$  (A) and  $ERR\alpha$  (B), coactivators  $PGC-1\alpha$  (C) and lipin-1 (D) their target genes:  $Acox1$  (E),  $Acads$ ,  $Acadm$  and  $Acadvl$  (F). All real-time PCR reactions were performed in duplicate. All values are means  $\pm$  SEM ( $n = 5$ /group) and are normalized to control mice. Symbols (\*, # and +) correspond to a statistical significance of higher mean signal intensity, ( $p < 0.01$  for  $^{###}$  and  $^{+++}$ ,  $p < 0.02$  for  $^{**}$  and  $^{++}$ ,  $p < 0.05$  for  $^+$  and  $^\#$ ), compared with the control (\*) or with the LPS-treated mice (+). Mice received for 25 days a standard chow (control); a standard chow supplemented with 6% (w/w) of Argan oil (AO) or a standard chow supplemented with 6% (w/w) of olive oil (OO). Sixteen hours before euthanasia, one group from control (+LPS), AO (AO + LPS) and OO (OO + LPS) respectively received intraperitoneal injection of 100  $\mu$ g LPS.

#### 3.4. Argan oil protects against the drops induced by LPS in hepatic expression of $PPAR\alpha$ , $ERR\alpha$ and coactivator $PGC-1\alpha$

To evaluate the direct therapeutic benefit of Argan oil (AO), mice were pretreated with AO for 24 days before LPS injection taking place 16 h prior to euthanasia. The effects of AO were compared to those of OO, and as illustrated by Fig. 1A, preserved levels of  $PPAR\alpha$  mRNA were observed in AO + LPS-treated mouse livers, being comparable to protection observed in livers from OO + LPS-treated mice (Fig. 1A). By contrast, only AO + LPS induced substantial significant increases in liver expression of  $ERR\alpha$  and  $PGC-1\alpha$  mRNA when compared to LPS alone, while OO + LPS induced only a modest significant increase in  $PGC-1\alpha$  mRNA level (Fig. 1B and C). At the opposite, pretreatment with AO + LPS showed an equal increase in levels of Lipin-1 mRNA as in LPS group, revealing no effect of AO. However, combined OO pretreatment and LPS injury reduced significantly the expression of Lipin-1 mRNA (Fig. 1D). Evaluation of mRNA levels of  $PPAR\alpha$  target genes involved in mitochondrial and peroxisomal FAOx (Fig. 1E, F) showed that

LPS provoked only a decrease in  $ACADS$  mRNA, being without significant effects on mRNA levels of  $ACADM$ ,  $ACADVL$  and  $ACOX1$ . Measurements of FAOx enzyme activities revealed that the selective reduction by LPS treatment of  $ACOX1$  and  $ACADS$  (C4:0) activities were prevented by AO or OO (AO + LPS or OO + LPS), while for the other dehydrogenase activities, no effects of the oils were observed except for C16:0 with AO + LPS versus LPS (Fig. 2A, C and D). The enhanced activity of peroxisomal catalase, after LPS treatment, was preserved by OO pretreatment (OO + LPS) and to a lesser extent by AO (AO + LPS) (Fig. 2B).

#### 3.5. Argan oil preserves hepatic gluconeogenesis gene expressions during LPS-induced liver dysfunction

$HNF4\alpha$  is a critical nuclear receptor of  $PGC-1\alpha$ -mediated gluconeogenesis and controls the expression of gluconeogenic genes (PEPCK, G6PH) [31]. Here we showed that AO and OO treatments had no effect on the mRNA level of  $HNF4\alpha$ , and 16 h after LPS administration, there was still no change in the expression of  $HNF4\alpha$  (Fig. 3A), though the expression of its known



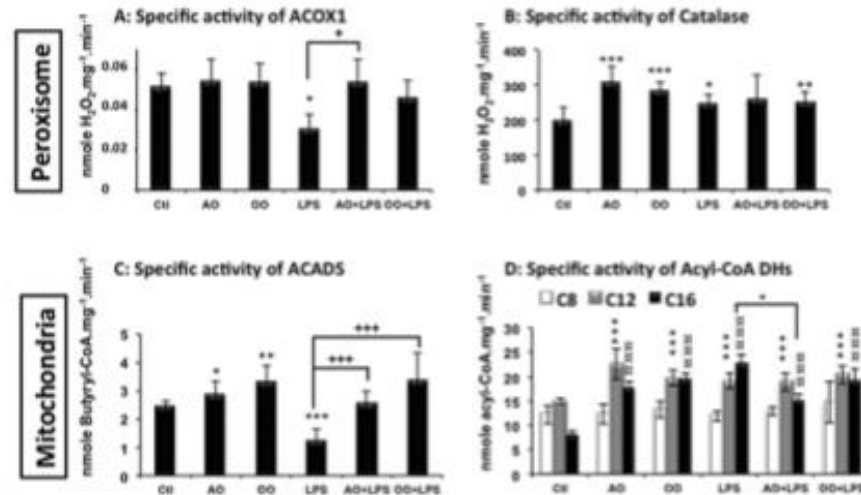


Fig. 2. Argan oil protects hepatic mitochondrial and peroxisomal fatty acid oxidation during exposure of mice to LPS. The specific activities of mitochondrial acyl-CoA dehydrogenases (SCAD, MCAD, LCAD and VLCAD) and peroxisomal enzymes (ACOX1 and Catalase) were measured in liver homogenates as described in "Material and Methods" section. All values are means  $\pm$  SEM ( $n = 5$ /group). Symbols (\*, # and +) correspond to a statistical significance of higher mean signal intensity ( $p < 0.01$  for \*\*\*, \*\* and ##;  $p < 0.02$  for \*\*, # and ++;  $p < 0.05$  for \*, # and #), compared with the control mice (\*) or with the LPS-treated mice (+). Mice received for 25 days a standard chow (control); a standard chow supplemented with 6% (w/w) of Argan oil (AO) or a standard chow supplemented with 6% (w/w) of olive oil (OO). Sixteen hours before euthanasia, one group from control (+LPS), AO (AO + LPS) and OO (OO + LPS) respectively received intraperitoneal injection of 100  $\mu$ g LPS.

target genes were induced to different extents by AO and OO treatments. Indeed, AO up-regulated the expression of *PEPCK*, *G6PH* and *Glut2* mRNA, while OO, *PEPCK* and *Glut4* mRNA levels (Fig. 3B). Finally, administration of LPS deeply reduced the mRNA expression of these four target genes (Fig. 3B). Interestingly, AO + LPS-treated mice exhibited preservation of liver gluconeogenic gene expressions, particularly *PEPCK*, *G6PH* and *Glut4*, which were kept quasi-normal. However, the expression of *Glut2*, the highly expressed glucose transporter in liver, was more decreased in AO + LPS-treated compared to LPS-treated mice (Fig. 3B). OO + LPS-treated mice exhibited also prevention towards LPS-downregulation of liver gluconeogenic genes and no protection for *Glut4* was induced by OO (Fig. 3B).

#### 4. Discussion

The present work provides evidence that mice fed with AO have enhanced expressions of several hepatic FAOx and gluconeogenesis transcripts and this AO-mediated upregulation persists during endotoxic LPS shock. This protective effect appears to associate coregulations of hepatic nuclear receptors PPAR $\alpha$ , ERR $\alpha$  and HNF-4 $\alpha$  and their coactivator PGC-1 $\alpha$  [31]. In addition, AO seems to have specific effects on the activities of mitochondrial acyl-CoA dehydrogenases and peroxisomal catalase.

##### 4.1. AO and OO vs control diets

The body weight of mice fed dietary Argan oil or olive oil did not show any significant difference in comparison to the

body weight found in mice fed the control diet. Although data on mice fed Argan oil are absent in the literature, 10% diet supplementation by AO or OO in rat during 4 weeks also showed no significant differences [49].

In the absence of LPS, AO increases mRNA expression of PPAR $\alpha$  and of its mitochondrial (*ACADS*, *ACADM*) and peroxisomal (*ACOX1*) target genes. Regarding OO treatment, we obtained similar results as with AO for *ACADM* and *ACOX1* mRNA. Even if these oils have different fatty acid compositions, AO and OO induced almost a similar induction of PPAR $\alpha$  and its target genes. As mentioned above, OO contains mainly about 70% of oleic acid and only 6–9% of linoleic acid, while AO harbors 35% of linoleic acid and 45% of oleic acid, indicating that AO is richer in polyunsaturated fatty acids [42]. FAOx induction by OO has been shown to be dependent on PPAR $\alpha$ , since induction by OO or fish oil of hepatic *ACOX1* mRNA is abrogated in *Ppar $\alpha$*  null mice [50]. In this respect, several fatty acids and their polyunsaturated derivatives have been shown to activate responsive element of PPAR $\alpha$  target genes and the generation of *Ppar $\alpha$*  null mice established that PPAR $\alpha$  coordinates transcriptional activation of the genes coding for proteins catalyzing FAOx pathways [14,51–53]. Furthermore, at the energetic level fatty acids are more essential than glucose to the adaptation-phase responses in acute or chronic systemic inflammatory diseases [54]. Thus, it will be of interest to compare in the future the potential preventive effect of supplementing AO to curative properties of its parenteral administration during a septic shock.

On the other hand, though AO or OO increases mRNA expression of mitochondrial acyl-CoA dehydrogenases and



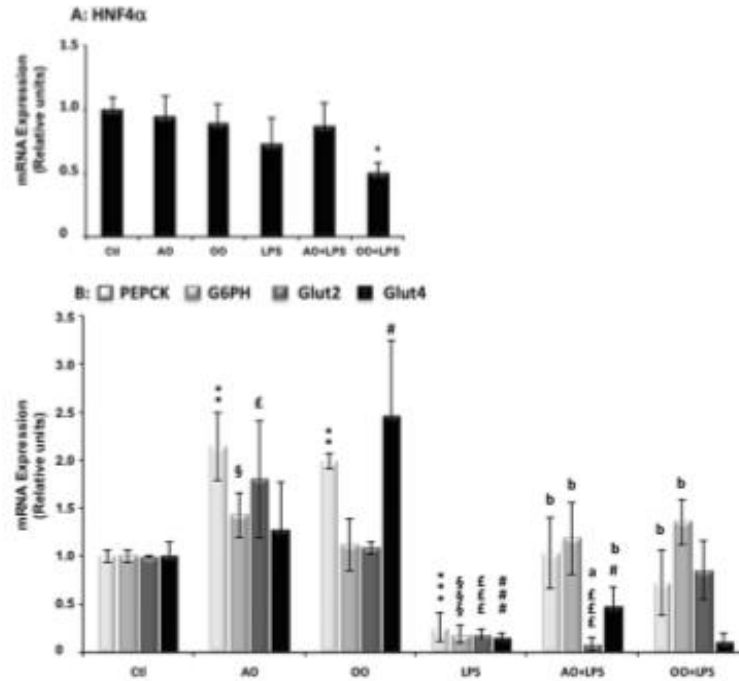


Fig. 3. Argan oil maintains hepatic gluconeogenesis during exposure of mice to LPS. Real-time PCR was used to quantify the hepatic mRNA levels of HNF4 $\alpha$  (A) and PEPCK, G6PH and Glut4 (B). All real-time PCR reactions were performed in duplicate. All values are means  $\pm$  SEM ( $n = 5$ /group) and are normalized to control mice. Symbols (\*,  $\dagger$ ,  $\ddagger$ ,  $\S$  and  $\#$ ) correspond to a statistical significance of higher mean signal intensity, ( $p < 0.01$  for  $^{***}$ ,  $^{\dagger\dagger\dagger}$  and  $^{\ddagger\ddagger\ddagger}$ ;  $p < 0.02$  for  $^{**}$ ,  $^{\ddagger\ddagger}$  and  $\#$ ;  $p < 0.05$  for \*,  $\dagger$  and  $\S$ ), compared with the control mice (\*,  $\dagger$ ,  $\ddagger$  and  $\#$ ) or with the LPS-treated mice ( $\#$  and  $\#$ ). Mice received for 25 days a standard chow (control); a standard chow supplemented with 6% (w/w) of Argan oil (AO) or a standard chow supplemented with 6% (w/w) of olive oil (OO). Sixteen hours before euthanasia, one group from control (+LPS), AO (AO + LPS) and OO (OO + LPS) respectively received intraperitoneal injection of 100  $\mu$ g LPS.

peroxisomal ACOX1, only mitochondrial oxidation of C4:0, C12:0 and C16:0 acyl-CoA esters and not peroxisomal palmitoyl-CoA oxidase activity were increased. Acyl-CoA oxidase is long known to bind weakly its flavine adenine dinucleotide (FAD) [50,55] and this might contribute to intraperoxisomal dissociation of holoenzyme into FAD and apoenzyme (less stable than holoenzyme). Mitochondrial matrix contains a FAD synthetase [56] and, therefore, might better secure protein need in FAD, and hence a better stability of acyl-CoA dehydrogenases by favoring holoenzyme *vs* apoenzyme forms. In addition, absence of the induction of mitochondrial octanoyl-CoA (C8:0) dehydrogenase activity by different treatments may be related to the process of fatty acid degradations in mitochondria and peroxisomes respectively [53]. Thus, the already known incomplete chain shortening of fatty acyl-CoA in peroxisomes would participate to the octanoyl-CoA export for replenishment of the mitochondrial pool [53].

By contrast to OO, gene expressions of both PGC-1 $\alpha$  and Lipin-1 were down regulated by AO. Such effects might explain the observation of Berrougui et al. [57] that AO diminished both LDL and TG according to the key role of Lipin-1 in the assembly and secretion of hepatic very low-density lipoprotein and the increase of TG synthesis as well [58].

#### 4.2. LPS + AO and LPS + OO vs control + LPS diets

In rodents, previous studies have shown that LPS (after a single bolus) induced similar cytokines profiles in either fed or 48 h-fasted rats [59]. Accordingly, given that 24 h-fasting per se significantly enhances hepatic PPAR $\alpha$  mRNA expression and activity [60] and due to its potent anorexigenic effect, LPS has been injected during the fed state [61].

For the first time, AO is shown to enhance gene expressions of hepatic FAOx and gluconeogenesis in a way persisting during endotoxic LPS shock. This protective mechanism appears to involve coregulation by PGC-1 $\alpha$  of hepatic nuclear receptors PPAR $\alpha$ , ERR $\alpha$  and HNF4 $\alpha$  [27]. The present work also reports that AO and OO increase liver expression of gluconeogenic genes. Hepatic gluconeogenesis is regulated by PGC-1 $\alpha$  through the coactivation of HNF4 $\alpha$  [31]. Prevention of the LPS-associated downregulation of gluconeogenic genes is better accounted for by PGC-1 $\alpha$  than by HNF4 $\alpha$  without ruling out lipin-1 activation. Under Lipin-1 RNAi, PEPCK and G6PH are indeed down regulated [62]. Dysregulation of lipid metabolism by LPS injection is characterized by a dramatic decrease in mitochondrial fatty acid oxidative enzymes [63] and hence fatty acid oxidation (FAOx) in several tissues, including liver

[3,6–10]. Proposed underlying mechanisms include a reduction in PPAR $\alpha$  and its coactivator PGC-1 $\alpha$  expressions and hence in mRNA levels of FAOx genes [3,47,48]. Additionally, we showed a strong decrease of ERR $\alpha$  mRNA and increase in liver Lipin-1 transcripts after LPS treatment. Interestingly, both ERR $\alpha$  and Lipin-1 play key roles in the expression of FAOx genes [48,64]. LPS decreases Lipin-1 mRNA in mouse adipose tissue but not skeletal muscle [64] and ERR $\alpha$  in liver, heart, and kidney of mice markedly during the LPS-induced acute-response phase [48]. Intriguingly, AO supplementation in LPS treated mice here has no effect on the level of Lipin-1 mRNA, in contrast to OO supplementation which prevents enhancement of Lipin-1 mRNA by LPS. Such differential effect between AO and OO is similar to what we obtained for PGC-1 $\alpha$  transcripts. Knowing that Lipin-1 RNAi has been shown to mediate reduction of PGC-1 $\alpha$  mRNA [62], we could suggest that increase in Lipin-1 may participate to the preservation of PGC-1 $\alpha$  mRNA by AO. Our results corroborate and extend previous studies demonstrating that suppression by LPS of FAOx addresses, particularly in liver, peroxisomal ACOX1 and ACADS genes. Such LPS suppressive effect is prevented by nutritional supplementation with AO, which also preserves the gene expressions of ERR $\alpha$ , PPAR $\alpha$  and their coactivator PGC-1 $\alpha$ .

LPS treatment exhibited an opposite effect on peroxisomal beta-oxidation and antioxidant activities, which were decreased for ACOX1 and increased for catalase respectively. This may be related to the fact that ACOX1 is an H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-generating enzyme, while catalase is an H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-degrading enzyme [52,53]. The LPS-associated generation of reactive oxygen species is believed to play a key role during the pathogenesis of sepsis [65]. Accordingly, the inhibition of catalase was associated with the progression of LPS/D-galactosamine-induced fulminant liver injury [66]. Thus, the preservation of catalase activity by AO may have a protective effect against the exacerbation of liver injury during LPS-induced endotoxemia.

## 5. Conclusion

In conclusion, the present work showed that Argan oil protects against the decreased expression of genes involved in hepatic FAOx and gluconeogenesis usually observed during the acute response phase associated with LPS administration. This preventive protection might be related to the recovery of the gene expressions of nuclear receptors PPAR $\alpha$  and ERR $\alpha$  as well as of their coactivator PGC-1 $\alpha$ . Such recovery may explain the preservations of mitochondrial and peroxisomal enzymatic activities in parallel to an improvement of gluconeogenic gene expressions.

## Conflict of interests

The authors have declared no conflict of interest.

## Acknowledgments

This work was supported by the Action Intégrée of the Comité Mixte Inter-universitaire Franco-Marocain

(CMIFM, AIMA/14/310, CampusFrance) from the PHC Volubilis/Toubkal program (No30293PA), Ministère des Affaires Etrangères, The Centre National Pour la Recherche Scientifique et Technique (CNRST)- Morocco, the Conseil Régional de Bourgogne (PARI 2012:A324; PARI 2013:B135; CP S0009) and the Ministère de l'enseignement et de la Recherche (crédits récurrents).

## Appendix A. Supplementary data

Supplementary data related to this article can be found at <http://dx.doi.org/10.1016/j.biopen.2015.10.002>.

## References

- [1] J.L. Vincent, Y. Sakr, C.L. Sprung, V.M. Ranieri, K. Reinhart, H. Gerlach, R. Moreno, J. Carlet, J.R. Le Gall, D. Payen, Sepsis in European intensive care units: results of the SOAP study, *Crit. Care Med.* 34 (2006) 344–353.
- [2] M. Maeder, T. Fehr, H. Rickli, P. Ammann, Sepsis-associated myocardial dysfunction: diagnostic and prognostic impact of cardiac troponin and natriuretic peptides, *Chest* 129 (2006) 1349–1366.
- [3] W. Khovidhunkit, M.S. Kim, R.A. Memon, J.K. Shigenaga, A.H. Moser, K.R. Feingold, C. Grunfeld, Effects of infection and inflammation on lipid and lipoprotein metabolism: mechanisms and consequences to the host, *J. Lipid Res.* 45 (2004) 1169–1196.
- [4] J. Cohen, The immunopathogenesis of sepsis, *Nature* 420 (2002) 885–891.
- [5] S. Srikanandan, D.M. Altmann, The immunology of sepsis, *J. Pathol.* 214 (2008) 211–223.
- [6] M.S. Liu, J.J. Spitzer, In vitro effects of *E. coli* endotoxin on fatty acid and lactate oxidation in canine myocardium, *Circ. Shock* 4 (1977) 181–190.
- [7] X. Wang, R.D. Evans, Effect of endotoxin and platelet-activating factor on lipid oxidation in the rat heart, *J. Mol. Cell. Cardiol.* 29 (1997) 1915–1926.
- [8] A.C. Johnson, A. Stahl, R.A. Zager, Triglyceride accumulation in injured renal tubular cells: alterations in both synthetic and catabolic pathways, *Kidney Int.* 67 (2005) 2196–2209.
- [9] R.A. Zager, A.C. Johnson, S.Y. Hanson, Renal tubular triglyceride accumulation following endotoxic, toxic, and ischemic injury, *Kidney Int.* 67 (2005) 111–121.
- [10] K.R. Feingold, I. Stuprans, R.A. Memon, A.H. Moser, J.K. Shigenaga, W. Doerfler, C.A. Dinarello, C. Grunfeld, Endotoxin rapidly induces changes in lipid metabolism that produce hypertriglyceridemia: low doses stimulate hepatic triglyceride production while high doses inhibit clearance, *J. Lipid Res.* 33 (1992) 1765–1776.
- [11] C. Handschin, B.M. Spiegelman, Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1 coactivators, energy homeostasis, and metabolism, *Endocr. Rev.* 27 (2006) 728–735.
- [12] M. Rakhshandehroo, B. Knoch, M. Müller, S. Kersten, Peroxisome proliferator-activated receptor alpha target genes, *PPAR Res.* 2010 (2010) 20–39.
- [13] A. Vloggens, 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 [corrected], *Lab. Invest* 90 (2010) 696–708.
- [14] A. Vloggens, J.K. Reddy, Nuclear receptors and transcription factors in the development of fatty liver disease, *Curr. Drug Metab.* 13 (2012) 1422–1435.
- [15] J.M. Brandt, F. Djoudi, D.P. Kelly, Fatty acids activate transcription of the muscle carnitine palmitoyltransferase I gene in cardiac myocytes via the peroxisome proliferator-activated receptor alpha, *J. Biol. Chem.* 273 (1998) 23786–23792.



- [16] S. Kersten, J. Seydoux, J.M. Peters, F.J. Gonzalez, B. Desvergne, W. Wahli, Peroxisome proliferator-activated receptor alpha mediates the adaptive response to fasting, *J. Clin. Invest.* 103 (1999) 1489–1498.
- [17] T.C. Leone, C.J. Weinheimer, D.P. Kelly, A critical role for the peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PPARalpha) in the cellular fasting response: the PPARalpha-null mouse as a model of fatty acid oxidation disorders, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 96 (1999) 7473–7478.
- [18] C. Mascaro, E. Acosta, J.A. Ortiz, P.F. Marrero, F.G. Hegardt, D. Haro, Control of human muscle-type carnitine palmitoyltransferase I gene transcription by peroxisome proliferator-activated receptor, *J. Biol. Chem.* 273 (1998) 8560–8563.
- [19] M. Rakhshandehroo, G. Hooiveld, M. Muller, S. Kersten, Comparative analysis of gene regulation by the transcription factor PPARalpha between mouse and human, *PLoS One* 4 (2009) e6796.
- [20] T. Aoyama, J.M. Peters, N. Iritani, T. Nakajima, K. Furihata, T. Hashimoto, F.J. Gonzalez, Altered constitutive expression of fatty acid-metabolizing enzymes in mice lacking the peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PPARalpha), *J. Biol. Chem.* 273 (1998) 5678–5684.
- [21] U. Vammani, R. Chu, Q. Huang, R. Castellon, A.V. Yeldandi, J.K. Reddy, Identification of a peroxisome proliferator-responsive element upstream of the human peroxisomal fatty acyl coenzyme A oxidase gene, *J. Biol. Chem.* 271 (1996) 2147–2155.
- [22] M. Cherkaoui-Malki, K. Meyer, W.Q. Cao, N. Latruffe, A.V. Yeldandi, M.S. Rao, C.A. Bradfield, J.K. Reddy, Identification of novel peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PPARalpha) target genes in mouse liver using cDNA microarray analysis, *Gene Expr.* 9 (2001) 291–304.
- [23] M.C. Sugden, P.W. Caton, M.J. Holness, PPAR control: it's SIRT1aintly as easy as PGC, *J. Endocrinol.* 204 (2010) 93–104.
- [24] B.N. Finck, M.C. Gropler, Z. Chen, T.C. Leone, M.A. Croce, T.E. Harris, J.C. Lawrence Jr., D.P. Kelly, Lipin 1 is an inducible amplifier of the hepatic PGC-1alpha/PPARalpha regulatory pathway, *Cell Metab.* 4 (2006) 199–210.
- [25] J.A. Villena, A. Kralli, ERRalpha: a metabolic function for the oldest orphan, *trends endocrinol. Metab.* 19 (2008) 269–276.
- [26] V. Giguere, Transcriptional control of energy homeostasis by the estrogen-related receptors, *Endocr. Rev.* 29 (2008) 677–696.
- [27] S.N. Schreiber, D. Knutti, K. Brogli, T. Uhlmann, A. Kralli, The transcriptional coactivator PGC-1 regulates the expression and activity of the orphan nuclear receptor estrogen-related receptor alpha (ERRalpha), *J. Biol. Chem.* 278 (2003) 9013–9018.
- [28] V.K. Mootha, C. Handschin, D. Arlow, X. Xie, J. St Pierre, S. Sihag, W. Yang, D. Altshuler, P. Puigserver, N. Patterson, P.J. Willy, I.G. Schulman, R.A. Heyman, E.S. Lander, B.M. Spiegelman, ERRalpha and Galpha/b specify PGC-1alpha-dependent oxidative phosphorylation gene expression that is altered in diabetic muscle, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101 (2004) 6570–6575.
- [29] J.M. Huss, R.P. Kopp, D.P. Kelly, Peroxisome proliferator-activated receptor coactivator-1alpha (PGC-1alpha) coactivates the cardiac-enriched nuclear receptors estrogen-related receptor-alpha and -gamma. Identification of novel leucine-rich interaction motif within PGC-1alpha, *J. Biol. Chem.* 277 (2002) 40265–40274.
- [30] S. Gaillard, M.A. Dwyer, D.P. McDonnell, Definition of the molecular basis for estrogen receptor-related receptor-alpha-cofactor interactions, *Mol. Endocrinol.* 21 (2007) 62–76.
- [31] J. Rhee, Y. Inoue, J.C. Yoon, P. Puigserver, M. Fan, F.J. Gonzalez, B.M. Spiegelman, Regulation of hepatic fasting response by PPARgamma coactivator-1alpha (PGC-1): requirement for hepatocyte nuclear factor 4alpha in gluconeogenesis, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100 (2003) 4012–4017.
- [32] W.J. Lin, W.C. Yeh, Implication of toll-like receptor and tumor necrosis factor alpha signaling in septic shock, *Shock* 24 (2005) 206–209.
- [33] P.C. Calder, Long-chain n-3 fatty acids and inflammation: potential application in surgical and trauma patients, *Braz. J. Med. Biol. Res.* 36 (2003) 433–446.
- [34] B.J. Morlion, E. Torwesten, H. Lessire, G. Sturm, B.M. Peskar, P. Furst, C. Puchstein, The effect of parenteral fish oil on leukocyte membrane fatty acid composition and leukotriene-synthesizing capacity in patients with postoperative trauma, *Metab. Clin. Exp.* 45 (1996) 1208–1213.
- [35] M. Roulet, P. Francioso, M. Pilet, G. Chapuis, Effects of intravenously infused fish oil on platelet fatty acid phospholipid composition and on platelet function in postoperative trauma, *JPEN J. Parenter. Enter. Nutr.* 21 (1997) 296–301.
- [36] S. Sadeghi, F.A. Wallace, P.C. Calder, Dietary lipids modify the cytokine response to bacterial lipopolysaccharide in mice, *Immunology* 96 (1999) 404–410.
- [37] I. Chafchaoui-Moussaoui, Z. Charrouf, D. Guillaume, Triterpenoids from *Argania spinosa*: 20 years of research, *Nat. Prod. Commun.* 8 (2013) 43–46.
- [38] H. Berrougui, M. Cloutier, M. Isabelle, A. Khalil, Phenolic-extract from Argan oil (*Argania spinosa* L.) inhibits human low-density lipoprotein (LDL) oxidation and enhances cholesterol efflux from human THP-1 macrophages, *Atherosclerosis* 184 (2006) 389–396.
- [39] M. Cherki, A. Derouiche, A. Drissi, M. El Messal, Y. Bamou, A. Idrissi-Oudghiri, A. Khalil, A. Adlouni, Consumption of Argan oil may have an antiatherogenic effect by improving paraoxonase activities and antioxidant status: intervention study in healthy men, *Nutr. Metab. Cardiovasc. Dis.* 15 (2005) 352–360.
- [40] A. Derouiche, M. Cherki, A. Drissi, Y. Bamou, M. El Messal, A. Idrissi-Oudghiri, J.M. Lecerf, A. Adlouni, Nutritional intervention study with Argan oil in man: effects on lipids and apolipoproteins, *Ann. Nutr. Metab.* 49 (2005) 196–201.
- [41] A. Drissi, J. Girone, M. Cherki, G. Godas, A. Derouiche, M. El Messal, R. Saïle, A. Kettani, R. Sola, L. Masana, A. Adlouni, Evidence of hypolipemiant and antioxidant properties of Argan oil derived from the Argan tree (*Argania spinosa*), *Clin. Nutr.* 23 (2004) 1159–1166.
- [42] R. El Kebbij, S. El Kamouni, H.I. El Hajj, P. Andreoletti, J. Gresti, N. Latruffe, M.S. El Kebbij, J. Vamecq, G. Lizard, B. Nasser, M. Cherkaoui-Malki, Modulation of peroxisomes abundance by Argan oil and lipopolysaccharides in acyl-CoA oxidase 1-deficient fibroblasts, *Health* 5 (2013) 62–69.
- [43] D. Ouxaca-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 Ia and Ib encoded by a single gene, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 360 (2007) 314–319.
- [44] J. Ni, Y. Sasaki, S. Tokuyama, A. Sogabe, Y. Tahara, Conversion of a typical catalase from *Bacillus* sp. TE124 to a catalase-peroxidase by directed evolution, *J. Biosci. Bioeng.* 93 (2002) 31–36.
- [45] D.J. Hyrb, J.F. Hogg, Chain length specificities of peroxisomal and mitochondrial beta-oxidation in rat liver, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 87 (1979) 1200–1206.
- [46] B. Desvergne, W. Wahli, Peroxisome proliferator-activated receptors: nuclear control of metabolism, *Endocr. Rev.* 20 (1999) 649–688.
- [47] A.P. Beigneux, A.H. Moser, J.K. Shigenaga, C. Grunfeld, K.R. Feingold, The acute phase response is associated with retinoid X receptor repression in rodent liver, *J. Biol. Chem.* 275 (2000) 16390–16399.
- [48] M.S. Kim, J.K. Shigenaga, A.H. Moser, K.R. Feingold, C. Grunfeld, Suppression of estrogen-related receptor alpha and medium-chain acyl-coenzyme A dehydrogenase in the acute-phase response, *J. Lipid Res.* 46 (2005) 2282–2288.
- [49] A. Benzaria, N. Meskini, M. Dubois, M. Croset, G. Nemoz, M. Lagarde, A.F. Prigent, Effect of dietary Argan oil on fatty acid composition, proliferation, and phospholipase D activity of rat thymocytes, *Nutrition* 22 (2006) 628–637.
- [50] B. Ren, A.P. Thelen, J.M. Peters, F.J. Gonzalez, D.B. Jump, Polyunsaturated fatty acid suppression of hepatic fatty acid synthase and S14 gene expression does not require peroxisome proliferator-activated receptor alpha, *J. Biol. Chem.* 272 (1997) 26827–26832.
- [51] B.M. Forman, J. Chen, R.M. Evans, Hypolipidemic drugs, polyunsaturated fatty acids, and eicosanoids are ligands for peroxisome proliferator-activated receptors alpha and delta, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 94 (1997) 4312–4317.

- [52] J. Vamecq, M. Cherkaoui-Malki, P. Andreoletti, N. Lutruffe, The human peroxisome in health and disease: the story of an oddity becoming a vital organelle, *Biochimie* 98 (2014) 4–15.
- [53] M. Cherkaoui-Malki, S. Sampureddi, H.I. El-Hajj, J. Vamecq, P. Andreoletti, Hepatic steatosis and peroxisomal fatty acid beta-oxidation, *Curr. Drug Metab.* 13 (2012) 1412–1421.
- [54] T.F. Liu, C.M. Brown, M. El Gazzar, L. McPhail, P. Millet, A. Rao, V.T. Vachharajani, B.K. Yoza, C.E. McCall, Fueling the flame: bioenergy couples metabolism and inflammation, *J. Leukoc. Biol.* 92 (2012) 499–507.
- [55] N.C. Inestrosa, M. Bronfman, F. Leighton, Properties of fatty acyl-CoA oxidase from rat liver, a peroxisomal flavoprotein, *Life Sci.* 25 (1979) 1127–1135.
- [56] M. Barile, C. Brizio, D. Valenti, C. De Virgilio, S. Passarella, The riboflavin/FAD cycle in rat liver mitochondria, *Eur. J. Biochem.* 267 (2000) 4888–4900.
- [57] H. Berrougui, A. Eitaib, M.D. Herrera Gonzalez, M. Alvarez de Sotomayor, N. Bensani-Kabchi, M. Hmsmouchi, Hypolipidemic and hypocholesterolemic effect of Argan oil (*Argania spinosa* L.) in Meriones shawi rats, *J. Ethnopharmacol.* 89 (2003) 15–18.
- [58] M. Bou Khalil, M. Sundaram, H.Y. Zhang, P.H. Links, J.F. Raven, B. Muntoni, M. Sarihametoglu, K. Truu, K. Reue, D.N. Brindley, Z. Yao, The level and compartmentalization of phosphatidate phosphatase-1 (lipin-1) control the assembly and secretion of hepatic VLDL, *J. Lipid Res.* 50 (2009) 47–58.
- [59] W. Inoue, G. Somay, S. Poole, G.N. Lubeshi, Immune-to-brain signaling and central prostaglandin E2 synthesis in fasted rats with altered lipopolysaccharide-induced fever, *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 295 (2008) R133–R143.
- [60] D. Patsouris, S. Mandart, P.J. Voshol, P. Escher, N.S. Tan, L.M. Havekes, W. Koenig, W. Marz, S. Tafuri, W. Wahli, M. Müller, S. Kersten, PPARalpha governs glycerol metabolism, *J. Clin. Invest.* 114 (2004) 94–103.
- [61] H. Volkoff, R.E. Peter, Effects of lipopolysaccharide treatment on feeding of goldfish: role of appetite-regulating peptides, *Brain Res.* 998 (2004) 139–147.
- [62] D. Ryu, K.I. Oh, H.Y. Jo, S. Hedrick, Y.N. Kim, Y.J. Hwang, T.S. Park, J.S. Han, C.S. Choi, M. Montminy, S.H. Koo, TORC2 regulates hepatic insulin signaling via a mammalian phosphatidic acid phosphatase, LIPIN1, *Cell Metab.* 9 (2009) 240–251.
- [63] K.R. Feingold, Y. Wang, A. Moser, J.K. Shigenaga, C. Grunfeld, LPS decreases fatty acid oxidation and nuclear hormone receptors in the kidney, *J. Lipid Res.* 49 (2008) 2179–2187.
- [64] B. Lu, Y. Lu, A.H. Moser, J.K. Shigenaga, C. Grunfeld, K.R. Feingold, LPS and proinflammatory cytokines decrease lipin-1 in mouse adipose tissue and 3T3-L1 adipocytes, *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 295 (2008) E1502–E1509.
- [65] N. Singh, L. Li, Reduced oxidative tissue damage during endotoxemia in IRAK-1 deficient mice, *Mol. Immunol.* 50 (2012) 244–252.
- [66] M. Jia, Y. Jing, Q. Ai, R. Jiang, J. Wan, L. Lin, D. Zhou, Q. Che, L. Li, L. Tang, Y. Shen, L. Zhang, Potential role of catalase in mice with lipopolysaccharide/D-galactosamine-induced fulminant liver injury, *Hepatology Res.* 44 (2014) 1151–1158.



## Review Article

# Peroxisomal Acyl-CoA Oxidase Type 1: Anti-Inflammatory and Anti-Aging Properties with a Special Emphasis on Studies with LPS and Argan Oil as a Model Transposable to Aging

Joseph Vamecq <sup>1</sup>, Pierre Andreoletti <sup>2</sup>, Riad El Kebbaj,<sup>3</sup> Fatima-Ezzahra Saih,<sup>2,4</sup> Norbert Latruffe,<sup>2</sup> M' Hammed Saïd El Kebbaj,<sup>5</sup> Gérard Lizard,<sup>2</sup> Boubker Nasser,<sup>3</sup> and Mustapha Cherkaoui-Malki <sup>2</sup>

<sup>1</sup>INSERM, HMNO, CBP, CHRU and RADEME EA 7364, Faculté de Médecine, Université Lille 2, Lille, France

<sup>2</sup>Laboratoire BioPeroXIL (Biochimie du Peroxysome, Inflammation et Métabolisme Lipidique) EA 7270/Inserm, Université Bourgogne-Franche Comté, Dijon, France

<sup>3</sup>Laboratoire des Sciences et Technologies de la Santé, Institut Supérieur des Sciences de la Santé, Université Hassan Premier, Settat, Morocco

<sup>4</sup>Laboratoire de Biochimie et Neurosciences, Faculté des Sciences et Techniques, Université Hassan I, Settat, Morocco

<sup>5</sup>Laboratoire de recherche sur les lipoprotéines et l'Athérosclérose, Faculté des Sciences Ben M'sik, Université Hassan II-Mohammedia-Casablanca, Casablanca, Morocco

Correspondence should be addressed to Joseph Vamecq; [joseph.vamecq@inserm.fr](mailto:joseph.vamecq@inserm.fr) and Mustapha Cherkaoui-Malki; [mustapha.cherkaoui-malki@u-bourgogne.fr](mailto:mustapha.cherkaoui-malki@u-bourgogne.fr)

Received 29 September 2017; Accepted 23 January 2018; Published 25 March 2018

Academic Editor: Javier Egea

Copyright © 2018 Joseph Vamecq et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

To clarify appropriateness of current claims for health and wellness virtues of argan oil, studies were conducted in inflammatory states. LPS induces inflammation with reduction of PGC1- $\alpha$  signaling and energy metabolism. Argan oil protected the liver against LPS toxicity and interestingly enough preservation of peroxisomal acyl-CoA oxidase type 1 (ACOX1) activity against depression by LPS. This model of LPS-driven toxicity circumvented by argan oil along with a key anti-inflammatory role attributed to ACOX1 has been here transposed to model aging. This view is consistent with known physiological role of ACOX1 in yielding precursors of specialized proresolving mediators (SPM) and with characteristics of aging and related disorders including reduced PGC1- $\alpha$  function and improvement by strategies rising ACOX1 (via hormonal gut FGF19 and nordihydroguaiaretic acid in metabolic syndrome and diabetes conditions) and SPM (neurodegenerative disorders, atherosclerosis, and stroke). Delay of aging to resolve inflammation results from altered production of SPM, SPM improving most aging disorders. The strategic metabolic place of ACOX1, upstream of SPM biosynthesis, along with ability of ACOX1 preservation/induction and SPM to improve aging-related disorders and known association of aging with drop in ACOX1 and SPM, all converge to conclude that ACOX1 represents a previously unsuspected and currently emerging antiaging protein.

## 1. Introduction

Vegetal compounds and oils are current trends for active research. One reason lies in the consideration that nature forms a whole and may provide living beings with both pathogenic and curative factors. Beside vegetal poisons [1], some vegetal compounds as for instance those extracted from *Digitalis purpurea* and *Camptotheca acuminata* tree may be

therapeutically active [2, 3] or in turn may serve as guide compounds for medicinal chemistry design in cardiovascular disorders and cancer. It remains currently unclear whether, however, such real curative medical indications may be attributed as a general rule to the bulk of vegetal-derived compounds or oils endowed with health-improving properties. In this respect, argan oil is currently becoming largely acclaimed for a large variety of health and wellness virtues

[4, 5]. The anti-inflammatory potential of argan oil has been recently addressed by evaluating its effects towards the highly inflammatory LPS using a murine model of sepsis [6]. In this disorder, peroxisomal Acyl-CoA oxidase 1 (ACOX1) was preserved by argan oil against inactivation by LPS in the same time as the oil protected the liver against most of LPS-driven toxicity and metabolic homeostasis disruption [6]. On the other hand, ACOX1 initiates the peroxisomal pathway ensuring retroconversion of polyunsaturated fatty acids [7]. Key role of ACOX1 in biosyntheses of eicosanoids (E series) and docosanoids (D series) further yielding specialized pro-resolving mediators (SPM) (resolvins, neuroprotectins, and maresins) [8, 9] is stressed along with preserved or increased ACOX1 activity in models of diabetes and metabolic syndromes. The alterations in SPM production and their roles as potential therapeutic candidates in many other pathological states linked to aging such as neurodegenerative disorders (e.g., Alzheimer's disease), macular degeneration, and vascular disorders (stroke, atherosclerosis, and mitochondrial dysfunction in senescent brain) are further developed.

Olive oil contains about 70% oleic acid while argan oil harbors 45% oleic acid and 35% linoleic acid, indicating that argan oil is richer in polyunsaturated fatty acids [10]. Early studies on argan oil revealed its beneficial effects on lipid metabolism and antioxidant status through drops in plasma low density lipoprotein-cholesterol (LDL-cholesterol) and lipoperoxides, along with a rise in plasma tocopherol concentration [11]. In this respect, argan oil contains a high level of antioxidant compounds including gamma-tocopherol and also ferulic acid which exhibit ROS-scavenging and anti-inflammatory properties [12]. Cumulated activities of these individual argan oil components meet therapeutic efficacy in humans as attested by the beneficial metabolic effects of argan oil reported in several clinical trials on dyslipidemic markers [11]. Improvements of dyslipidemia by argan oil are consistent with studies on the expression of nuclear genes controlling lipid metabolism which, as highlighted in the next section, have shown in an animal model of human sepsis that argan oil upregulates hepatic expression of PGC-1 $\alpha$ , leading to parallel coactivations of the nuclear receptors—PPAR $\alpha$ , ERR $\alpha$ , and HNF-4 $\alpha$ —which govern FAOx metabolism and gluconeogenesis [6].

## 2. Studies with Protection by Argan Oil of LPS-Induced Model of Sepsis

Chronic administration of argan oil prevents liver dysfunction experimentally induced by sepsis-mimicking conditions [6]. This result was obtained in mice exposed to LPS as a model for human sepsis. Preventive protection was observed at reasonable oil diet concentrations (6%), suggesting a potential applicability of this diet measure in the medical practice. This observation makes chronic argan oil intakes preventive antidotes for sepsis and, hence, might suggest influence of diet backgrounds of patients on sepsis development and prognosis. Whether therapeutic issues may ultimately emerge from administration of this oil, though promising, still remains speculative. Nonetheless, mechanisms by which its administration is capable of blunting

sepsis LPS-driven liver dysfunction are remarkable and provide liver with a unique point-to-point reply to various signaling and metabolic targets of sepsis. The various ways altering the capacity of liver engine to fulfill energetic demands of extrahepatic tissues are subject to a suited protection through stimulation or preservation of signaling and metabolic events, which are extinct by sepsis (Figure 1). Part of features enabling LPS to disrupt signaling for liver metabolic support to extrahepatic tissues and prevention by argan oil [6] is illustrated in Figure 1 panels A and B, respectively. The depicted events have been arbitrarily divided in PGC-1 $\alpha$ -dependent and independent features. LPS negatively impacts signaling for fatty acid oxidation and gluconeogenesis, the two key metabolic pathways enabling liver to aliment extrahepatic tissues in energetic substrates in periods of increased energy demands. PGC-1 $\alpha$ -independent LPS features include sterol depletion by LPS leading to the LPS-dependent activation of SREBP1 [13], which in turn enhances gene expression of lipin-1 [14, 15]. The accumulation of diacylglycerol, which may involve lipin-1, leads to gluconeogenesis impairment through mTOR signaling [16] (Figure 1(a), left part). PGC-1 $\alpha$ -dependent mechanisms mainly lie in a severe drop in PGC-1 $\alpha$  signaling with resulting loss in PPAR $\alpha$  and HNF-4 $\alpha$  signaling (Figure 1(b), right part).

Under LPS, argan oil (Figure 1(b), right part) stimulates PPAR $\alpha$  and PGC-1 $\alpha$  signaling, contributing to stimulate fatty acid oxidation, and via the impact of PGC-1 $\alpha$  acting as a coactivator of HNF-4 $\alpha$ , to preserve gluconeogenesis despite no concomitant drop in lipin-1 signaling by this oil [6]. Under LPS, depression of lipin-1 by olive oil (Figure 1(b), left part) would avoid a negative impact on gluconeogenesis signaling. By contrast to argan oil, olive oil does not fully rescue the LPS-decreased PGC-1 $\alpha$  expression. So, this may prevent the lowering of fatty acid oxidation activity and allows its preservation under exposure to LPS [6]. Figure 2 illustrates that argan and olive oils preserve normal hepatic fatty acid oxidation and gluconeogenesis capacities under LPS. Under LPS, each of the pathologically disrupted steps is preserved under chronic administration of the oils. As highlighted by the figure, oils may be considered as affording a protection highly adapted to the metabolically toxic liver changes induced by LPS.

## 3. Transposing to Aging the Sepsis Model of Inflammation Induced by LPS and Resolved by Argan Oil

The liver metabolic changes and underlying signaling characterizing LPS-induced model of sepsis and counteraction by argan oil have been mentioned and illustrated above. What has been illustrated in Figures 1 and 2 is essentially how the major liver energetic metabolic pathways (gluconeogenesis, mitochondrial fatty acid oxidation) and underlying signaling are modified by LPS and under LPS how argan oil may impact LPS-induced changes. Effects on peroxisomal  $\beta$ -oxidation, which is not per se an energetic pathway, have not been depicted in these figures. Interestingly enough, one of the toxic effects of LPS on mouse liver metabolism was a



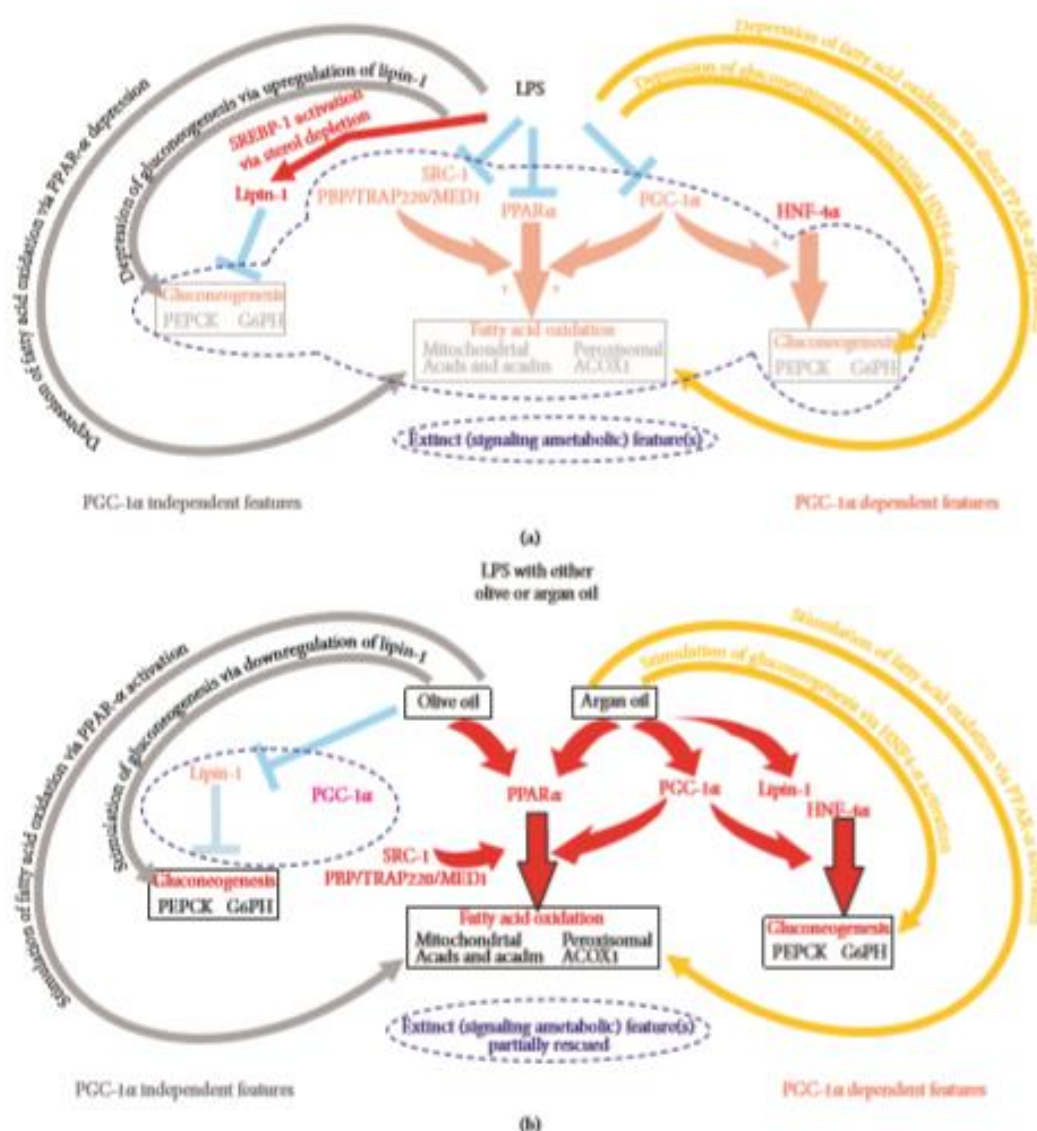


FIGURE 1: Putative impact of LPS on signaling events involved in the regulation of key steps in liver metabolic support of extrahepatic tissues (a) and effective preventive protection conveyed by argan and olive oils (b). LPS and oil effects have been divided into PGC-1 $\alpha$  independent and dependent features. Note that, however, for sake of illustration, the inhibitory action of olive oil on PGC-1 $\alpha$  is artificially placed in the PGC-1 $\alpha$  independent mechanisms subpanel.

significant drop in acyl-CoA oxidase 1 activity [6]. LPS-mediated inhibition of peroxisomal  $\beta$ -oxidation activity was also described in rat liver under experiments focusing on the effect of endotoxin treatment on peroxisomal  $\beta$ -oxidation enzymology [17]. In this study, peroxisomal  $\beta$ -oxidation measured as lignoceric oxidation rates and ACOX1 activity was reduced to 56 and 73% control values, respectively [14]. Argan oil prevented LPS-induced drop of the ACOX1 activity in liver from mice exposed to LPS [6].

Figure 3 is an attempt to model LPS-driven toxicity and protective effect of argan oil with a special emphasis

on ACOX1. This representation is interesting because it attributes a key role to ACOX1 in controlling inflammation in a way upstream of the metabolic reprogramming induced by LPS. This reprogramming of energetic metabolism by LPS has been shown to involve depression of PGC-1 $\alpha$  activity [10, 18]. In our representation appearing in Figure 3(a), this reprogramming of energetic metabolism is induced by inflammation and leads to impairment of ACOX1 explaining that protection (by argan oil) of this enzyme might restore an active control of inflammation and hence a unique opportunity to remove the energy



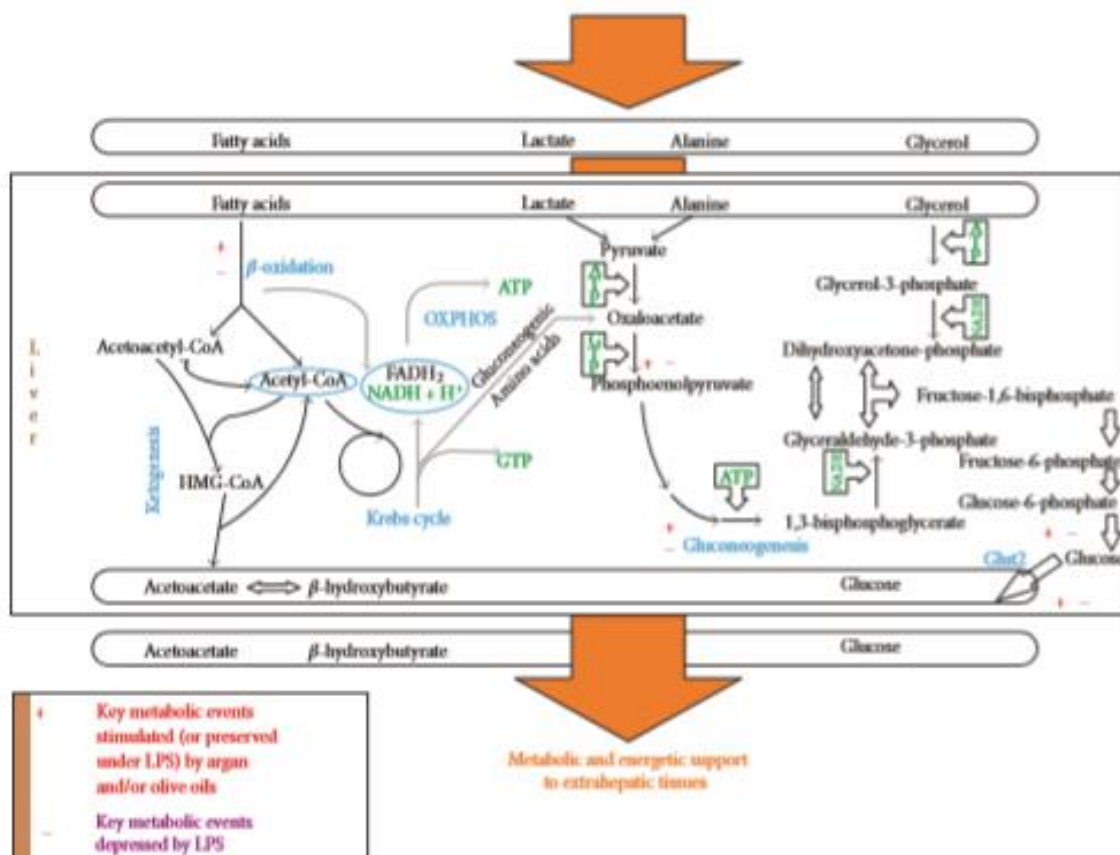


FIGURE 2: Liver metabolic and energetic support to extrahepatic tissues and its modulation by LPS, and, under LPS, argan and olive oils. Events depicted on this original figure were inferred from data published in [6].

metabolic reprogramming responsible for toxicity (by LPS). In our previous study on mouse model for sepsis, LPS induced a deep drop in PGC-1 $\alpha$ ; argan oil effectively protected ACOX1 and removed energy metabolic reprogramming as attested by full restitution of PGC-1 $\alpha$  [6].

A remarkable feature is the appropriateness to transpose to aging our model of LPS-driven toxicity and protective effect of argan oil with a special emphasis on ACOX1. This is done and illustrated in Figure 3(b). Like LPS, aging promotes inflammation. It is well accepted that aging is characterized by a delay to resolve inflammation [19]. Another extraordinary parallelism between LPS and aging is the drop in PGC-1 $\alpha$ , along with sometimes rescue by a rise in PGC-1 $\alpha$ , which has been observed and incriminated in aging [20] and the development of many aging-related disorders including obesity and type 2 diabetes [21, 22], coronary diseases [23], neurodegenerative disorders (Alzheimer [24, 25], Parkinson [26–28], and Huntington [29–31] diseases), myocardial infarction [32–37], mitochondrial dysfunction in senescent brain [20, 38, 39], and stroke [40–43].

Consistent also with the relevance of the emerging model of aging appearing on Figure 3 are as developed thereafter (i) the remarkable anti-inflammatory potential

of ACOX1 through generation of precursors of lipid mediators with potent anti-inflammatory activity (specialized proresolving mediators, SPM), (ii) protection given by either argan oil use or ACOX1 induction in signaling pathways improving diabetes and metabolic syndromes and (iii) protection given by SPM in age-related disorders.

#### 4. Studies Highlighting that ACOX1 Is Physiologically Involved in the Synthesis of Precursors of Specialized Proresolving Mediators (SPM)

##### 4.1. Peroxisomal Acyl-CoA Oxidase 1 in Health and Disease

**4.1.1. LPS Reduces Liver ACOX1 in a Way Counteracted by Oils.** One of the toxic effects of LPS on liver metabolism was a significant drop in acyl-CoA oxidase 1 activity [6]. One of the putative protective effects of oils, argan and to a lesser extent olive oil, is prevention of LPS-induced drop in the expression of the peroxisomal protein [6].

**4.1.2. ACOX 1 in the Physiology of Peroxisomal  $\beta$ -Oxidation.** Acyl-CoA oxidase 1 (ACOX1) belongs to one of the two

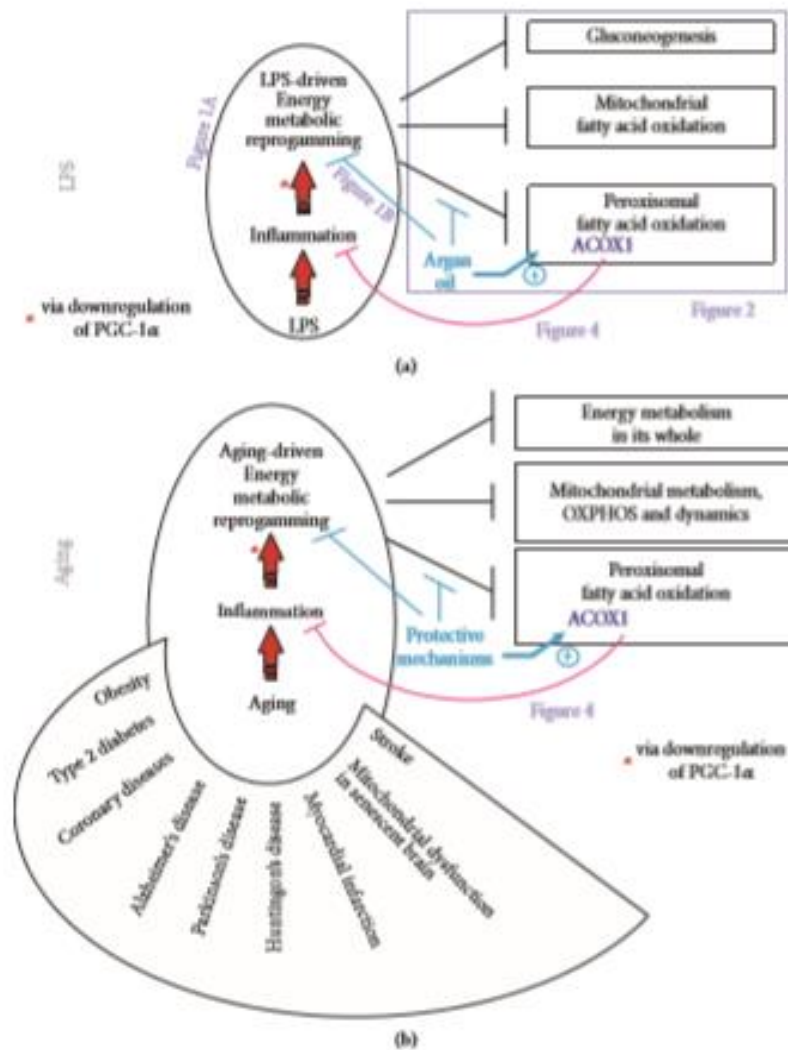


FIGURE 3: Modeling the LPS-driven inflammation and counteraction by argan oil with a special emphasis on ACOX1 (a) and transposing this model to aging (b). For both, LPS toxicity and aging-related disorders, models, inflammatory states, and illustrated consequences along with anti-inflammatory ACOX1 and its status in these pathological states are further discussed in the text. The figure also positions other figures of this review.

separate  $\beta$ -oxidation systems identified in peroxisomes [44]. In the first peroxisomal  $\beta$ -oxidation system, ACOX1 catalyzes the first and the rate-limiting step of straight-chain fatty acids [45]. In contrast, structurally unrelated acyl-CoA oxidases 2 and 3, of the second peroxisomal  $\beta$ -oxidation system, metabolize branched-chain fatty acids (pristanic acid) and C27 bile acid precursors, respectively, although in the humans type 2 is the only acyl-CoA oxidase involved in bile acid biosynthesis, and both type 2 and 3 acyl-CoA oxidases are functional on branched-chain fatty acyl-CoA [44, 46].

**4.1.3. Anti-Inflammatory Potential of ACOX 1.** ACOX1, one of the targets of LPS [6], has proven anti-inflammatory

properties and, in the context of sepsis, its preservation by oils, under signaling adaptations abundantly developed above, might contribute to liver protection. Anti-inflammatory action of ACOX1 is based on various pathogenesis and physiological pieces of evidence considered thereafter.

**(1) ACOX1 Null Mice.** Mice lacking ACOX1 manifest severe inflammatory steatohepatitis with increased intrahepatic  $H_2O_2$  levels and hepatocellular regeneration [47]. This hepatic oxidative stress may trigger TNF $\alpha$  production by Kupffer cells. Progressively, chronic endoplasmic reticulum stress contributes to hepatocarcinogenesis [48] and this steatotic ACOX1 null phenotype can be reversed by expression of the human ACOX1 [48, 49]. In the ACOX1-dependent



hepatocarcinogenesis, the involvement of nuclear receptor PPAR $\alpha$  is essential [50]. In brain lesions of patients with peroxisomal  $\beta$ -oxidation deficit, oxidative, inflammatory, and apoptotic processes have been described [51]. The expressions of genes coding for cytokines IL-6, IL-8, and TNF $\alpha$ , which are typically produced by macrophages and by CD4 $^{+}$  T cells Th1, have also been found to be increased in ACOX1 deficiency [52]. On the other hand, several cytokines and chemokine mRNAs are strongly downregulated in ACOX1-deficient patient fibroblasts, including CXCL14 and CXCL12 genes, which have been shown to participate in the regulation of cell or tissue homeostasis [52]. In this peroxisomal disorder, lipid derivatives with an abnormally high proportion of VLCFA residues have been proposed to trigger the initial cascade of the inflammatory process [53]. The severity of the metabolic disruption associated with peroxisomal ACOX1 deficiency underlines the crucial role of peroxisomes in synthesizing or degrading highly specific metabolites, accumulation or deficit of which may impact peroxisome biogenesis itself and/or collaborative working with other cellular organelles such as mitochondria and endoplasmic reticulum.

(2) *Physiological Role of ACOX1 in the Metabolism of Polyunsaturated Fatty Acids (PUFA)*. Physiological evidence for a key role of ACOX1 in alimending docosanoid formation (for metabolic steps, elongases and desaturases, of PUFA synthesis considered throughout the text thereafter (see [54]) rests on the key role of this enzyme in the retroconversion of polyunsaturated fatty acids (PUFAs) (Figure 4) [7, 54–59]. For recall, families of PUFAs are characterized by the position of the unsaturation closest to the terminal, so-called  $\omega$ , methyl of the fatty acid carbon chain. In contrast to the position of the unsaturation towards the carboxylate, that towards the other end of the carbon chain is kept upon elongation or shortening of the carbon chain. Among these families, the  $\omega$ -6 and  $\omega$ -3 families are generated from linoleic and  $\alpha$ -linolenic acids, respectively. The metabolism of these PUFAs is illustrated on Figure 4 and starts with their preliminary activation into CoA esters by acyl-CoA synthetases prior to handling by acyl-CoA desaturases and elongases.

## 5. PUFA Desaturases and Elongases

Acyl-CoA desaturases introduce *cis*-double bonds between the carboxylate group and the first unsaturation of the carbon chain, at three carbons from this unsaturation. The desaturase(s) acting on  $C_{18}$  and  $C_{24}$  PUFAs is a  $\Delta$ 6-desaturase and that acting on the  $C_{20}$  PUFAs is a  $\Delta$ 5-desaturase. The latter desaturase produces CoA esters of arachidonic acid or ARA (5,8,11,14-eicosatetraenoic acid) and EPA (5,8,11,14,17-eicosapentaenoic acid). Nonesterified forms of PUFAs are released from phospholipids by PLA2. They are substrates for cyclooxygenases and lipoxygenases, which drive the  $C_{20}$  PUFAs (eicosanoids) towards prostanoids (prostaglandins and thromboxanes) and leukotrienes (plus HPETE, hydroperoxyeicosatetraenoic acids, and HETE, hydroxyeicosatetraenoic acids) syntheses, respectively [60–62]. CoA esters of ARA and EPA not having been incorporated into phospholipids may continue elongation.

## 6. PUFA Retroconversion

Though this view has been recently seriously challenged (see consideration below in the text), mammalian cells are assumed to possess little or no direct PUFA  $\Delta$ 4-desaturase activity, so the ARA-CoA and EPA-CoA elongation products in  $C_{22}$  (7,10,13,16-docosatetraenoyl-CoA [ $\omega$ 6] and 7,20,13,16,19-docosapentaenoyl-CoA [ $\omega$ 3]) would not be immediately desaturated at the  $\Delta$ 4 position. In order to produce the corresponding  $\Delta$ 4-desaturated metabolites, cells are capable of operating an additional elongation converting  $C_{22}$  (7,10,13,16-docosatetraenoyl-CoA [ $\omega$ 6] and 7,20,13,16,19-docosapentaenoyl-CoA [ $\omega$ 3]) to  $C_{24}$  (9,12,15,18-tetracosatetraenoyl-CoA [ $\omega$ 6] and 9,12,15,18,21-tetracosapentaenoyl-CoA [ $\omega$ 3]) products. As mentioned above, these  $C_{24}$  PUFAs are substrates for  $\Delta$ 6 desaturase. The  $C_{24}$  products desaturated in  $\Delta$ 6 (6,9,12,15,18-tetracosapentaenoyl-CoA [ $\omega$ 6] and 6,9,12,15,18,21-tetracosahexaenoyl-CoA [ $\omega$ 3]) may undergo a two-carbon chain shortening which generates  $C_{22}$  PUFAs now presenting with an unsaturation at the  $\Delta$ 4 position. So, cells may catalyze  $\Delta$ 4 desaturase activity on the  $C_{22}$  7,10,13,16-docosatetraenoyl-CoA [ $\omega$ 6] and 7,20,13,16,19-docosapentaenoyl-CoA [ $\omega$ 3] by combining elongation in  $C_{24}$ -CoA,  $C_{24}$  PUFA-CoA  $\Delta$ 6 desaturation and  $C_{24}$   $\Delta$ 6 PUFA-CoA retroconversion into  $C_{22}$   $\Delta$ 4 PUFA-CoA. This  $C_{24}$  to  $C_{22}$  retroconversion corresponds to a peroxisomal  $\beta$ -oxidizing cycle with two-carbon-chain cleavage. PUFA-CoA desaturation and elongation are catalyzed by microsomal proteins, elongation being also catalyzed by mitochondria.

*6.1. Metabolic Intervention of ACOX1 in PUFA Retroconversion*. In the scope of PUFA retroconversion, the  $C_{24}$   $\Delta$ 6 PUFA-CoA requires import into peroxisomal matrix to which acyl-CoA  $\beta$ -oxidation enzymes belong.  $C_{24}$   $\Delta$ 6 PUFA-CoAs are very long straight chain fatty acyl-CoAs. Transfer through peroxisomal membranes would be here assisted by ABCD2, which prefers unsaturated very long-chain fatty acids in contrast to ABCD1, the protein deficient in X-linked adrenoleukodystrophy, which preferentially acts on saturated VLCFA [63]. After import by ABCD2, the peroxisomal  $\beta$ -oxidation of  $C_{24}$   $\Delta$ 6 PUFA-CoAs may proceed with peroxisomal acyl-CoA oxidase 1 (1st  $\beta$ -oxidation step), D-bifunctional protein (2nd and 3rd  $\beta$ -oxidation steps), and thiolases 1 and/or 2 (for the 4th and last step) [63]. This unique  $\beta$ -oxidation turn produces the  $C_{22}$   $\Delta$ 4 PUFA-CoA: DPA (4,7,10,13,16-docosapentaenoic acid [ $\omega$ 6]) and DHA (4,7,10,13,16,19-docosahexaenoic acid [ $\omega$ 3]) (DPA without other precision here refers to the n-6 DPA, the retroconversion product of TPA, and not to n-3 DPA, the product elongation of EPA).

## 7. Biosynthesis of Anti-Inflammatory Lipid Mediators from PUFAs “Retroconverted” by Peroxisomal ACOX1-Dependent $\beta$ -Oxidation

As highlighted by Figure 4, in the absence of dietary DHA, though ACOX1 would not be needed for the formation of part of the resolvins, namely E series resolvins, it represents an essential step in the biosynthesis of the D-series resolvins,

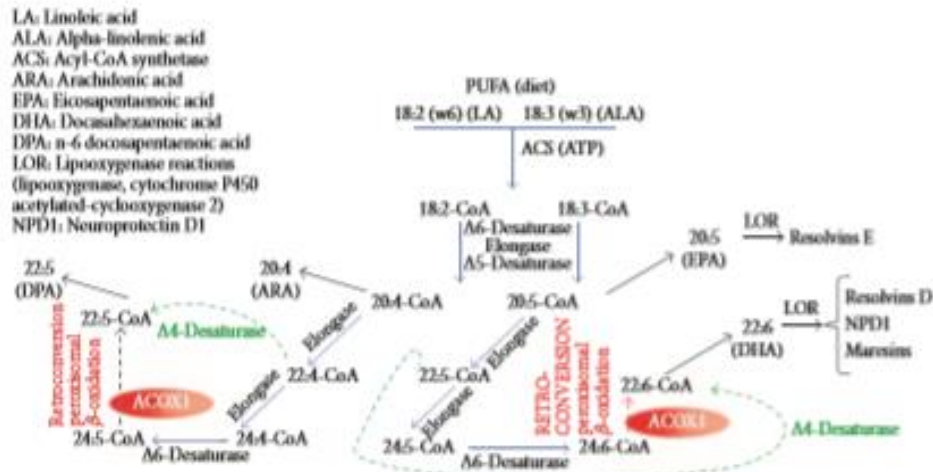


FIGURE 4: Key role of peroxisomal acyl-CoA oxidase 1 in the control of inflammation and as a target of diseases and consequent therapeutic approaches.

neuroprotectins, and maresins as a result of its key role in the retroconversion of PUFAs. On this light, it may be considered that the role of sepsis-mediated inhibition of ACOX1 might have been overlooked in the inflammatory challenge raised by sepsis in liver. In the same time, it may be asked whether protection of ACOX1 has not been also previously overlooked as an important feature in the anti-inflammatory potential conveyed by argan and olive oils.

The anti-inflammatory role of ACOX1 may be linked to its contribution to the yield of anti-inflammatory compounds. In this respect, DHA may be supplied by diet and endogenous biosynthesis. The last step in DHA biosynthesis is PUFA retroconversion which rests on a single peroxisomal ACOX1-initiated  $\beta$ -oxidation turn. Several works reviewed in [64] argue that resolvins, such as neuroprotectin D1 (NPD1), mediate anti-inflammatory and protective action of n-3 PUFAs in brain disorders. NPD1 is formed from DHA and reduces apoptosis in Alzheimer brain [65], whereas DHA and NPD1 lower transcript levels of the inflammatory gene products COX2 and NF-KB [66]. Protective effects of DHA and metabolites against chronic inflammations including cardiovascular disorders, asthma, rheumatoid arthritis, and inflammatory bowel diseases reviewed in [67] might also stress anti-inflammatory properties of ACOX1. In these studies, ACOX1 was bypassed by direct supplementation of its product (DHA) and derived metabolites (specialized proresolving mediators of the D series).

**7.1. A Subtle Equilibrium between Desaturation, Elongation, and Oxidation of PUFA-CoA Esters.** Desaturation and elongation of very long-chain PUFAs share in common with acyl-CoA oxidase 1 their action on CoA esters as substrates. It is likely that a subtle equilibrium exists between a given PUFA-CoA and its partition between the three fatty acid chain remodelling pathways and therefore this metabolic partition might be specific to the considered PUFA. The  $\Delta 6$

desaturase involved prior the acyl-CoA oxidase 1-driven retroconversion corresponds to the fatty acid desaturase 2 (FADS2) gene product. Importantly, FADS2 is also responsible for the catalysis of a direct  $\Delta 4$ -desaturation of ARA and EPA directly to DPA and DHA, thus bypassing the retroconversion step (broken green arrow on Figure 4) [68] and complicating the metabolic partition mentioned above. On the other hand, in an animal model for acyl-CoA oxidase 1 gene KO, accumulation of very long-chain PUFAs were observed, corroborating the role of the peroxisomal oxidase in their retroconversion [69].

## 8. Anti-Inflammatory Potential of ACOX1 in Aging-Related Disorders Including Diabetes and Metabolic Syndrome

The recent advance in the biosynthesis of resolvins and recognition of their targets including various receptors among which GPCRs and also various microRNA (for a recent review, see [70]) has obviously heightened the interest in proteins intervening upstream formation of direct precursors of resolvins.

An important window to consider argan oil and ACOX1 as worthy regulators of inflammation perhaps lies in findings made in major disorders related to aging and known to involve inflammation. In this light, argan oil has been experimentally shown to be effective in blunting some of the features of diabetes and even in preventing chemically induced diabetes, displaying antihypertensive and antiproliferative properties, reducing in diabetic patients oxidation of LDL [71–74]. ACOX1 was found to be increased by compounds including FGF19 (Fibroblast growth factor 19, a hormonal gut-derived peptide) and nordihydroguaiaretic acid (a Creosote bush metabolite), which have been shown to improve metabolic syndrome [75, 76]. Nordihydroguaiaretic acid is endowed with many biological properties including free



radical scavenging, lipooxygenase inhibition, modulation of nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (Nrf2)/antioxidant response element (ARE) signaling pathway, and cytoprotective and toxic properties towards normal and cancerous cells, respectively; this polyphenolic compound has also proven improvement in many disease conditions such as cancer, nephropathy, and neurodegenerative disorders (for valuable reviews, the reader may be kindly referred to [77, 78]). In fact, nordihydroguaiaretic acid has been shown to counteract major events, leading to metabolic syndrome and, in this context, to protect liver metabolism, fading high-fat-diet-induced hypertriglyceridemia and hepatic steatosis [176] and references therein). Among changes induced by the phenol compound is increased transcript expression for ACOX1, which has been considered for its metabolic oxidizing role as regards to protection given by nordihydroguaiaretic acid. However, taking into account the known role of inflammation in the development of steatosis (for a review, see [79]), protection given by nordihydroguaiaretic acid-induced ACOX1 against steatosis might result from anti-inflammatory properties of ACOX1. FGF19 is upregulated by farnesoid X receptor (FXR) and is physiologically involved in carbohydrate, bile, and fatty acid metabolism (for a review, see [80]). It improves glucose and lipid homeostasis and tissue response to insulin, favours weight control and energy metabolism, and as a whole has a beneficial impact in diabetes, heart and kidney diseases, and in obesity and metabolic syndrome [80]. All these aging-related disorders face both metabolic impairment and inflammation, and therefore the fact that ACOX1 is one of the target proteins upregulated by FGF19 [75], might, not only metabolically but also by anti-inflammatory mechanisms, contribute to the health benefits attributed to FGF19. Recently, however, the therapeutic potential of stimulating FGF19 and related signaling has been shaded by showing mitogenic potential conveyed by part of FGF19 protein targets [75]. Additional understanding for the mechanisms specifically mediating metabolic effects and those specifically involved in proliferative effects of FGF19 is awaited in order to uncouple these effects to meet acceptable therapeutic development.

### 9. SPM Protection in Aging-Related Disorders

Aging is long known to reduce peroxisomal  $\beta$ -oxidation and to lower ACOX1 [81]. Interestingly also, aging is associated with an inflammation status notably resulting from a less efficacy of aging to resolve acute inflammation injuries [19]. This lowered effectiveness of the anti-inflammatory response has been shown to be associated with a drop in SPM formation [19]. Accordingly, age-related decline in resolving inflammation is corrected by providing SPM or one of their important precursors, DHA [19]. In aging and in several aging-related diseases, SPM deficiency and/or disease-improvement have been documented. Aging brain is protected by DHA and DHA-derived SPM (notably neuroprotectin D1) [34, 82–85], which also improve outcome of brain ischemia-reperfusion episodes [82–85]. DHA precursors, n-3 PUFAs, and DHA-derived SPM, neuroprotectin D1, improve mitochondrial dysfunction of senescent brain

[86]. In Alzheimer's disease and other degenerative disorders, DHA, SPM or SPM yield-enhancing strategies have proven efficacy in improving neuronal survival and inflammation-driven disease pathogenesis [34, 82, 83, 85, 87–94]. Age-related retinal degeneration and vision disturbances have also been found to involve disturbances in DHA and SPM and to be protected by SPM through cell survival [82, 83, 85, 87, 89, 95]. Brain ischemia/reperfusion and stroke may be improved by SPM-driven survival signaling and reduction in infiltrating leucocytes [82–84, 90]. Atherosclerosis has been also supported to be favourably modulated by SPM [96].

### 10. Anti-Inflammatory Roles of Peroxisomal ACOX1 versus Mitochondrial $\beta$ -Oxidation

Most abundant fatty acids have a long and a straight carbon chain. When assessing the oxidation of these fatty acids as an energy-producing pathway, both mitochondrial and peroxisomal  $\beta$ -oxidation are considered, the former and the latter exhibiting major and minor contributions to overall fatty acid oxidation and the products of the latter being also potential substrates for the former. ACOX1, being the rate-limiting step in the peroxisomal oxidation of straight chain fatty acids, its activity is assayed to account for peroxisomal fatty acid oxidation capacity. Besides a limited role in energy production, ACOX1-driven peroxisomal  $\beta$ -oxidation, because taking place in the yield of potent anti-inflammatory metabolites, also plays a role in inflammation control as largely covered in this review. This role of ACOX1 remains, however, overlooked often in favor of its role in carbon-chain shortening and hence clearance of very long-chain fatty acids or in the contribution, even if minor, in energy production by ACOX1-driven peroxisomal  $\beta$ -oxidation. Whereas peroxisomal  $\beta$ -oxidation-driven protection against inflammation rests on generation of precursors for potent anti-inflammatory mediators, mitochondrial fatty acid oxidation-driven anti-inflammatory protection results from its capacity of removing proinflammatory compounds such as saturated fatty acids. These latter have been shown to promote insulin resistance, oxidative stress and oxidative damage and, in this respect, mitochondrial fatty acid oxidation meets anti-inflammatory function through avoidance of both ROS generation and lipotoxicity and through blunting of palmitate-induced proinflammatory cytokines, ER stress, and oxidative damage [97–102]. On the opposite, mitochondrial fatty acid oxidation may also promote inflammation through inflammasome activation and synthesis of the proinflammatory IL  $1\beta$  [103], making mitochondrial fatty acid oxidation, depending on the context, both inhibitor and stimulator of inflammation. In contrast to peroxisomal ACOX1-driven  $\beta$ -oxidation, mitochondrial fatty acid oxidation would not contribute to the synthesis of precursors for SPM. However, mitochondrial VLCAD (very long chain acyl-CoA dehydrogenase) and LCAD (long chain acyl-CoA dehydrogenase) KO mice have been described to exhibit tissue decrease in DHA (docosahexaenoic acid) levels [104], and whether this effect might result from a lack of contributing or regulatory effect of

mitochondrial fatty acid oxidation or in turn interfering effect of mitochondrial enzyme deficiency through accumulating metabolites on DHA biosynthesis still remains to be elucidated. To our knowledge, SPM levels have still not been reported in peroxisomal and mitochondrial  $\beta$ -oxidation disorders.

Regarding the links between mitochondrial fatty acid oxidation and aging, age-dependent decrease in mitochondrial pathway [105], as well as either increase [106] or decrease [107] in CPT1 rate-limiting step have been reported. Age-dependent decrease of mitochondrial fatty acid oxidation has been shown to be dependent on age-related glutathione drop which also enhances ROS formation and promotes insulin resistance, these metabolic and signaling alterations being corrected by cysteine-based supplementations dedicated to restore intracellular glutathione stores [105]. Increased mitochondrial fatty acid oxidation might finally improve aging as for instance attested by its ability to alleviate age-related liver lipid accumulation [108].

## 11. Conclusion

Recent works on argan oil in prooxidative and inflammatory animal/human models provide a convergent sound support for the antioxidant/anti-inflammatory role of the peroxisomal enzyme, acyl-CoA oxidase type 1 (ACOX1). The model of LPS-driven toxicity and protection by argan oil has been transposed to model similarly aging inflammation also driven by reduced PGC1- $\alpha$  activity and also considered with a special emphasis on anti-inflammatory and hence antiaging key role of ACOX1. From the one hand, this view of ACOX1 is consistent with the key role played by peroxisomal ACOX1 in the production of precursor(s) for the synthesis of lipid mediators directly involved in the resolution of the inflammation process, and for this reason called resolvins. Resolvins and related compounds such as neuroprotectins and maresins are currently referred to as specialized proresolving mediators (SPM). On the other hand, aging and aging-related disorders are associated with reduced PGC1- $\alpha$  function, may be associated with reduced ACOX1 activity, lowered SPM levels, and delayed resolution of inflammation and may be improved by strategies rising ACOX1 (metabolic syndrome and diabetes) and SPM (brain and eye aging along with corresponding neurodegenerative disorders, atherosclerosis, and stroke). The strategical metabolic place occupied by ACOX1, upstream of SPM biosynthesis, along with ability of ACOX1 preservation/induction and of SPM to improve aging-related disorders and with the fact that aging is characterized by a drop in ACOX1 and SPM, all argue towards the view that ACOX1 represents a previously unsuspected and currently emerging antiaging protein.

## Conflicts of Interest

The authors declare that there are no conflicts of interest.

## Acknowledgments

This work was supported by the Action Intégrée of the Comité Mixte Inter-universitaire Franco-Marocain (CMIFM, AIMA/14/310, Campus France) from the PHC Volubilis/Toubkal program (No30293PA), Ministry of Foreign Affairs, The Centre National Pour la Recherche Scientifique et Technique (CNRS) Morocco, the Conseil Régional de Bourgogne (PARI2012:A324; PARI2013:B135; CPS0009) and the Ministère de l'Enseignement et de la Recherche (crédits récurrents). The authors would like to acknowledge networking support by the COST (European Cooperation in Science and Technology) Action CA 16112 NutRedOx (Personalized Nutrition in aging society: redox control of major age-related diseases).

## References

- [1] J. H. Diaz, "Poisoning by herbs and plants: rapid toxicologic classification and diagnosis," *Wilderness & Environmental Medicine*, vol. 27, no. 1, pp. 136–152, 2016.
- [2] J. B. Lingrel, "The physiological significance of the cardio-tonic steroid/ouabain-binding site of the Na,K-ATPase," *Annual Review of Physiology*, vol. 72, no. 1, pp. 395–412, 2010.
- [3] S. Man, W. Gao, C. Wei, and C. Liu, "Anticancer drugs from traditional toxic Chinese medicines," *Phytotherapy Research*, vol. 26, no. 10, pp. 1449–1465, 2012.
- [4] T. J. Lybbert, A. Aboulrare, D. Chaloud, N. Magnan, and M. Naah, "Booming markets for Moroccan argan oil appear to benefit some rural households while threatening the endemic argan forest," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 108, no. 34, pp. 13963–13968, 2011.
- [5] R. Ostan, M. C. Béné, L. Spazzafumo et al., "Impact of diet and nutraceutical supplementation on inflammation in elderly people. Results from the RISTOMED study, an open-label randomized control trial," *Clinical Nutrition*, vol. 35, no. 4, pp. 812–818, 2016.
- [6] R. El Kebbij, P. Andreoletti, H. I. El Hajj et al., "Argan oil prevents down-regulation induced by endotoxin on liver fatty acid oxidation and gluconeogenesis and on peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator-1 $\alpha$  (PGC-1 $\alpha$ ), peroxisome proliferator-activated receptor  $\alpha$  (PPAR $\alpha$ ) and estrogen related receptor  $\alpha$  (ERR $\alpha$ )," *Biochimie Open*, vol. 1, pp. 51–59, 2015.
- [7] S. Ferdinandusse, S. Denis, P. A. Mooijer et al., "Identification of the peroxisomal beta-oxidation enzymes involved in the biosynthesis of docosahexaenoic acid," *Journal of Lipid Research*, vol. 42, no. 12, pp. 1987–1995, 2001.
- [8] S. K. Orr and R. P. Bazinet, "The emerging role of docosahexaenoic acid in neuroinflammation," *Current Opinion in Investigational Drugs*, vol. 9, no. 7, pp. 735–743, 2008.
- [9] C. N. Serhan, N. Chiang, J. Dalli, and B. D. Levy, "Lipid mediators in the resolution of inflammation," *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, vol. 7, no. 2, article a016311, 2014.
- [10] R. El Kebbij, S. El Kamsouli, H. I. El Hajj et al., "Modulation of peroxisomes abundance by argan oil and lipopolysaccharides in acyl-CoA oxidase 1-deficient fibroblasts," *Health*, vol. 5, no. 1, article 26522, 2013.



- [11] H. Berrougui, M. Cloutier, M. Isabelle, and A. Khalil, "Phenolic-extract from argan oil (*Argania spinosa* L.) inhibits human low-density lipoprotein (LDL) oxidation and enhances cholesterol efflux from human THP-1 macrophages," *Atherosclerosis*, vol. 184, no. 2, pp. 389–396, 2006.
- [12] S. El Kamouni, R. El Kebhaj, P. Andreoletti et al., "Protective effect of argan and olive oils against LPS-induced oxidative stress and inflammation in mice livers," *International Journal of Molecular Sciences*, vol. 18, no. 10, article 2181, 2017.
- [13] I. Gurcel, L. Abrami, S. Girardin, J. Tschopp, and F. G. van der Goot, "Caspase-1 activation of lipid metabolic pathways in response to bacterial pore-forming toxins promotes cell survival," *Cell*, vol. 126, no. 6, pp. 1135–1145, 2006.
- [14] K. Ishimoto, H. Nakamura, K. Tachibana et al., "Sterol-mediated regulation of human lipin 1 gene expression in hepatoblastoma cells," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 284, no. 33, pp. 22195–22205, 2009.
- [15] M. C. Sugden, P. W. Caton, and M. J. Holness, "PPAR control: it's SIRTainly as easy as PGC," *Journal of Endocrinology*, vol. 204, no. 2, pp. 93–104, 2010.
- [16] C. Zhang, A. A. Wendel, M. R. Keogh, T. E. Harris, J. Chen, and R. A. Coleman, "Glycerolipid signals alter mTOR complex 2 (mTORC2) to diminish insulin signaling," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 109, no. 5, pp. 1667–1672, 2012.
- [17] G. S. Dhaunsi, C. D. Hanefeld, and I. Singh, "Impairment of peroxisomal  $\beta$ -oxidation system by endotoxin treatment," *Molecular and Cellular Biochemistry*, vol. 135, no. 2, pp. 187–193, 1994.
- [18] J. Schilling, L. Lai, N. Sambandam, C. E. Dey, T. C. Leone, and D. P. Kelly, "Toll-like receptor-mediated inflammatory signaling reprograms cardiac energy metabolism by repressing peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  coactivator-1 signaling," *Circulation: Heart Failure*, vol. 4, no. 4, pp. 474–482, 2011.
- [19] H. H. Armandotzir, J. Dalli, R. A. Colas, M. Shinohara, and C. N. Serhan, "Aging delays resolution of acute inflammation in mice: reprogramming the host response with novel nano-proresolving medicines," *The Journal of Immunology*, vol. 193, no. 8, pp. 4235–4244, 2014.
- [20] T. Wenz, "Mitochondria and PGC-1 $\alpha$  in aging and age-associated diseases," *Journal of Aging Research*, vol. 2011, Article ID 810619, 12 pages, 2011.
- [21] M. E. Patti, A. J. Butte, S. Crunkhorn et al., "Coordinated reduction of genes of oxidative metabolism in humans with insulin resistance and diabetes: potential role of PGC1 and NRF1," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 100, no. 14, pp. 8466–8471, 2003.
- [22] H. Zhang, S.-Y. Zhang, C. Jiang et al., "Intermedin/adrenomedullin 2 polypeptide promotes adipose tissue browning and reduces high-fat diet-induced obesity and insulin resistance in mice," *International Journal of Obesity*, vol. 40, no. 5, pp. 852–860, 2016.
- [23] A. O. Kadlec, D. S. Chabowski, K. Ait-Aissa et al., "PGC-1 $\alpha$  (peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  coactivator 1- $\alpha$ ) overexpression in coronary artery disease recruits NO and hydrogen peroxide during flow-mediated dilation and protects against increased intraluminal pressure," *Hypertension*, vol. 70, no. 1, pp. 166–173, 2017.
- [24] M. Sajan, B. Hansen, R. Ivey III et al., "Brain insulin signaling is increased in insulin-resistant states and decreases in FOXOs and PGC-1 $\alpha$  and increases in A $\beta$ <sub>1–42</sub> and phospho-tau may abet Alzheimer development," *Diabetes*, vol. 65, no. 7, pp. 1892–1903, 2016.
- [25] G. Sweeney and J. Song, "The association between PGC-1 $\alpha$  and Alzheimer's disease," *Anatomy & Cell Biology*, vol. 49, no. 1, pp. 1–6, 2016.
- [26] H. Jiang, S. U. Kang, S. Zhang et al., "Adult conditional knockout of PGC-1 $\alpha$  leads to loss of dopamine neurons," *eNeuro*, vol. 3, no. 4, 2016.
- [27] C. H. Ng, A. H. Basil, L. Hang et al., "Genetic or pharmacological activation of the *Drosophila* PGC-1 $\alpha$  ortholog *spargel* rescues the disease phenotypes of genetic models of Parkinson's disease," *Neurobiology of Aging*, vol. 55, pp. 33–37, 2017.
- [28] A. Siddiqui, A. Rane, S. Rajagopalan, S. J. Chinta, and J. K. Andersen, "Detrimental effects of oxidative losses in parkin activity in a model of sporadic Parkinson's disease are attenuated by restoration of PGC1 $\alpha$ ," *Neurobiology of Disease*, vol. 93, pp. 115–120, 2016.
- [29] L. Cui, H. Jeong, F. Borovecki, C. N. Parkhurst, N. Tanese, and D. Krainc, "Transcriptional repression of PGC-1 $\alpha$  by mutant huntingtin leads to mitochondrial dysfunction and neurodegeneration," *Cell*, vol. 127, no. 1, pp. 59–69, 2006.
- [30] S. Jesse, H. Bayer, M. C. Alupei et al., "Ribosomal transcription is regulated by PGC-1 $\alpha$  and disturbed in Huntington's disease," *Scientific Reports*, vol. 7, no. 1, p. 8513, 2017.
- [31] P. Weydt, V. V. Pineda, A. E. Torrence et al., "Thermoregulatory and metabolic defects in Huntington's disease transgenic mice implicate PGC-1 $\alpha$  in Huntington's disease neurodegeneration," *Cell Metabolism*, vol. 4, no. 5, pp. 349–362, 2006.
- [32] Ó. Fabregat-Andrés, F. Ridocci-Soriano, J. Estornell-Erill et al., "Blood PGC-1 $\alpha$  concentration predicts myocardial salvage and ventricular remodeling after ST-segment elevation acute myocardial infarction," *Revista Española de Cardiología (English Edition)*, vol. 68, no. 5, pp. 408–416, 2015.
- [33] H. F. Pei, J. N. Hou, F. P. Wei et al., "Melatonin attenuates postmyocardial infarction injury via increasing Tom70 expression," *Journal of Pineal Research*, vol. 62, no. 1, article e12371, 2017.
- [34] D. Sun and F. Yang, "Metformin improves cardiac function in mice with heart failure after myocardial infarction by regulating mitochondrial energy metabolism," *Biochemical and Biophysical Research Communications*, vol. 486, no. 2, pp. 329–335, 2017.
- [35] L. Tao, Y. Bei, S. Lin et al., "Exercise training protects against acute myocardial infarction via improving myocardial energy metabolism and mitochondrial biogenesis," *Cellular Physiology and Biochemistry*, vol. 37, no. 1, pp. 162–175, 2015.
- [36] Z. Wang, J. Ding, X. Luo et al., "Effect of allopurinol on myocardial energy metabolism in chronic heart failure rats after myocardial infarct," *International Heart Journal*, vol. 57, no. 6, pp. 753–759, 2016.
- [37] W. Yan, H. Zhang, P. Liu et al., "Impaired mitochondrial biogenesis due to dysfunctional adiponectin-AMPK-PGC-1 $\alpha$  signaling contributing to increased vulnerability in diabetic heart," *Basic Research in Cardiology*, vol. 108, no. 3, p. 329, 2013.



- [38] S. Camandola and M. P. Mattson, "Brain metabolism in health, aging, and neurodegeneration," *EMBO Journal*, vol. 36, no. 11, pp. 1474–1492, 2017.
- [39] K. Róna-Vörös and P. Weydt, "The role of PGC-1 $\alpha$  in the pathogenesis of neurodegenerative disorders," *Current Drug Targets*, vol. 11, no. 10, pp. 1262–1269, 2010.
- [40] S. M. Craig, S. Kröller-Schön, C. Li et al., "PGC-1 $\alpha$  dictates endothelial function through regulation of eNOS expression," *Scientific Reports*, vol. 6, no. 1, article 38210, 2016.
- [41] A. O. Kadlec, D. S. Chabowski, K. Ait-Aissa, and D. D. Gutterman, "Role of PGC-1 $\alpha$  in vascular regulation: implications for atherosclerosis," *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, vol. 36, no. 8, pp. 1467–1474, 2016.
- [42] A. S. Ryan, G. Li, C. Hafer-Macko, and F. M. Ivey, "Resistive training and molecular regulators of vascular-metabolic risk in chronic stroke," *Journal of Stroke and Cerebrovascular Diseases*, vol. 26, no. 5, pp. 962–968, 2017.
- [43] Y. You, Y. Hou, X. Zhai et al., "Protective effects of PGC-1 $\alpha$  via the mitochondrial pathway in rat brains after intracerebral hemorrhage," *Brain Research*, vol. 1646, pp. 34–43, 2016.
- [44] M. Cherkaoui-Malki, S. Surapureddi, H. I. El-Hajj, J. Vamecq, and P. Andreoletti, "Hepatic steatosis and peroxisomal fatty acid  $\beta$ -oxidation," *Current Drug Metabolism*, vol. 13, no. 10, pp. 1412–1421, 2012.
- [45] R. J. A. Wanders, "Peroxisomes, lipid metabolism, and peroxisomal disorders," *Molecular Genetics and Metabolism*, vol. 83, no. 1–2, pp. 16–27, 2004.
- [46] S. Ferdinandusse, S. Denis, C. W. T. van Roermund et al., "A novel case of ACOX2 deficiency leads to recognition of a third human peroxisomal acyl-CoA oxidase," *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*, vol. 1864, no. 3, pp. 952–958.
- [47] C. Y. Fan, J. Pan, N. Usuda, A. V. Yeldandi, M. S. Rao, and 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," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 273, no. 25, pp. 15639–15645, 1998.
- [48] J. Huang, N. Viswakarma, S. Yu et al., "progressive endoplasmic reticulum stress contributes to hepatocarcinogenesis in fatty Acyl-CoA oxidase 1-deficient mice," *American Journal of Pathology*, vol. 179, no. 2, pp. 703–713, 2011.
- [49] A. Vluggens, P. Andreoletti, N. Viswakarma et al., "Functional significance of the two ACOX1 isoforms and their crosstalks with PPAR $\alpha$  and RXR $\alpha$ ," *Laboratory Investigation*, vol. 90, no. 5, pp. 696–708, 2010.
- [50] S. S. Lee, T. Pineau, J. Drago et al., "Targeted disruption of the alpha isoform of the peroxisome proliferator-activated receptor gene in mice results in abolishment of the pleiotropic effects of peroxisome proliferators," *Molecular and Cellular Biology*, vol. 15, no. 6, pp. 3012–3022, 1995.
- [51] F. S. Eichler, J. Q. Ren, M. Cossoy et al., "Is microglial apoptosis an early pathogenic change in cerebral X-linked adrenoleukodystrophy?," *Annals of Neurology*, vol. 63, no. 6, pp. 729–742, 2008.
- [52] H. I. El-Hajj, A. Vluggens, P. Andreoletti et al., "The inflammatory response in acyl-CoA oxidase 1 deficiency (pseudoneonatal adrenoleukodystrophy)," *Endocrinology*, vol. 153, no. 6, pp. 2568–2575, 2012.
- [53] A. S. Paintlia, A. G. Gilg, M. Khan, A. K. Singh, E. Barbosa, and I. Singh, "Correlation of very long chain fatty acid accumulation and inflammatory disease progression in childhood X-ALD: implications for potential therapies," *Neurobiology of Disease*, vol. 14, no. 3, pp. 425–439, 2003.
- [54] H. Guillou, D. Zdravcev, P. G. P. Martin, and A. Jacobsson, "The key roles of elongases and desaturases in mammalian fatty acid metabolism: insights from transgenic mice," *Progress in Lipid Research*, vol. 49, no. 2, pp. 186–199, 2010.
- [55] E. Christensen, B. Woldseth, T. A. Hagve et al., "Peroxisomal  $\beta$ -oxidation of polyunsaturated long chain fatty acids in human fibroblasts. The polyunsaturated and the saturated long chain fatty acids are retroconverted by the same acyl-CoA oxidase," *Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation*, vol. 53, no. sup215, pp. 61–74, 1993.
- [56] M. Grønn, E. Christensen, T. A. Hagve, and B. O. Christophersen, "Peroxisomal retroconversion of docosahexaenoic acid (22:6(n-3)) to eicosapentaenoic acid (20:5(n-3)) studied in isolated rat liver cells," *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Lipids and Lipid Metabolism*, vol. 1081, no. 1, pp. 85–91, 1991.
- [57] T. A. Hagve and B. O. Christophersen, "Evidence for peroxisomal retroconversion of adrenic acid (22:4(n-6)) and docosahexaenoic acids (22:6(n-3)) in isolated liver cells," *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Lipids and Lipid Metabolism*, vol. 875, no. 2, pp. 165–173, 1986.
- [58] S. A. Moore, E. Hurt, E. Yoder, H. Sprecher, and A. A. Spector, "Docosahexaenoic acid synthesis in human skin fibroblasts involves peroxisomal retroconversion of tetraacosahexaenoic acid," *Journal of Lipid Research*, vol. 36, no. 11, pp. 2433–2443, 1995.
- [59] H. M. Su, A. B. Moser, H. W. Moser, and P. A. Watkins, "Peroxisomal straight-chain acyl-CoA oxidase and D-bifunctional protein are essential for the retroconversion step in docosahexaenoic acid synthesis," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 276, no. 41, pp. 38115–38120, 2001.
- [60] S. Nicosia and C. Patrono, "Eicosanoid biosynthesis and action: novel opportunities for pharmacological intervention," *FASEB Journal*, vol. 3, no. 8, pp. 1941–1948, 1989.
- [61] H. Tapiero, G. Nguyen Ba, P. Couvreur, and K. D. Tew, "Polyunsaturated fatty acids (PUFA) and eicosanoids in human health and pathologies," *Biomedicine & Pharmacotherapy*, vol. 56, no. 5, pp. 215–222, 2002.
- [62] V. A. Ziboh, C. C. Miller, and Y. Cho, "Metabolism of polyunsaturated fatty acids by skin epidermal enzymes: generation of antiinflammatory and antiproliferative metabolites," *American Journal of Clinical Nutrition*, vol. 71, 1 Supplement, pp. 361S–366S, 2000.
- [63] H. R. Waterham, S. Ferdinandusse, and R. J. A. Wanders, "Human disorders of peroxisome metabolism and biogenesis," *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, vol. 1863, no. 5, pp. 922–933, 2016.
- [64] C. Boudraut, R. P. Bazinet, and D. W. L. Ma, "Experimental models and mechanisms underlying the protective effects of n-3 polyunsaturated fatty acids in Alzheimer's disease," *The Journal of Nutritional Biochemistry*, vol. 20, no. 1, pp. 1–10, 2009.
- [65] W. J. Lukiw and N. G. Bazan, "Docosahexaenoic acid and the aging brain," *The Journal of Nutrition*, vol. 138, no. 12, pp. 2510–2514, 2008.
- [66] N. G. Bazan, "Survival signaling in retinal pigment epithelial cells in response to oxidative stress: significance in retinal degenerations," *Advances in Experimental Medicine and Biology*, vol. 572, pp. 531–540, 2006.

- [67] C. M. Yates, P. C. Calder, and G. Ed Rainger, "Pharmacology and therapeutics of omega-3 polyunsaturated fatty acids in chronic inflammatory disease," *Pharmacology & Therapeutics*, vol. 141, no. 3, pp. 272–282, 2014.
- [68] H. G. Park, W. J. Park, K. S. D. Kothapalli, and J. Thomas Brenna, "The fatty acid desaturase 2 (*FADS2*) gene product catalyzes  $\Delta 4$  desaturation to yield n-3 docosahexaenoic acid and n-6 docosapentaenoic acid in human cells," *The FASEB Journal*, vol. 29, no. 9, pp. 3911–3919, 2015.
- [69] J. P. Infante, C. L. Tschanz, N. Shaw, A. L. Michaud, P. Lawrence, and J. T. Brenna, "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," *Molecular Genetics and Metabolism*, vol. 75, no. 2, pp. 108–119, 2002.
- [70] Q. Qu, W. Xuan, and G. H. Fan, "Roles of resolvins in the resolution of acute inflammation," *Cell Biology International*, vol. 39, no. 1, pp. 3–22, 2015.
- [71] S. Bellahcen, Z. Hakkou, A. Ziyat et al., "Antidiabetic and antihypertensive effect of virgin argan oil in model of neonatal streptozotocin-induced diabetic and L-nitroarginine methylester (l-NAME) hypertensive rats," *Journal of Complementary and Integrative Medicine*, vol. 10, no. 1, 2013.
- [72] S. Bellahcen, H. Mekhfi, A. Ziyat et al., "Prevention of chemically induced diabetes mellitus in experimental animals by virgin argan oil," *Phytotherapy Research*, vol. 26, no. 2, pp. 180–185, 2012.
- [73] M. M. Ould Mohamedou, K. Zouirech, M. El Messal, M. S. El Kebhaj, A. Chraïbi, and A. Adlouni, "Argan oil exerts an antiatherogenic effect by improving lipids and susceptibility of LDL to oxidation in type 2 diabetes patients," *International Journal of Endocrinology*, vol. 2011, Article ID 747835, 8 pages, 2011.
- [74] S. Samane, J. Noël, Z. Charrouf, H. Amarouch, and P. S. Haddad, "Insulin-sensitizing and anti-proliferative effects of *Argania spinosa* seed extracts," *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine*, vol. 3, no. 3, pp. 317–327, 2006.
- [75] V. Massafra, A. Milona, H. R. Vos, B. M. T. Burgering, and S. W. C. van Mil, "Quantitative liver proteomics identifies FGF19 targets that couple metabolism and proliferation," *PLoS One*, vol. 12, no. 2, article e0171185, 2017.
- [76] H. Zhang, Y. Li, J. Hu et al., "Effect of creosote bush-derived NDGA on expression of genes involved in lipid metabolism in liver of high-fructose fed rats: relevance to NDGA amelioration of hypertriglyceridemia and hepatic steatosis," *PLoS One*, vol. 10, no. 9, article e0138203, 2015.
- [77] J. Hernández-Damián, A. C. Andérica-Romero, and J. Pedraza-Chaverri, "Paradoxical cellular effects and biological role of the multifaceted compound nordihydroguaiaretic acid," *Archiv der Pharmazie*, vol. 347, no. 10, pp. 685–697, 2014.
- [78] J. M. Lã, J. Nurko, S. M. Weakley et al., "Molecular mechanisms and clinical applications of nordihydroguaiaretic acid (NDGA) and its derivatives: an update," *Medical Science Monitor*, vol. 16, no. 5, pp. RA93–R100, 2010.
- [79] W. Peverill, L. Powell, and R. Skoien, "Evolving concepts in the pathogenesis of NASH: beyond steatosis and inflammation," *International Journal of Molecular Sciences*, vol. 15, no. 12, pp. 8591–8638, 2014.
- [80] F. Zhang, L. Yu, X. Lin et al., "Minireview: roles of fibroblast growth factors 19 and 21 in metabolic regulation and chronic diseases," *Molecular Endocrinology*, vol. 29, no. 10, pp. 1400–1413, 2015.
- [81] R. Périchon, J. M. Bourre, J. F. Kelly, and G. S. Roth, "The role of peroxisomes in aging," *Cellular and Molecular Life Sciences (CMLS)*, vol. 54, no. 7, pp. 641–652, 1998.
- [82] N. G. Bazan, "Cellular and molecular events mediated by docosahexaenoic acid-derived neuroprotectin D1 signaling in photoreceptor cell survival and brain protection," *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids*, vol. 81, no. 2-3, pp. 205–211, 2009.
- [83] N. G. Bazan, "Neuroprotectin D1-mediated anti-inflammatory and survival signaling in stroke, retinal degenerations, and Alzheimer's disease," *Journal of Lipid Research*, vol. 50, Supplement, pp. S400–S405, 2009.
- [84] F. Echeverría, R. Valenzuela, M. Catalina Hernandez-Rodas, and A. Valenzuela, "Docosahexaenoic acid (DHA), a fundamental fatty acid for the brain: new dietary sources," *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids*, vol. 124, pp. 1–10, 2017.
- [85] P. K. Mukherjee, A. Chawla, M. S. Losyza, and N. G. Bazan, "Docosanoids are multifunctional regulators of neural cell integrity and fate: significance in aging and disease," *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids*, vol. 77, no. 5-6, pp. 233–238, 2007.
- [86] S. Afshordel, S. Hagl, D. Werner et al., "Omega-3 polyunsaturated fatty acids improve mitochondrial dysfunction in brain aging – impact of Bcl-2 and NPD-1 like metabolites," *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids (PLEFA)*, vol. 92, pp. 23–31, 2015.
- [87] N. G. Bazan, M. F. Molina, and W. C. Gordon, "Docosahexaenoic acid signalolipidomics in nutrition: significance in aging, neuroinflammation, macular degeneration, Alzheimer's, and other neurodegenerative diseases," *Annual Review of Nutrition*, vol. 31, no. 1, pp. 321–351, 2011.
- [88] M. Fiala, N. Terrando, and J. Dalli, "Specialized pro-resolving mediators from omega-3 fatty acids improve amyloid- $\beta$  phagocytosis and regulate inflammation in patients with minor cognitive impairment," *Journal of Alzheimer's Disease*, vol. 48, no. 2, pp. 293–301, 2015.
- [89] W. J. Lukiw and N. G. Bazan, "Inflammatory, apoptotic, and survival gene signaling in Alzheimer's disease. A review on the bioactivity of neuroprotectin D1 and apoptosis," *Molecular Neurobiology*, vol. 42, no. 1, pp. 10–16, 2010.
- [90] R. Palacios-Pelaez, W. J. Lukiw, and N. G. Bazan, "Omega-3 essential fatty acids modulate initiation and progression of neurodegenerative disease," *Molecular Neurobiology*, vol. 41, no. 2-3, pp. 367–374, 2010.
- [91] C. Zhang and N. G. Bazan, "Lipid-mediated cell signaling protects against injury and neurodegeneration," *Journal of Nutrition*, vol. 140, no. 4, pp. 858–863, 2010.
- [92] Y. Zhao, S. Bhattacharjee, B. M. Jones, J. Hill, P. Dua, and W. J. Lukiw, "Regulation of neurotropic signaling by the inducible, NF- $\kappa$ B-sensitive miRNA-125b in Alzheimer's disease (AD) and in primary human neuronal-gial (HNG) cells," *Molecular Neurobiology*, vol. 50, no. 1, pp. 97–106, 2014.
- [93] Y. Zhao, F. Calon, C. Julien et al., "Docosahexaenoic acid-derived neuroprotectin D1 induces neuronal survival via secretase- and PPAR $\gamma$ -mediated mechanisms in Alzheimer's disease models," *PLoS One*, vol. 6, no. 1, article e15816, 2011.



- [94] M. Zhu, X. Wang, E. Hjorth et al., "Pro-resolving lipid mediators improve neuronal survival and increase  $A\beta_{42}$  phagocytosis," *Molecular Neurobiology*, vol. 53, no. 4, pp. 2733–2749, 2016.
- [95] N. G. Bazan, "Neurotrophins induce neuroprotective signaling in the retinal pigment epithelial cell by activating the synthesis of the anti-inflammatory and anti-apoptotic neuroprotectin D1," *Advances in Experimental Medicine and Biology*, vol. 613, pp. 39–44, 2008.
- [96] G. Fredman and I. Tabas, "Boosting inflammation resolution in atherosclerosis: the next frontier for therapy," *The American Journal of Pathology*, vol. 187, no. 6, pp. 1211–1221, 2017.
- [97] C. R. Bruce, A. J. Hoy, N. Turner et al., "Overexpression of carnitine palmitoyltransferase-1 in skeletal muscle is sufficient to enhance fatty acid oxidation and improve high-fat diet-induced insulin resistance," *Diabetes*, vol. 58, no. 3, pp. 550–558, 2009.
- [98] D. Namgaladze and B. Brüne, "Macrophage fatty acid oxidation and its roles in macrophage polarization and fatty acid-induced inflammation," *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids*, vol. 1861, no. 11, pp. 1796–1807, 2016.
- [99] D. Namgaladze, S. Lips, T. J. Leiker et al., "Inhibition of macrophage fatty acid  $\beta$ -oxidation exacerbates palmitate-induced inflammatory and endoplasmic reticulum stress responses," *Diabetologia*, vol. 57, no. 5, pp. 1067–1077, 2014.
- [100] M. I. Malandrino, R. Fucho, M. Weber et al., "Enhanced fatty acid oxidation in adipocytes and macrophages reduces lipid-induced triglyceride accumulation and inflammation," *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, vol. 308, no. 9, pp. E756–E769, 2015.
- [101] J. M. Orellana-Gavaldà, I. Herrero, M. I. Malandrino et al., "Molecular therapy for obesity and diabetes based on a long-term increase in hepatic fatty-acid oxidation," *Hepatology*, vol. 53, no. 3, pp. 821–832, 2011.
- [102] D. Sebastián, I. Herrero, D. Serra, G. Asins, and F. G. Hegardt, "CPT I overexpression protects L6E9 muscle cells from fatty acid-induced insulin resistance," *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, vol. 292, no. 3, pp. E677–E686, 2007.
- [103] J. S. Moon, K. Nakahira, K. P. Chung et al., "NOX4-dependent fatty acid oxidation promotes NLRP3 inflammasome activation in macrophages," *Nature Medicine*, vol. 22, no. 9, pp. 1002–1012, 2016.
- [104] S. M. Houten, S. Violante, F. V. Ventura, and R. J. A. Wanders, "The biochemistry and physiology of mitochondrial fatty acid  $\beta$ -oxidation and its genetic disorders," *Annual Review of Physiology*, vol. 78, no. 1, pp. 23–44, 2016.
- [105] D. Nguyen, S. L. Samson, V. T. Reddy, E. V. Gonzalez, and R. V. Sekhar, "Impaired mitochondrial fatty acid oxidation and insulin resistance in aging: novel protective role of glutathione," *Aging Cell*, vol. 12, no. 3, pp. 415–425, 2013.
- [106] L. Zhao, X. Zou, Z. Feng et al., "Evidence for association of mitochondrial metabolism alteration with lipid accumulation in aging rats," *Experimental Gerontology*, vol. 56, pp. 3–12, 2014.
- [107] R. H. Houtkooper, C. Argmann, S. M. Houten et al., "The metabolic footprint of aging in mice," *Science Reports*, vol. 1, no. 1, p. 134, 2011.
- [108] H. J. An, B. Lee, S. M. Kim et al., "A PPAR pan agonist, MHY2013 alleviates age-related hepatic lipid accumulation by promoting fatty acid oxidation and suppressing inflammation," *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, vol. 41, no. 1, pp. 29–35, 2018.

## **Titre : Effets d'extraits de cactus sur la modulation du stress oxydant et du processus inflammatoire liés à la déficience en acyl-CoA oxydase 1.**

**Mots clés :** Cactus – ACOX1- microglie - BV-2 – Stress oxydant - inflammation

**Résumé :** La déficience en Acyl-CoA oxydase 1 (ACOX1) est une leucodystrophie peroxysomale rare et sévère associée à un déficit dans la  $\beta$ -oxydation des acides gras à très long chaîne. À cause du rôle clé de ce déficit peroxysomal microglial dans la physiopathogénèse de la déficience en ACOX1, nous avons utilisé la lignée microgliale BV-2 comme modèle : (i) pour évaluer les propriétés antioxydantes et anti-inflammatoires des extraits de raquettes du cactus *Opuntia ficus-indica* ; (ii) pour caractériser une nouvelle lignée BV-2 déficiente en ACOX1 générée récemment dans notre laboratoire par édition génique grâce à la méthode CRISPR-Cas9. Dans la première partie des travaux, les cellules BV-2, activées par exposition à quatre sérotypes de lipopolysaccharides (LPS), montre un lien entre la structure du LPS et l'effet sur la  $\beta$ -oxydation des acides gras et les enzymes antioxydantes dans le peroxysome : les LPS dérivant d'*Escherichia coli* diminuent l'activité ACOX1 alors que les LPS de *Salmonella minnesota* réduisent l'activité catalase. Remarquablement, les différents extraits de cactus stimulent l'activité catalase. Cet effet antioxydant est accompagné par un effet anti-inflammatoire attesté par la réduction de la production LPS-dépendante d'oxyde nitrique dans les BV-2. Nos résultats suggèrent que les extraits de cactus auraient une activité neuroprotectrice sur les cellules microgliales activées à travers l'induction d'activités anti-oxydantes peroxysomales et l'inhibition de la production de NO. Dans la deuxième partie des travaux, la caractérisation de la lignée BV-2 déficiente en ACOX1, portant des mutations alléliques, confirme l'absence de la protéine et de l'activité ACOX1. Bien que ces cellules aient une croissance plus faible, elles ne montrent pas de modifications morphologiques détectables. Par contre, l'activité catalase, due à l'enzyme peroxysomale dégradant l' $H_2O_2$ , est augmentée. Les études par fractionnement subcellulaire et par ultracentrifugation en gradient Nycodenz révèlent une modification de la densité et de la taille de peroxysomes. De plus, ces cellules microgliales déficientes montrent une profonde modification de l'expression des gènes liés à l'inflammation (IL-1b, IL-4, TNF- $\alpha$ ) et particulièrement l'expression de la protéine CCL2/MCP-1 impliquée dans la neuro-inflammation. Cette nouvelle lignée microgliale déficiente en ACOX1 révèlent les mêmes dérégulations biochimiques que celles décrites chez les patients déficients en ACOX1 et représente donc un modèle pour l'étude des conséquences du déficit de la  $\beta$ -oxydation peroxysomale dans la microglie sur les fonctions peroxysomales, le stress oxydatif, l'inflammation et les fonctions cellulaires.

## **Title: Effects of cactus extracts on the modulation of oxidative stress and the inflammatory process related to acyl-CoA oxidase 1 deficiency.**

**Keywords :** Cactus- microglia - BV-2 - Oxidative stress – inflammation

**Abstract:** Acyl-CoA oxidase 1 (ACOX1) deficiency is a rare and severe peroxisomal leukodystrophy associated with a very long-chain fatty acids  $\beta$ -oxidation defect. As peroxisomal defects in microglia appear to be a key component of physiopathogenesis in ACOX1 deficiency, we used the BV-2 microglial cell line as model: (i) to evaluate the antioxidant and anti-inflammatory properties of *Opuntia ficus-indica* cactus cladode extracts; (ii) to characterize a new BV-2 ACOX1 deficient cell line recently generated in our laboratory by CRISPR/Cas9 gene editing. In the first part of this work, the microglia activation, achieved by BV-2 cells exposition to four structurally and biologically well-defined lipopolysaccharides (LPS) serotypes, exhibited a LPS structure-related differential effect on fatty acid  $\beta$ -oxidation and antioxidant enzymes in peroxisomes: LPS derived from *Escherichia coli* diminished ACOX1 activity while LPS from *Salmonella minnesota* decreased catalase activity. Interestingly, microglial catalase activity activation was obtained by different cactus extracts. This antioxidant effect was accompanied by an anti-inflammatory effect revealed by the reduction of nitric oxide (NO) LPS-dependent production. *Our results suggest that cactus extracts may have a neuroprotective activity in activated microglial cells through the induction of peroxisomal antioxidant activity and the inhibition of NO production.* In the second part, the characterization of the BV-2 ACOX1 deficient cell line, with allelic mutations, confirmed the absence of ACOX1 protein and enzymatic activity. Although the mutant cells grew more slowly than control cells, they didn't show any discernible morphological changes. However, catalase activity, due to the peroxisomal  $H_2O_2$ -degrading enzyme, was significantly enhanced. Subcellular fractionation and ultracentrifugation on Nycodenz gradient studies revealed a relative modification in size and density of peroxisomes in ACOX1-deficient cells. Besides this, ACOX1 deficient cells show a profound modification of inflammatory gene expression (IL-1b, IL-4, TNF- $\alpha$ ) and particularly of CCL2/MCP-1 protein, which is involved in neuroinflammation. This new *Acox1*-deficient cell line presents the same biochemical changes shown in the human ACOX1 deficiency and represents a promising model to decipher the consequences of a specific microglial peroxisomal  $\beta$ -oxidation defect on peroxisomal functions, oxidative stress, inflammation and cellular functions.