



HAL
open science

Etude des effets protecteurs de substances naturelles issues du cactus sur le stress oxydant et l'inflammation liés à l'absence de la β -oxydation peroxysomale

Mounia Tahri Joutey

► **To cite this version:**

Mounia Tahri Joutey. Etude des effets protecteurs de substances naturelles issues du cactus sur le stress oxydant et l'inflammation liés à l'absence de la β -oxydation peroxysomale. Biochimie, Biologie Moléculaire. Université Bourgogne Franche-Comté; Université Hassan Ier (Settat, Maroc), 2023. Français. NNT: 2023UBFCK010 . tel-04114655

HAL Id: tel-04114655

<https://theses.hal.science/tel-04114655v1>

Submitted on 2 Jun 2023

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 – Settat – Maroc
CENTRE D'ETUDES DOCTORALES BIOLOGIE SANTE ET ENVIRONNEMENT
FACULTE DES SCIENCES ET TECHNIQUES**

**UNIVERSITE DE BOURGOGNE – Dijon – France
ECOLE DOCTORALE DES SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTE
UFR DES SCIENCES DE LA VIE DE LA TERRE ET DE L'ENVIRONNEMENT**

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

**Etude des effets protecteurs de substances naturelles issues du cactus sur le
stress oxydant et l'inflammation liés à l'absence de la β -oxydation
peroxysomale**

**Discipline : Science de la vie
Spécialité : Médecine. Biochimie. Biologie cellulaire et moléculaire. Physiologie et Nutrition**

**Présentée et soutenue par
Mounia Tahri-Joutey**

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 entre les deux laboratoires :

- Laboratoire de Biochimie et Neurosciences ressources naturelles et environnement de la Faculté des Sciences et Techniques, Université de Hassan Ier, Settat – Maroc, sous la direction du Professeur Boubker NASSER.
- Laboratoire de Biochimie du Peroxysome, Inflammation et Métabolisme Lipidique « Bio-PeroXIL, 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.

Ce travail n'aurait pu être mené à bien sans l'aide financière, et le soutien matériel de différents organismes, qui ont reconnu mon travail et m'ont fait confiance :

- Action intégrée PHC Toubkal/19/92 : 41501RJ
- European Cooperation in Science & Technology - COST CA16112-45105
- École Doctorale Santé et Environnement, Université de Bourgogne Franche-Comté, Dijon - France
- Centre national pour la recherche scientifique et technique « CNRST », Programme de bourses d'excellence de recherche - 17UHP2019-Rabat- Maroc

Publications acceptées:

Tahri-Joutey Mounia, Pierre Andreoletti, Sailesh Surapureddi, Boubker Nasser, Mustapha Cherkaoui-Malki, and Norbert Latruffe. 2021. "Mechanisms Mediating the Regulation of Peroxisomal Fatty Acid Beta-Oxidation by PPAR α " International Journal of Molecular Sciences 22, no. 16: 8969. <https://doi.org/10.3390/ijms22168969>

Tahri-Joutey Mounia, Fatima-Ezzahra Saih, Riad El Kebbaj, Catherine Gondcaille, Joseph Vamecq, Norbert Latruffe, Gérard Lizard, Stéphane Savary, Boubker Nasser, Mustapha Cherkaoui-Malki, and Pierre Andreoletti. 2022. "Protective Effect of Nopal Cactus (*Opuntia ficus-indica*) Seed Oil against Short-Term Lipopolysaccharides-Induced Inflammation and Peroxisomal Functions Dysregulation in Mouse Brain and Liver" International Journal of Molecular Sciences 23, no. 19: 11849. <https://doi.org/10.3390/ijms231911849>

Communications orales et affichées :

Tahri-Joutey. M, Trompier. D, Hamer. I, Raas. Q, Gondcaille. C, Hamon. Y, Nasser. B, Jadot. M, Cherkaoui-Malki. M, Savary. S and Andreoletti. P. Impact of peroxisomal β -oxidation deficiencies on microglial cells vital functions: microglial phagocytosis and lysosomal functions. 2021 July 08. La 8ème édition de la journée doctorale 2020-FST-Settat Maroc. **(Communication orale)**

Tahri-Joutey. M, Saih. FE, El Kebbaj. R, Andreoletti. P, Essamadi. AK, Cherkaoui-Malki. M and Nasser. B. Protective effect of cactus seed oil on oxidative-stress and inflammation induced by LPS in mice 2021 July 08. La 8ème édition de la journée doctorale 2020-FST-Settat Maroc. **(Poster)**

Tahri-Joutey. M, Trompier. D, Hamer. I, Raas. Q, Gondcaille. C, Hamon. Y, Nasser. B, Jadot. M, Cherkaoui-Malki. M, Savary. S and Andreoletti. P. Dysregulation of microglial phagocytosis and lysosomal functions in peroxisomal β -oxidation deficiencies. 7th Open European Peroxisome Meeting 2020, October 15 – October 16, 2020 Zoom Conference. **(Communication orale)**

Cherkaoui-Malki M, Shaaban S, **Tahri-Joutey M**, Elshobaky A, Saih F-E, Vervandier-Fasseur D, Jacob C, Nasser B, Latruffe N & Andreoletti P. Cytoprotective and Antioxidants in Peroxisomal Neurodegenerative Diseases. Proceedings of Natural Products and the Hallmarks of Chronic Diseases-NutRedOx COST Action 16112) Published: 28 April 2019. **(Communication orale).**

A. Tawbeh, **M. Tahri Joutey**, Q. Raas¹, C. Gondcaille, B. Nasser, D. Trompier, P. Andreoletti, M. Cherkaoui-Malki, S. Savary, Disruption of peroxisomal beta-oxidation in microglia leads to alterations in lysosome and autophagy markers. 10èmes Journées Scientifiques de l'Autophagie, du 31 mai au 02 juin 2022 CFATG 10 (31 mai 2022) Besançon, France. **(Poster)**

M. Tahri-Joutey, A. Tawbeh, Q. Raas, C. Gondcaille, I. Hamer, M. Jadot, B. Nasser, D. Trompier, M. Cherkaoui-Malki, S. Savary, P. Andreoletti, Alterations in lysosome and autophagy markers associated with peroxisomal beta-oxidation defect in microglial cells. CFATG 10 (31 mai 2022) CFATG organisation Besançon, France. **(Communication orale)**

M. Tahri-Joutey, A. Tawbeh, Q. Raas, C. Gondcaille, B. Nasser, D. Trompier, M. Cherkaoui-Malki, S. Savary, P. Andreoletti, Impact of peroxisomal β -oxidation deficiencies on lysosome and autophagy in microglial cells, Forum jeune chercheur Jeudi 16 juin 2022, Dijon, France. **(Poster)**

Tahri-Joutey. M, Trompier. D, Hamer. I, Raas. Q, Gondcaille. C, Hamon. Y, Nasser. B, Jadot. M2, Cherkaoui-Malki. M, Savary. S and Andreoletti. P. Peroxisomal β -oxidation deficiencies cause a disruption of microglial cells phagocytosis and lysosomal functions, Université Hassan 1er, FST Settat, 07 décembre 2021, **(Poster)**

Je dédie ce travail

A mes chers parents

A ma sœur

A mes frères

A ma belle-sœur et ma petite nièce

A ma famille

A mes amis

A l'issue de cette thèse, je suis convaincue qu'elle est loin d'être un travail qu'on mène tout seul. En effet, je n'aurais jamais pu finaliser ce travail sans la confiance et le soutien d'un grand nombre de personnes qui m'ont permis de progresser dans cette phase aussi bien instructive que délicate.

Je tiens à remercier,

Monsieur le Professeur, NASSER Boubker, directeur de thèse au Maroc, pour sa confiance et sa grande disponibilité. Je lui suis également reconnaissante de son aide administrative, de ses conseils, et de la patience qu'il m'a accordée tout au long de ce travail. Il m'a tout d'abord permis d'intégrer l'équipe en me proposant un sujet très intéressant. C'est également grâce à sa collaboration avec le laboratoire BioperoxIL que j'ai eu la chance de travailler avec deux équipes de recherche, ce qui s'est avéré une expérience très enrichissante.

Monsieur le Professeur CHERKAOUI-MALKI Mustapha, directeur de thèse en France, pour la confiance qu'il m'a accordée tout au long de ces années. Je lui suis reconnaissante de m'avoir fait bénéficier tout au long de ce travail de sa grande compétence, de sa rigueur intellectuelle, de son dynamisme, et de son efficacité certaine que je n'oublierai jamais. C'est à ses côtés que j'ai compris ce que rigueur et précision voulaient dire. Je le remercie pour les conseils scientifiques. Je lui suis également reconnaissante de son appui scientifique, de ses conseils et de la patience qu'il m'a accordée tout au long de ce travail.

Monsieur le Docteur ANDREOLETTI Pierre, pour son co-encadrement, ses conseils, sa disponibilité, son respect, sa confiance, et son aide scientifique. Il a toujours été là pour me soutenir et me conseiller au cours de l'élaboration de cette thèse. Qu'il soit aussi remercié pour sa gentillesse, sa bonne humeur, et pour les nombreux encouragements qu'il m'a prodigués. C'est grâce à lui que j'ai pu concilier avec bonheur recherche théorique et appliquée pendant cette thèse.

Monsieur le Professeur JADOT Michel, Professeur à la Faculté de Médecine, et directeur de l'Unité de Recherche en Physiologie Moléculaire Laboratoire de Chimie Physiologique, NAMUR en Belgique, qui m'a très bien accueilli dans son laboratoire et m'a fait partager ses brillantes intuitions. Sa rigueur, sa capacité d'analyse des problèmes et ses très nombreuses connaissances m'ont permis de progresser et ont répondu à plusieurs de mes préoccupations.

Il m'est impossible d'oublier tous les membres du laboratoire de Biochimie, Neurosciences, ressources naturelles et environnement, toute l'équipe BioperoxIL Nathalie, Anne, Catherine, Marie-Thérèse, Hanane, Thomas, Stéphane pour leurs aides précieuses pour ma recherche et leurs gentillesse. Ils ont toujours fait tous leurs possibles pour m'aider, et ont répondu avec calme et patience aux questions quotidiennes dont je les accablais. Ainsi que l'équipe du Laboratoire URPHYM en Belgique, Florentine, Virginie, Isabelle, Asena, Mian, François pour leurs sympathies et leurs efficacités. Je remercie tous les thésardes, thésards et les étudiants de Settat, Dijon et Namur pour la bonne ambiance de travail mais également pour les nombreux bons moments passés ensemble, sans oublier aussi l'ensemble du personnel des Universités Hassan Ier, de Bourgogne et de Namur.

L'achèvement de ce travail mené sur plusieurs années est l'occasion de se remémorer les différentes embûches qu'il a fallu surmonter mais surtout les personnes qui m'ont permis d'en arriver là. Les rapports humains dont j'ai profité à leur côté ont fait naître de réels liens d'amitiés qui à mes yeux n'ont pas de prix. Qu'ils soient toutes et tous assurés de ma plus profonde gratitude et estime.

Table de matière

Liste des abréviations	15
I. Introduction.....	20
II. Rappels bibliographiques.....	22
1. Le cactus <i>Opuntia ficus indica</i>.....	22
1.1. Le cactus	22
1.3. Propriétés biologiques.....	34
1.4. Applications	36
1.5. L'huile de graine de cactus.....	37
2. Le peroxysome.....	57
2.1. Fonctions peroxysomales	58
2.2. Régulation des fonctions peroxysomales	59
3. Les maladies peroxysomales	95
3.1. Les conséquences de la déficience en β -oxydation peroxysomale	95
3.2. Les leucodystrophies	96
4. La microglie.....	98
5. Rôle de l'inflammation.....	101
5.1. Les médiateurs d'inflammation	102
6. Rôle du stress oxydant	108
III. Matériels et méthodes	110
1. Modèles expérimentaux.....	110
1.1. Modèle animal	110
1.2. Modèle Cellulaire	110
2. Conditions expérimentales	110
2.1. Entretien des souris.....	110
2.2. Culture cellulaire.....	110
3. Les conditions de Traitement.....	111
3.1. Traitement de souris	111
3.2. Traitement des cellules	112
4. Extraction d'ARN	113
4.1. Extraction d'ARN à partir des tissus	113
4.2. Extraction d'ARN à partir des cellules	114
5. Dosage d'ARNs par spectrophotométrie UV.....	115
6. Quantification des transcrits par RT-qPCR.....	115

6.1.	Obtention de l'ADNc	115
6.2.	Préparation des échantillons pour la qPCR	116
6.3.	Réaction de qPCR.....	117
7.	Préparation des homogénats	120
7.1.	Homogénats tissulaires	120
7.2.	Homogénats cellulaires	121
8.	Dosage des protéines	121
9.	Analyse de l'expression de protéines par Western Blotting.....	122
9.1.	Préparation des échantillons	122
9.2.	Séparation des protéines sur un gel d'électrophorèse dénaturant SDS-PAGE (électrophorèse en gel de polyacrylamide contenant du dodécylsulfate de sodium)	123
9.3.	Électro transfert des protéines et Immunodécoration	123
9.4.	Détection par chimioluminescence	125
10.	Mesure de cytotoxicité cellulaire	125
11.	Dosages enzymatiques.....	126
11.1.	Dosage de l'activité acyl-CoA oxydase 1 (ACOX1).....	126
11.2.	Dosage de la catalase : enzyme peroxysomale	129
11.3.	Dosage de la DPP3 alcaline (Dipeptidyl-peptidase 3) : enzyme cytosolique	130
11.4.	Dosage de cytochrome C oxydase : enzyme mitochondriale	130
11.5.	Dosage de la β -galactosidase : enzyme lysosomale	131
11.6.	Dosage de l' α -glucosidase alcaline : enzyme du réticulum endoplasmique	132
11.7.	Dosage de la Cathepsine C : enzyme lysosomale	132
11.8.	Dosage de la Cathepsine B : Enzyme lysosomale	133
11.9.	Dosage de la Procathepsine B	133
12.	Dosage de nitrite.....	134
13.	Méthode de fractionnement subcellulaire.....	134
13.1.	Fractionnement par centrifugation différentielle.....	135
13.2.	Fractionnement par centrifugation isopycniqye	137
14.	Phagocytose de bactéries	138
14.1.	Conditions de culture bactérienne de <i>STm</i> (<i>Salmonella Typhimurium</i>) sauvages et mutantes :	138
14.2.	Test de (UFC) Unité formant une colonie	139
14.3.	Immunofluorescence -marquage de noyaux des cellules BV2 au DAPI (4',6- diamidino-2-phenylindole) :	140
IV.	Résultats et Discussion.....	142
A.	Caractérisation du modèle cellulaire microglial	142

a.	Conséquences de l'absence des activités d'ACOX1 ou d'ABCD1 et ABCD2 sur les profils de distribution intracellulaire des organites des cellules BV-2	143
1.1.	Fractionnement subcellulaire par centrifugation différentielle.....	143
1.2.	Fractionnement dans un gradient de densité.....	157
b.	L'impact des déficiences peroxysomales sur l'expression des gènes d'inflammation des cellules BV2 microgliales	170
2.	Expression des gènes microgliales	170
c.	Conséquence des déficiences peroxysomales sur l'expression des hydrolases lysosomales.....	184
3.	Expression protéique	184
3.1.	Dans les lysats cellulaires.....	184
3.2.	Dans le milieu de culture	189
4.	Activité enzymatique.....	190
d.	Impact des déficiences peroxysomales sur la phagocytose des cellules BV2 microgliales.....	198
5.	Phagocytose	198
5.1.	Phagocytose des bactéries fluorescentes.....	198
5.2.	Phagocytose des bactéries-méthode CFU.....	202
B.	Les effets de l'huile de graine de cactus sur les fonctions peroxysomales et l'inflammation au niveau hépatique et cérébral.....	207
1.	Introduction	209
2.	Results	210
2.1.	Inflammatory Biomarkers	211
2.2.	Brain and Liver Gene Expression of Peroxisomal Protein-Encoding Genes.....	215
2.3.	Brain and Liver Expressions of Peroxisomal Proteins	216
2.3.1.	Catalase Protein Expression.....	217
2.3.2.	ACOX1 Protein Expression	217
2.4.	Brain and Liver Peroxisomal Enzymes Activities	218
3.	Discussion.....	220
4.	Conclusions	222
5.	Material and Methods	223
5.1.	Chemicals and Reagents	223
5.2.	Origin, Extraction, and Composition of Oils.....	223
5.3.	Mice Treatments.....	223
5.4.	Measurement of Enzymatic Activities	224
5.5.	Evaluation of Gene Expression by Quantitative RT-qPCR.....	224
5.6.	Immunoblotting	225

5.7. Statistics	226
References	226
C. Effets de molécules naturelles issues du cactus sur l'inflammation et sur les fonctions peroxysomales	233
1. Test de Cytotoxicité MTT.....	233
2. Dosage de NO	237
3. Effet sur l'expression des gènes	240
3.1. Gènes peroxysomaux	240
3.2. Gènes d'inflammation.....	254
3.3. Gènes redox	260
4. Effet sur l'expression des protéines.....	264
4.1. Protéines peroxysomales.....	264
4.2. Protéines lysosomales.....	268
4.3. Protéines d'inflammation	273
V. Conclusion et perspectives.....	287
VI. Bibliographie	301

Résumé

L'objectif de mes travaux de thèse était de mieux comprendre le rôle des cellules microgliales dans la neuroinflammation initiée dans plusieurs leucodystrophies peroxysomales neurovégétatives et d'explorer les effets protecteurs de substances issues du cactus *Opuntia ficus indica*. Pour ce faire, nous avons utilisé comme modèle *in vitro* des cellules microgliales déficientes en transporteurs ATP Binding Cassette D (ABCD1 et ABCD2) ou en acyl-CoA oxydase 1 (ACOX1). Il s'agit de deux lignées cellulaires murines BV-2, déficiente en *Abcd1/Abcd2*^{-/-} ou déficiente en *Acox1*^{-/-}, obtenues par ailleurs par édition génique grâce à la méthodologie CRISPR/Cas9. Nos résultats ont permis : (i) de caractériser, par analyse en centrifugation différentielle et ultracentrifugation isopycnique, l'impact de ces déficiences (*Acox1*^{-/-} ou *Abcd1/d2*^{-/-}) sur la taille et /ou la densité des peroxysomes et les autres organites cellulaires grâce aux activités des enzymes marqueurs. De plus, nous avons démontré une modification de la capacité phagocytaire de ces cellules microgliales mutantes ; (ii) d'explorer l'effet protecteur de l'huile de graines de cactus (CSO), *Opuntia ficus-indica*, *in vivo* chez les souris, traitées ou non par des lipopolysaccharides (LPS), montrant ainsi une activité anti-inflammatoire de la CSO en réduisant aussi bien au niveau cérébrale l'expression d'*iNos* qu'au niveau hépatique les expressions de l'*Il-1β* et l'*Il-6*. La CSO est capable également de rétablir les activités peroxysomales respectivement, antioxydante de la catalase et β-oxydative de l'ACOX1 affectées par le traitement aux LPS ; (iii) d'évaluer, dans les cellules sauvages et déficientes en *Acox1*, le potentiel protecteur de deux familles de substances issues de cactus (flavanols :isorhamnétine, isorhamnétine-rutinoside, quercétine ; et polyphénols : férulaldéhyde, syringaldéhyde, vanilline) contre l'inflammation et le stress oxydatif générés par l'absence de l'activité ACOX1 et/ou par les LPS. Ces substances issues de cactus sont capables de réduire l'expression des médiateurs pro-inflammatoires (TNFα, NLRP3, IL-1β) et la production de NO, d'augmenter l'expression des enzymes antioxydantes peroxysomales (Catalase et SOD1), et de restaurer les fonctions lysosomales impactées par le stress cellulaire induit par l'absence de l'activité ACOX1 ou par le traitement aux LPS.

Mots clés : ABCD1, ACOX1, antioxydant, β-oxydation, catalase, cellules microgliales BV-2, inflammation, *Opuntia ficus-indica*, peroxysome.

Abstract:

The objective of my thesis work was to better understand the role of microglial cells in neuroinflammation initiated in several neurovegetative peroxisomal leukodystrophies and to explore the protective effects of substances from the cactus *Opuntia ficus indica*. To this end, we used as an *in vitro* model microglial cells deficient in ATP Binding Cassette D transporters (ABCD 1 and ABCD 2) or acyl-CoA oxidase 1 (ACOX1). These are two BV-2 murine cell lines, deficient in *Abcd1/Abcd2*^{-/-} or deficient in *Acox1*^{-/-}, obtained elsewhere by gene editing using the CRISPR/Cas9 methodology. Our results made it possible to: (i) characterize, by differential centrifugation and isopycnic ultracentrifugation analysis, the impact of these deficiencies (*Acox1*^{-/-} or *Abcd1/d2*^{-/-}) on the size and/or the density of peroxisomes and other cellular organelles thanks to the activities of marker enzymes. We also revealed a change in the phagocytic capacity of these mutant microglial cells; (ii) to explore the protective effect of cactus seed oil (CSO), *Opuntia ficus-indica*, *in vivo in mice*, treated or not with lipopolysaccharides (LPS), thus showing anti-inflammatory activity of CSO by reducing both cerebral expression of *iNos* and at the hepatic level the expressions of *Il-1β* and *Il-6*. CSO was also able to restore peroxisomal activities, antioxidant of catalase and β-oxidative of ACOX1, respectively affected by LPS treatment; (iii) to evaluate, in wild and deficient in *Acox1* cells, the protective potential of two families of cactus substances (flavanols: isorhamnetin, isorhamnetin-rutinoside, quercetin; and polyphenols: ferulaldehyde, syringaldehyde, vanillin) against inflammation and oxidative stress generated by the absence of ACOX1 activity and/or LPS treatment. These cactus-derived substances can reduce the expression of pro-inflammatory mediators (TNFα, NLRP3, IL-1β) and the production of NO, increase the expression of peroxisomal antioxidant enzymes (Catalase and SOD1), and restore the lysosomal functions impacted by cellular stress induced by the absence of ACOX1 activity or by LPS treatment.

Keywords: ABCD1, ACOX1, antioxidant, β-oxidation, catalase, microglial BV-2 cells, inflammation, *Opuntia ficus-indica*, peroxisome.

Liste des abréviations

Traitement	
CO	Colza oil
CSO	Cactus seed's oil
HGC	Huile de graine de cactus
HMC	4-Hydroxy-3-methoxycinnamaldehyde
IR	Isorhamnetine
RU	Isorhamnetine 3-rutinoside
OFI	<i>Opuntia ficus-indica</i>
OO	Olive oil
QE	Quercétine
SA	Syringaldehyde
VA	Vanilline
Cellule	
ABCD1 ^{-/-}	Cellules déficientes en ABCD1
ABCD1/D2 ^{-/-}	Cellules double déficientes en ABCD1/D2
ABCD2 ^{-/-}	Cellules déficientes en ABCD2
ACOX1 ^{-/-}	Cellules déficientes en ACOX1
APC	Antigen-Presenting Cell
Breg	Regulatory B lymphocyte
DC	Dendritic Cell
ILC	Innate Lymphoid Cell
KO	Knockout
NK	Natural Killer
NPCs	Neural Progenitor Cells
RE	Reticulum Endoplasmique
RPE	Retinal Pigment Epithelium
SNC	Système nerveux central
STm	<i>Salmonella typhimurium</i>
MRSA	<i>Staphylococcus Aureus</i> Résistant à la Méricilline
TH2	Lymphocytes Th2
Treg	Lymphocyte Regulatory T
WT	Wild Type
Maladies	
ALD	AdrénoLeucoDystrophie
NALD	Neonatal Adrenoleukodystrophy
P-NALD	Pseudo Neonatal AdrenoLeukoDystrophy
x-ALD	X-linked AdrenoLeukoDystrophy
Molécules	
ARE	Antioxydant Responsive Element

15-LO	15-LipOxygenase
ABC	ATP-Binding Cassette
ABCA1 et ABCG1	ATP-Binding Cassette A1/G1
ABCD1	ATP-Binding Cassette, sub-family D member 1
ABCD3	ATP-Binding Cassette subfamily D member 3
ACOX1	Acyl-CoA OXidase1
ADN	Acide DésoxyiboNucléique
AG	Acide gras
Akt/PKB	Protéine kinase B
ALDP	AdréoLeucoDystrophy Protein
APC	Cellule Présentatrice d'Antigène
ARNm	Acide RiboNucléique messenger
ATP	Adénosine TriPhosphate
CASP1	CASPase1
c-Jun	Facteur de transcription Jun
CNTF	Facteur NeuroTrophique Ciliaire
COX-2	Cyclo-Oxygenase-2
CRP	Protéine C Réactive
CXC	Chemokines
DHA	Acide DocosaHexaénoïque
DPP III	DiPeptidyl-Peptidase 3
DPPH	2,2-DiPhényl 1-Picrylhydrazyle
dTTP	désoxyThymidine TriPhosphate
EGFR	Récepteur du Facteur de Croissance Epidermique
EHHADH	Enoyl-CoA Hydratase And 3-Hydroxyacyl CoA Dehydrogenase
eNOS	NOS endothéliale
ERK	Extracellular signal-Regulated kinases
FADH	Flavine Adénine Dinucléotide
GPx	Glutathion Peroxydase
GSH	Glutathion
H2O2	Peroxyde d'hydrogène
HDL	High-Density Lipoprotein
HO-1	Hème Oxygénase-1
HSD17B4	17 β -HydroxyStéroïde Déshydrogénase de type IV
ICAM-1	Intercellular Adhesion Molecule 1
IFN- γ	InterFéroN gamma
IgG, IgA, et IgM	ImmunoGlobuline G/A/M
IL-12	Interleukine-12
IL1RN	Interleukin 1 Receptor Antagonist
IL-1 β	InterLeukine-1beta

IL-2	InterLeukine-2
IL-6	InterLeukine-6
IL-8	InterLeukine-8
iNOS	Oxyde Nitrique Synthase Inductible
JAK2	JANus Kinase 2
JNK	c-Jun NH2-terminal Kinase
LAMP2	Lysosomal-Associated Membrane Protein 2
LCFA	Long Chain Fatty Acids
LDL	Low-Density Lipoprotein
LIF	Facteur Inhibiteur de la Leucémie
LPS	LipoPolySaccharide
LTB4R	Leukotriene B4 Receptor
LXR	nuclear Liver X Receptors
MAPK	Mitogen-activated protein kinase
MDA	MalonDiAldehyde
MHC	Complexes Majeurs d'Histocompatibilité
MYD88	Myeloid differentiation primary response 88
NADH	Nicotinamide Adénine Dinucléotide
NF- κ B	Nuclear Factor-kappa B
NLRP3	NOD-Like Receptor family, Pyrin domain containing 3
nNOS	NOS neuronale
NO	Nitric Oxide
Nrf2	Nuclear factor rythroid-2-Related Factor 2
OSM	OncoStatine M
ox-LDL	Oxidized Low-Density Lipoprotein
PARP	Poly(ADP-Ribose) Polymérase
PEX11 β	Peroxisomal membrane protein 11 β
PGC1 α	Peroxisome proliferator-activated receptor Gamma Coactivator 1-alpha
PGC1- β	Peroxisome proliferator-activated receptor Gamma Coactivator 1-béta
PI3K	Phosphoinositide 3-kinase
PKC	Protéine Kinase C
PP	Peroxisome Proliferation
PPAR α	Peroxisome Proliferator Activated Receptor alpha
PPAR β	Peroxisome Proliferator Activated Receptor bêta
PPAR γ	Peroxisome Proliferator Activated Receptor gamma
PXR	Pregnane X Receptor
RNS	Reactive Nitrogen Species
ROS	Reactive Oxygen Species
SOD	SuperOxide Dismutase

STAT1	Signal Transducer and Activator of Transcription 1
TAB1	TGF-Beta Activated Kinase 1 (MAP3K7) Binding Protein 1
TAK1	Transforming growth factor- β -Activated Kinase 1
TGF- β	Transforming Growth Factor beta
TLR	Toll-Like Receptor
TLR4	Toll Like Receptor 4
TNF- α	Tumor Necrosis Factor- α
TOLLIP	TOLL Interacting Protein
VLCFA	Very Long Chain Fatty Acid
VLDL	Very Low Density Lipoprotein
Techniques	
ABTS	Acide 2,2'-azino-Bis(3-éthylbenzoThiazoline-6- Sulphonique)
AMC	7-Amino-4-Methylcoumarin
BCA	BiCinchoninic acid Assay
BSA	Bovine Serum Albumin
CFU	Unité Formant une Colonie
CRISPR cas9	Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats, CRISPR associated protein 9
Ct	Cycle to Threshold
DAPI	4',6-DiAmidino-2-PhenylIndole
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DO	Densité optique
DPBS	Dulbecco's phosphate-buffered saline
DTNB	5,5'-DiThiobis (2-NitroBenzoic acid)
ECL	Enhanced ChemiLuminescence
GFP	Green Fluorescent Protein
HRP	HorseRadish Peroxidase
MTT	3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5 diphenyl tetrazolium bromide
PBS	Tampon phosphate salin
PCoA	Palmitoyl-CoA
PCR	Polymerase Chain Reaction
PVDF	Poly(Vinylidene Fluoride)
RIPA	RadioImmunoPrecipitation Assay
RTqPCR	Quantitative Reverse Transcription PCR
SDS-PAGE	Dodium Dodecyl Sulfate-PolyAcrylamide Gel Electrophoresis
TEMED	N, N, N', N'-tétraméthyléthylènediamine
UV. A/B/C	Ultra-violet

Chimie	
2-MeO	2-MéthylOxolane
APS	Ammonium PerSulfate
Ca	Calcium
CO ₂	Dioxyde de carbone
Cu	Cuivre
DMSO	DiMéthylSulfOxyde
DOC	2,5-DimethOxy-4-Chloroamphetamine
EDTA	EthyleneDiamineTetraAcetic acid
H ₂ SO ₄	Acide sulfurique
HCl	Acide chlorhydrique
HVA	HomoVanillic Acid
KH ₂ PO ₄	Potassium dihydrogen phosphate
Mg	Magnésium
MUG	MéthylUmbelliferyl β-Galactopyranoside
Na ₂ HPO ₄	Disodium hydrogen phosphate
NaCl	Chlorure de sodium
NaHCO ₃	Hydrogénocarbonate de sodium
NaOH	Hydroxyde de sodium
NO ₂	Dioxyde d'azote
NP40	Nonidet-P40
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate
TBA	Thiobarbituric Acid
TCA	Acide TriChloracétique
TiSO ₄	Titanyl Sulfate

I. Introduction

Le Maroc situé au Nord-Ouest d'Afrique, sur le littoral de l'Atlantique et de la Méditerranée est connu par ces régions à climat aride et semi-aride, et sa production massive des produits issus de plantes grasses. Ces dernières, comme le fruit de cactus, sont présentes de manière abondante dans le régime alimentaire de la plupart des familles marocaines, surtout en période d'été. La révélation de la science des propriétés thérapeutiques du cactus (cladodes, fleurs, graines, et mésocarpe charnu) (G. Das et al. 2021; Koubaa et al. 2017) a suscité un intérêt pharamineux de la part de différentes organisations cosmétiques, agroalimentaires, et pharmaceutiques de tous les coins du monde pour produire des remèdes issus d'aliment fonctionnel qui vont servir à la prévention ou le traitement des maladies humaines (Feugang et al. 2006; Bouhrim et al. 2020) par l'exploitation des données scientifiques. La consommation fulgurante qu'a connu ces types de médicaments ou existent aussi sous le nom de suppléments alimentaires, les a rendus aujourd'hui au sommet et parmi les forts investissements dans le monde, avec des rendements financiers colossaux. Les chercheurs aussi de leurs côtés ne cessent d'investiguer dans ce sens-là, tant qu'il est toujours un terrain fertile avec des apports scientifiques importants et productifs. Cette nature qui ne s'enlace de nous émerveiller par ces produits composés d'un cocktail d'éléments biochimiques naturels parfaitement bien dosés, nous a poussé aussi autant qu'équipe scientifique à puiser de ce puits et chercher l'effet protecteur des substances naturelles issues de cactus sur le stress oxydant et l'inflammation liés aux déficiences de la β -oxydation peroxysomale. Les espèces réactives d'oxygène contribuent à l'apparition ou la progression de la pathogenèse de certaines maladies neurodégénératives comme les leucodystrophies NALD et x-ALD au niveau de l'organisme. L'huile de graine de cactus a été récemment considérée parmi les aliments à fort potentiel anti oxydant. L'objectif de cette étude est d'évaluer l'effet protecteur de l'huile de graines de cactus et des composés issus de cactus contre le stress oxydatif (H_2O_2 , VLCFA) et l'inflammation induisant ainsi l'altération de l'ADN et des dysfonctionnements cellulaires. Notre étude est composée de 3 grands volets : le premier consiste à établir une caractérisation des modèles cellulaires BV2 microgliales générées par la technique de biologie moléculaire CRISPR cas9 (Raas, Saih, et al. 2019; Raas, Gondcaille, et al. 2019), alors que le deuxième concerne l'évaluation *in vivo* des effets protecteurs des huiles naturelles de graines de cactus sur le tissu hépatique et cérébral de souris, et le dernier volet s'intéresse à l'effet des molécules pures issues de cactus sur l'inflammation et sur les fonctions peroxysomales *in vitro*. Le travail de recherche était

réalisable et concevable grâce aux différentes techniques biochimiques (Dosage d'activité enzymatiques, test de cytotoxicité), physicochimique (Fractionnement cellulaire différentielle et isopycniqne) et de biologie moléculaires (Western Blot et RTqPCR) ainsi que des tests biologiques *ex-vivo* (test de phagocytose des bactéries). L'ensemble des résultats du premier volet ont montré des différences d'expressions géniques ARNm et protéiques entre les différentes lignées cellulaires, sans ou infime changement de taille ou de densité des organites subcellulaires et des différences majeurs au niveau de la fonction phagocytaire des cellules microgliales. Le traitement des souris avec des huiles naturelles montre un effet considérable sur l'expression génique de quelques gènes d'inflammation sans effet significatif sur la fonction peroxysomale surtout au niveau de cerveau. Alors que pour le traitement avec les molécules pures, l'analyse des résultats révèlent un effet anti-inflammatoire significatif sur l'expression génique des gènes d'inflammation et de β -oxydation peroxysomale.

L'exploration permanente des propriétés thérapeutiques et esthétiques du cactus encouragera les agriculteurs à augmenter la superficie de la culture des plantes grasses et puis lutter contre l'érosion et contrebalancer la récente énorme perte des forêts qu'a connue le monde suite aux incendies liées aux réchauffement climatique, ainsi qu'augmenter le taux de CO₂ atmosphérique bénéfique à la préservation de l'écosystème (Le Houerou 1996). Le Maroc, qui a connu des années de sécheresses successives, gagnerait à développer la culture de cette plante et à intensifier la vulgarisation de son usage en tant que source de fourrage et même son industrialisation.

II. Rappels bibliographiques

1. Le cactus *Opuntia ficus indica*

1.1. Le cactus

Opuntia ficus-indica (L.) Mill.^{1*} (*Ofi*), *Opuntia ficus-indica* var. *saboten* MAKINO, Cactus Tuna ou cactus nopal, appartient au angiospermes dicotylédones de la famille des cactacées constituée d'environ 1500 espèces (Feugang et al. 2006). Il est connu communément sous le nom de figue de barbarie et appartient à la sous-famille des *Opuntioideae*. La plante *Ofi* est présente le plus souvent en Afrique, Mexique, Amérique latine, Australie, Asie et les zones riveraines de la méditerranée (Butterweck et al. 2011; Piga 2004; Candelario Mondragón-Jacobo 2002). Au Maroc, ce cactus est retrouvé dans les régions à climat aride et semi-aride. L'étymologie du mot *Opuntia*, vient du latin *Opuntis* (nom propre) =Oponte, capitale de la Locride en Grèce, en référence à cette région où poussaient différentes espèces de cactus² alors que *Ficus-Indica*, est un nom composé, créé par les botanistes qui signifie le figuier d'inde. Les figues de barbarie sont largement utilisées en nutrition sous forme de jus, confiture ou thé, en cosmétique, et aussi pour des raisons thérapeutiques comme médicament traditionnel pour soigner les œdèmes, les brûlures, les plaies, l'asthme bronchique, les problèmes digestifs et le diabète (Yoo et al. 2018) due aux molécules bioactives contenues dans le fruit et les cladodes avec des activités biologiques a effet anti-lésions gastriques, antitumoraux, anti-inflammatoires, anti-allergiques (Alimi et al. 2010; S. H. Kim et al. 2012; Lim 2010; Zou et al. 2005; Budinsky et al. 2001; Park et al. 2001; Summers et al. 2010), hypoglycémiques, antimicrobiens et leurs propriétés anxiolytiques (Alimi et al. 2010; Akkol et al. 2020).

¹ (L pour Carl von Linné/ système moderne de nomenclature binominale) et (Mill. Pour Philip Miller un botaniste) (*OFI*)

² (« [Http://www.tilo-botanica.eu/espece-n-q/opuntia-ficus-indica.html](http://www.tilo-botanica.eu/espece-n-q/opuntia-ficus-indica.html) »)



Figure 1: Image de la plante O. ficus Indica. La plante de cactus est composée de 3 structures principales fleur, cladode et fruit indiquées dans la figure par des flèches

Au Maroc, il y a une diversité des espèces d'*Opuntia*, les plus répandues dans le Royaume est *O. ficus indica* (**Figure 2**). La nature des sols, et le métabolisme de type crassulacéen de la figue de Barbarie permet son développement dans des zones où les précipitations ne dépassent pas 200 à 300 mm/an. Les sols préférés par le cactus sont les sols légers, sablonneux-limoneux et caillouteux ayant un pH moyennement acide (5,1 - 6,7), pour plusieurs espèces d'*Opuntia* le pH du sol est un facteur limitant, mais l'espèce *Opuntia ficus-indica* est rencontrée même sur des sols calcaires. Le cactus peut aussi résister à des sols de natures acide et saline avec moins de (50-70mM du NaCl) 50-70 moles de sel par m³ (Inglese et al. 1995) et au sol gypseux et légèrement salin à condition qu'ils soient drainés (Loudy, 1997). La teneur en argile doit être inférieure à 20% pour éviter l'altération des racines et le développement de la canopée. Il s'agit des sols généralement pauvres en matière organique (0,1-1,8%). Une profondeur de 60 à 70 cm du sol assure le développement du système racinaire superficiel. Les sols mal drainés, une nappe phréatique élevée, ou une couche imperméable superficielle ou carapace ne devraient pas être utilisés pour la plantation. Afin d'avoir une production de fruit de bonne qualité, il est préférable que le sol contienne des taux élevés en potassium et en calcium (Coetzer et al. 2008; Inglese et al. 1995). Le cactus s'adapte difficilement aux sols hydromorphes et asphyxiants.

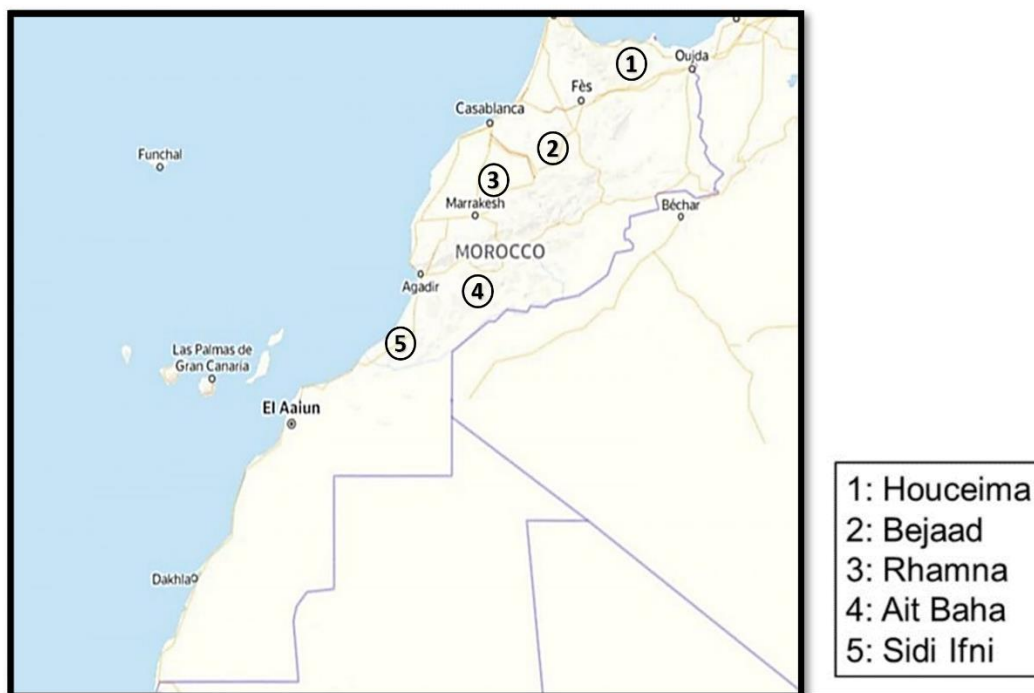


Figure 2: Les sites de production de cactus au Maroc, d'après(Nounah et al. 2020). Au Maroc, cinq régions sont connues par la culture du Cactus. Dans la figure les cinq régions sont indiquées sur la carte par les numéros de 1 à 5 et à droite chaque numéro correspond à un nom d'une région du Maroc.

1.2. Composition chimique de différentes parties de la plante

La composition chimique des figues de barbarie dépend de différents facteurs : l'espèce, le cultivar (variété de plante cultivée, obtenue par sélection), la variété, les facteurs environnementaux climatiques et édaphiques, ainsi que la gestion de la culture qui comprend les traitements de fertilisation et de post-récolte et le niveau de maturité de la plante à la cueillette (Barbera et al. 1995; Méndez et al. 2015). La description de la composition chimique a montré un ensemble de composés à valeur nutritionnelle, riche en vitamines, minéraux, fibres alimentaires, acides aminés et acides gras en plus des composés bioactifs tels que les phytostérols, les flavonoïdes et les polyphénols qui aident l'organisme à se défendre face aux différents stress biologiques et à renforcer le bouclier immunitaire. La composition phytochimique varie d'une structure de Cactus (peau, pulpe, graines et cladodes) à une autre. *O. Ficus Indica* a une composition nutritionnelle riche en protéines, eau et matières grasses comparant à d'autres espèces de cactacées (Medina et al. 2007; Ayadi et al. 2009; Chiteva et Wairagu 2013)

1.2.1. Fibres alimentaires, minéraux et vitamines

Les raquettes ou cladodes contiennent principalement de l'eau, glucides, fibres alimentaires et protéines (**Tableau 1**) (Ayadi et al. 2009; Méndez et al. 2015; Hernández-Urbiola et al. 2010). OFI est riche en vitamines (**Tableau 2**). A l'exemple de la pulpe qui contient de l'acide ascorbique (Galati et al. 2003; Stintzing et al. 2005). Alors que la peau du fruit de cactus contient majoritairement comme dérivés de la vitamine E, l' α -tocophérol (M. F. Ramadan et Mörsel 2003) et le γ -tocophérol est plutôt présent dans l'huile de graine de cactus que dans l'huile essentielle issue de la pulpe (M. F. Ramadan et Mörsel 2003a). Considéré aussi comme une source de minéraux, *O. Ficus Indica* contient effectivement du potassium, du magnésium, du calcium et du sodium (Chiteva et Wairagu 2013; Medina et al. 2007; El-Beltagi 2019; El-Said et al. 2010; Albuquerque et al. 2016; Ghazi et al. 2015) (**Tableau 3**).

Tableau 1: Composition chimique en fibres alimentaires, sucres et protéines dans les différentes parties d'O. ficus indica (Silva et al. 2021)

Composé	Unité	Les différentes structures d' <i>O. ficus-indica</i>			
		Pulpe	Graines	Peau	Cladode
Fibre brute (carbohydrates insolubles)	g/100 g	1,37 ± 0,06	12,47 ± 2,30	0,96 ± 0,06	
	g/100 g de matière sèche	4,28 ± 1,13			5,97 ± 0,84
Fibres alimentaires solubles	g/100 g des carbohydrates totales				12,98 ± 0,32
Fibres alimentaires insolubles	g/100 g des carbohydrates totales				34,58 ± 0,99
Sucres	g/100 g	11,22 ± 1,47			
	mg dextrose/g				37,93 ± 18,56
Sucres réduits	g/100 g	10,55 ± 0,69			2,87 ± 0,11

Carbohydrates	g/100 g	92,57 ± 0,99			5,63 ± 0,11
	g/100 g de matière sèche				57,87 ± 19,39
Amidon	g/100 g de matière sèche	4,55 ± 0,24	5,35 ± 1,14	7,12 ± 0,60	0,71 ± 0,10
	g/100 g	0,08 ± 0,00	3,67 ± 0,01	0,14 ± 0,01	0,82 ± 0,05
Protéines	g/100 g de matière sèche	5,13 ± 0,29	11,80 ± 1,17	8,30 ± 0,90	

Tableau 2: Contenu en vitamines dans les différentes parties d'O. ficus indica

Vitamines	Unité	Différentes parties d'O. ficus indica				Références
		Pulpe	Huile de pulpe	Huile de graines	Peau	
Vitamine C	mg acide ascorbique	54,64 ± 10,54			109,69 ± 19,90	(Cano et al. 2017)
	eq/100 g					
Acide ascorbique	mg/100 g	21,20 ± 0,573			59,82 ± 0,64	1,83 ± 0,33 (Valente et al. 2011; Méndez et al. 2015)
Vitamine E totale	mg/100 g des lipides totaux				2180 ± 198	(Tesoriere et al. 2004; M. F. Ramadan et Mörsel 2003a; 2003b)
	µg/100 g	115 ± 10				
	mg/100 g		527,40 ± 36,00	40,30 ± 4,00		
α-Tocophérol	mg/100 g des lipides totaux				1760 ± 155	(Tesoriere et al. 2004; M. F. Ramadan et Mörsel 2003a; 2003b)
	µg/100 g	69 ± 5,90				
	mg/100 g		84,9 ± 9	5,60 ± 0,30		
β-Tocophérol	mg/100 g des lipides totaux				222 ± 45	(M. F. Ramadan et Mörsel 2003a; 2003b)
	mg/100 g		12,60 ± 1,00	1,20 ± 0,20		
δ-Tocophérol	mg/100 g des lipides totaux				26 ± 12	(Tesoriere et al. 2004; M. F. Ramadan

	$\mu\text{g}/100\text{ g}$	16 ± 1			et Mörsel
	$\text{mg}/100\text{ g}$		422 ± 17	$0,50 \pm 0,10$	2003a; 2003b)
γ-Tocophérol	$\text{mg}/100\text{ g}$				174 ± 31
	des lipides totaux				(Tesoriere et al. 2004; M. F. Ramadan et Mörsel
	$\mu\text{g}/100\text{ g}$	30 ± 3			2003a; 2003b)
	$\text{mg}/100\text{ g}$		$7,90 \pm 0,60$	33 ± 3	
Vitamine K	$\text{mg}/100\text{ g}$				109 ± 32
	des lipides totaux				(M. F. Ramadan et Mörsel
	$\text{mg}/100\text{ g}$		$53,20 \pm 8,00$	525 ± 60	2003a; 2003b)

Tableau 3: La composition en minéraux dans la plante d'*O. ficus indica* (L.) Mill.

Minéraux	Unité	Différentes parties d' <i>O. ficus indica</i>				Références
		Pulpe	Graines	Peau	Cladodes	
Magnésium	$\text{mg}/100\text{ g}$	1,05	8,07	1,47	$94,10 \pm 28,3$	(Salim et al. 2010 ; Méndez et al. 2015)
Sodium	$\text{mg}/100\text{ g}$	0,06	0,44	0,11	$1,71 \pm 0,99$	(Salim et al. 2010 ; Méndez et al. 2015)
	$\text{mg}/100\text{ mL}$ de jus	$4,65 \pm 0,56$		$5,61 \pm 0,12$		(Abdel-Hameed et al. 2014)
Potassium	$\text{mg}/100\text{ g}$	11,14	64,41	9,48	224 ± 74	(Salim et al. 2010 ; Méndez et al. 2015)
	$\text{mg}/100\text{ mL}$ de jus	$21,55 \pm 0,94$		$20,26 \pm 1,89$		(Abdel-Hameed et al. 2014)
Calcium	$\text{mg}/100\text{ g}$	0,69	17,37	1,52	177 ± 31	(Salim et al. 2010 ; Méndez et al. 2015)
Manganèse	$\text{mg}/100\text{ g}$	$0,30 \pm 0,16$	$0,19 \pm 0,03$	0,13	$0,78 \pm 0,24$	(Medina et al. 2007; Özcan et al. 2011; El-Beltagi 2019; Méndez et al. 2015)
Fer	$\text{mg}/100\text{ g}$	$0,20 \pm 0,06$	$1,17 \pm 0,17$	0,47	$0,13 \pm 0,05$	(Medina et al. 2007; Özcan et al. 2011; El-Beltagi 2019; Méndez et al. 2015)
	$\text{mg}/100\text{ mL}$ de jus	$0,22 \pm 0,01$		$0,15 \pm 0,10$		(Abdel-Hameed et al. 2014)
Zinc	$\text{mg}/100\text{ g}$	$0,21 \pm 0,05$	$0,32 \pm 0,03$	0,13	$0,37 \pm 0,21$	(Medina et al. 2007; Özcan et al. 2011;

						El-Beltagi 2019; Méndez et al. 2015)
Cuivre	mg/100 g	0,04 ± 0,01	0,21 ± 0,07	0,19	0,06 ± 0,03	(Medina et al. 2007; Özcan et al. 2011; El-Beltagi 2019; Méndez et al. 2015)
	mg/100 mL de jus	0,22 ± 0,02		0,21 ± 0,02		(Abdel-Hameed et al. 2014)
Phosphore	mg/100 g	0,26	162,75 ± 2,73	0,53	0,09 ± 0,00	(El-Beltagi 2019; Özcan et Al Juhaimi 2011; Astello-García et al. 2015)
Molybdène	mg/100 g				16,38 ± 6,49	(Méndez et al. 2015)
Chrome	mg/100 g	0,01 ± 0,00			0,03 ± 0,01	(Méndez et al. 2015; Medina et al. 2007)
Nickel	mg/100 g	0,03 ± 0,01				(Medina et al. 2007)

1.2.2. Acides gras

Les acides gras constituent aussi une partie majoritaire de la plante surtout au niveau de la pulpe, l'huile de graine et l'huile de la peau de cactus. Dans la peau on trouve de l'acide palmitique (C16:0) et acide linoléique (C18:2) (M. F. Ramadan et Mörsel 2003b; El-Said et al. 2010; Andreu Coll et al. 2019) . Pour les cladodes, il existe de l'acide palmitique (C16:0), acide oléique (C18:1), linoléique (C18:2) et linoléique (C18:3) (Abidi et al. 2009). Alors que les graines de cactus sont les plus valorisées par rapport à la qualité et le potentiel bioactif de ses huiles essentielles comestibles et leurs effets bénéfiques sur la santé, ils contiennent comme acides gras, les acides : linoléique (C18:2), oléique (C18:1), palmitique (C16:0), et stéarique (C18:0) (Özcan et Al Juhaimi 2011; Ghazi et al. 2015; Chougui et al. 2013; Matthäus et Özcan 2011; M. F. Ramadan et Mörsel 2003b). Plusieurs études ont indiqué que le cactus, et plus particulièrement les fruits, la pulpe, les graines et l'écorce, étaient riches en acides linoléique, oléique et palmitique (Ennouri et al. 2005; M. Ramadan et Mörsel 2003). L'acide linoléique (oméga-3) est connu pour être bénéfique pour la santé, et protège contre les maladies cardiovasculaires, les affections inflammatoires, les troubles auto-immunes et le diabète (Shahidi et Ambigaipalan 2018) (**Tableau 4**).

Tableau 4: Contenu en acides gras dans la plante O. ficus indica

Acides gras	Différentes parties de cactus <i>O. ficus indica</i>				
-------------	------------------------------------------------------	--	--	--	--

	Pulpe	Huile de graines	Peau	Cladode
Laurique	1,55		0,71 ± 0,15	0,91
Myristique	1,52		1,95 ± 0,25	1,88
Palmitique	22,9	20,1 ± 2,26	23,1 ± 1,98	39,0
Stéarique	5,20	2,72 ± 0,13	2,67 ± 0,21	5,57
Arachidonique				
Palmitoléique		1,80 ± 0,11	2,48 ± 0,22	2,00
Oléique	26,8	18,3 ± 1,58	21,1 ± 2,15	18,0
Linoléique	29,2	53,5 ± 4,89	32,3 ± 2,14	20,4
Linoléinique	12,2	2,58 ± 0,16	0,69 ± 0,06	10,9
γ-Linolénique			8,60 ± 1,04	
Béhénique			0,50 ± 0,05	
Lignocérique			0,41 ± 0,04	
Cis-13,16-Docosadiénoïque			0,93 ± 0,08	
Cérotique			0,35 ± 0,04	
Nervonique			1,21 ± 0,26	
Unités	g/100 g des acides gras totaux	g/100 g d'huile	g/100 g de lipides totaux	g/100 g des acides gras totaux
Références	(Andreu Coll et al. 2019)	(M. F. Ramadan et Mörsel 2003a)	(M. F. Ramadan et Mörsel 2003b)	(Andreu Coll et al. 2019)

1.2.3. Acides aminés

Les acides aminés les plus présents dans la pulpe sont la sérine et la proline et l'acide γ-aminobutyrique, la taurine (Stintzing et al. 1999). Alors que dans les graines on trouve plus de l'arginine et de l'acide glutamique (Sawaya et al. 1983; Stintzing et al. 1999) (**Tableau 5**).

Tableau 5: Contenu en acide aminés dans la plante O. ficus indica

Acides aminés	Différentes parties d'O, ficus indica				
		Pulpe		Graines	Cladode
Taurine	Non détecté	9,36 ± 2,04	323,60 ± 572,10		
Aspartate	844,24 ± 256,48			8,60	0,61 ± 0,06
Thréonine	120,71 ± 48,48		13,10 ± 1,80	3,96	1,38 ± 0,15
Sérine	967,94 ± 453,75		175,50 ± 43,46	4,14	0,48 ± 0,11
Asparagine	253,21 ± 102,22		41,60 ± 5,67		

Glutamate	154,25 ± 114,51	66,10 ± 21,06	20,27	1,78 ± 0,32	
Glutamine	1583,19 ± 922,78	346,17 ± 205,84			
Proline	6461,79 ± 2476,41	1265,20 ± 455,02	5,66	0,45 ± 0,12	
Glycine	174,78 ± 98,60	11,33 ± 4,23	7,67	0,36 ± 0,07	
Alanine	353,86 ± 156,29	87,23 ± 8,16	4,58	0,46 ± 0,05	
Citrulline	79,14 ± 71,47	16,27 ± 11,54			
Valine	254,38 ± 107,03	39,37 ± 9,28	5,69	0,58 ± 0,09	
Cystéine	10,63 ± 8,17		3,10		
Méthionine	189,69 ± 83,08	55,23 ± 22,22	2,61	0,15 ± 0,03	
Isoleucine	241,39 ± 128,77	31,17 ± 8,63	3,66	0,67 ± 0,05	
Leucine	218,72 ± 97,02	20,60 ± 0,99	6,90	0,76 ± 0,12	
Tyrosine	208,35 ± 124,69	12,30 ± 2,43	3,56	0,21 ± 0,09	
Phénylalanine	337,75 ± 145,43	23,33 ± 1,16	4,46	1,37 ± 0,28	
βAlanine	42,25 ± 21,12				
Acide γ- Aminobutyrique	2272,69 ± 1181,82				
Histidine	505,48 ± 203,07	45,20 ± 11,29	2,46	0,15 ± 0,03	
Tryptophane	117,36 ± 46,55	12,63 ± 4,33	0,90	0,16 ± 0,02	
Ornithine	8,37 ± 4,66				
Lysine	205,46 ± 103,14	17,40 ± 1,27	3,39	0,53 ± 0,08	
2- Aminoethanolamine	117,31 ± 42,09				
Arginine	375,87 ± 272,37	30,50 ± 8,29	14,62	0,16 ± 0,02	
Carnosine		5,90 ± 1,71			
Références	(Ali et al. 2014)	(Tesoriere et al. 2004)	(Stintzing et al. 1999)	(Sawaya et al. 1983)	(Hernández- Urbiola et al. 2010)
Unités	μmol/L	mg/100 g	mg/L	g acides aminé/100 g protéines	g/100 g protéines

1.2.4. Stérols

Les stérols sont des constituants essentiels des membranes cellulaires animales et végétales. Ils ont un effet hypocholesterolémique, permettant la diminution du taux de cholestérol circulant. Les stérols majoritairement présents dans l'huile de la pulpe et les graines de cactus sont le β-sitostérol, suivi du Campestérol. Alors que le Δ7-Avenasterol n'est présent

que dans l'huile de graines de cactus et en petites quantités (M. F. Ramadan et Mörsel 2003a) alors que l'ergostérol est trouvé seulement dans l'épicarpe de la figue (M. F. Ramadan et Mörsel 2003b).

Tableau 6: Le contenu en stérols dans la plante d'Opuntia ficus indica

Stérols	Unité	Parties d' <i>O. ficus indica</i>			Références
		Pulpe	Graines	Peau	
Campestérol	g/Kg	8,74	1,66	8,76	(M. F. Ramadan et Mörsel 2003b; M. Ramadan et Mörsel 2003)
Stigmastérol		0,73	0,30	2,12	
Lanistérol		0,76	0,28	1,66	
β -Sitostérol		11,2	6,75	21,1	
Δ 5-Avenasterol,		1,43	0,29	2,71	
Δ 7-Avenasterol					
Δ 7-Avenasterol			0,05		
Ergostérol				0,68	

1.2.5. Caroténoïdes

En matière de caroténoïde, ces composés sont connus par leurs pouvoirs de prévention et de lutte contre le développement de quelques maladies cardiovasculaires, cancer et la dégénérescence maculaire (Rodriguez et al. 2006). Dans les cladodes, il existe trois types de caroténoïdes : lutéine, β -carotène, β -cryptoxanthine (Jaramillo-Flores et al. 2003). De plus, d'autres caroténoïdes sont trouvés dans les autres structures de la plante comme la violaxanthine, Lycopène et zéaxanthine (Silva et al. 2021). Jaramillo-Flores et al. (Jaramillo-Flores et al. 2003) ont trouvé que les cladodes d'*Opuntia ficus indica* contiennent 36% de β -carotène, 46% de lutéine et 18% de β -cryptoxanthine. Alors que dans la peau, Cano et al. a (Cano et al. 2017) rapporté que les caroténoïdes majoritaires sont la lutéine avec 1132,51 et 767,98 μ g/100 g suivie par β -carotène 200,40 et 173,50 μ g/100 g, puis la violaxanthine avec 87,67 et 93,64 μ g /100 g, pour les deux variétés du fruit *Opuntia*, *Sanguinos* et *Verdal* respectivement. La lycopène a été aussi détectée dans la peau d'*Opuntia* avec une quantité de 45,61 μ g /100 g. La quantité des caroténoïdes dans la pulpe a été également évaluée par Cano et al. (Cano et al. 2017). Ils ont trouvé que la pulpe du fruit *Opuntia* renferme (203,90 et 201,45 μ g /100 g) de lutéine, (79,10 et 37,47 μ g /100 g) de β -carotène, (31,95 et 5,76 μ g /100 g) de violaxanthine et (12,27 et 14,32 μ g /100 g) de zéaxanthine.

1.2.6. Phénols

Le groupement phénolique est retrouvé dans la structure de différents composés, en particulier dans l'acide phénolique (les acides hydroxy cinnamique et hydroxy benzoïque), les flavonoïdes, les lignines et les stilbènes. Les polyphénols sont reconnus pour leur pouvoir antioxydant et dans la prévention d'inflammation, les dérégulations cardiovasculaires, et les maladies neurodégénératives (El-Mostafa et al. 2014; Jakobek 2015). De nombreux composés phénoliques ont été identifiés dans la peau et la pulpe d'*O. ficus Indica* comme l'acide gallique, la catéchine, la quercétine-3-glucose-(1-6)-acide gallique (Abdel-Hameed et al. 2014). De plus, l'acide coumarique, acide 3,4-dihydroxy-benzoïque, l'acide 4-hydroxybenzoïque, l'acide férulique, et l'acide salicylique sont également présents dans les cladodes (Guevara-Figueroa et al. 2010). Les flavonoïdes jouent un rôle important comme composés bioactifs, leur consommation régulière réduit le risque de maladies chroniques et présentent un pouvoir antioxydant, antiviral et antibactérien (Kozłowska et Szostak-Wegierek 2014). D'autres composés ont été identifiés dans la pulpe comme le kaempférol, la quercétine, et l'isorhamnetine (M. Ramadan et Mörsel 2003). Ainsi que l'iso-quercitrine, l'isorhamnetine-3-O-glucoside, la nicotiflorine, la rutine et la narcissine qui sont présents dans les cladodes de différentes variétés d'*Opuntia spp.* (Guevara-Figueroa et al. 2010). **(Tableau 7)**

Ces composés sont généralement des sous-produits du métabolisme de la plante. L'intérêt progressif porté envers ces polyphénols est due à leur potentiel antioxydant, qui est impliqué dans la prévention de l'inflammation (Laughton et al. 1991), la dérégulation cardiovasculaire et les maladies neurodégénératives, et leur activité anticancéreuse (El-Mostafa et al. 2014). Les graines de fruits de cactus contiennent des quantités élevées de composés phénoliques allant de 48 à 89 mg/100g de graines de cactus, et sont notamment les dérivés de féruloyl, tannins et sinapoyldiglycoside (Chougui et al. 2013).

Tableau 7: Contenu en phénols et flavonoïdes de la plante d'*O. ficus indica* : Revue de (El-Mostafa et al. 2014)

Les différentes structures de la plante <i>O. ficus indica</i>	Composé phénolique	mg/100g
Pulpe	Acide phénolique total	218,8
	Quercétine	9
	Isorhamnetine	4,94
	Kaempferol	0,78, 2,7

	Lutéoléine	0,84
	Isorhamnetine glycosides	50,6
Graines	Acide phénolique total	48–89
	Féruloyl-sucrose isomère 1	7,36–17,62
	Féruloyl-sucrose isomère 2	2,9–17,1
	Sinapoyldiglucoside	12,6–23,4
	Flavonoïde Total	1,5–2,6
	Total Tannins	4,1–6,6
	Peau	Acide phénolique total
Flavonoïde Total		6,95
Kaempferol		0,22
Quercétine		4,32
Isorhamnetine		2,41–91
Cladodes	Acide gallique	0,64–2,37
	Coumarique	14,08–16,18
	3,4-dihydroxybenzoïque	0,06–5,02
	4-hydroxybenzoïque	0,5–4,72
	Acide férulique	0,56–34,77
	Acide salicylique	0,58–3,54
	Iso quercétine	2,29–39,67
	Isorhamnetin-3- <i>O</i> -glucoside	4,59–32,21
	Nicotiflorine	2,89–146,5
	Rutine	2,36–26,17
Narcissine	14,69–137,1	

1.2.7. Pigments

Les bétalaïnes, sont des pigments végétaux vacuolaires composés d'un noyau azoté, (appelé aussi acide bétalamique) (M. I. Khan 2016) existent sous deux formes : betacyanines (rouge–violet) et beta xanthines (jaune), leurs concentrations varient en fonction de la couleur du fruit. Ces composés sont présents fortement dans la peau de cactus sous forme de beta-xanthines (indicaxanthine), et betacyanines (bétanine) (Cano et al. 2017). Ils ont un pouvoir antioxydant efficace dans des modèles biologiques (Cano et al. 2017; Kanner et al. 2001; Slimen et al. 2016). Par rapport à la pulpe, la peau contient des quantités plus importantes de beta xanthines ($1,73 \pm 0,04$ et $2,00 \pm 0,15$ mg de indicaxanthine/100 g) et des betacyanines ($1,17 \pm 0,04$ et $2,52 \pm 0,10$ mg bétanine /100 g) (Cano et al. 2017).

1.3. Propriétés biologiques

1.3.1. Propriétés antioxydantes

La propriété antioxydante attribuée au fruit du figue de barbarie est due à la présence de différents composés, comme la vitamine C, caroténoïdes, polyphénols et flavonoïdes comme la quercétine, kaempferol et isorhamnetine (Kuti 2004; Farag et al. 2020). La distribution hétérogène de ces composés dans les différentes structures de cactus, n'empêche pas de trouver des similarités dans la composition phytochimique. Les cladodes sont une source majeur des composés antioxydants naturels (Boutakiout et al. 2018). Les extraits de cladode et de la pulpe de fruit d'*O. ficus-indica* permettent l'activation des enzymes antioxydantes comme la superoxyde dismutase (SOD), catalase, et glutathion peroxydase (GPx) (Ben Saad et al. 2017). Cet effet antioxydant est associé à la capacité des extraits à réduire le taux de la peroxydation lipidique mesurée par le taux de malondialdéhyde (MDA), et de renforcer le statut antioxydant (Tesoriere et al. 2004) au niveau des membranes cellulaires par l'élimination des radicaux libres (Ben Saad et al. 2017). Non seulement. Les extraits de cactus sont en plus capables de réactiver le mécanisme d'érythropoïèse et augmenter la production d'érythropoïétine. Les extraits éthanolique de cladodes de cactus aident à moduler le dysfonctionnement rénale via les propriétés antioxydantes, anti-génotoxiques et anti-apoptotiques (D. Brahmi et al. 2012), et peuvent inhiber l'activation du stress du réticulum endoplasmiques ou de protéger directement les doubles brins d'ADN des métabolites électrophiles issus des mutagènes (D. Brahmi et al. 2012; Tesoriere et al. 2004; López-Romero et al. 2014). Les graines et la peau contiennent la quercétine, mais sont peu ou pas étudiées jusqu'à présent pour son effet sur le stress oxydatif et l'inflammation (Silva et al. 2021).

1.3.2. Propriétés antimicrobiennes

La découverte et l'utilisation des agents antimicrobiens provenant des plantes pourrait être de très bon alternatifs aidant à contrôler et maîtriser la résistance bactérienne de certaines souches pathogènes, considérée comme une menace au niveau de la santé publique. Des études ont montré que l'huile de graine de cactus, et extrait de cladodes et de peau d'*O. ficus-indica* (Ramírez-Moreno et al. 2017; Maboŧja et al. 2021) ont un haut potentiel antimicrobien contre les bactéries Gram-positif et Gram-négatif : *Candida albicans*, *Escherichia coli* (O58 : H21), *Escherichia coli* (O157 : H7), *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Pseudomonas*

aeruginosa, *Saccharomyces cerevisiae*, *Salmonella typhimurium* (S456), *Bacillus subtilis* (B2836) et *Streptococcus pneumoniae* (ATCC63). L'activité antimicrobienne des extraits de la peau de cactus était comparable aux antibiotiques tétracycline et vancomycine (Silva et al. 2021).

1.3.3. Propriétés antiinflammatoires et antiprolifératives

L'Inflammation est un processus assez complexe fortement impliqué dans différents événements cellulaires pour garder l'homéostasie. Peu de travaux ont abordé les effets anti-inflammatoires de différents composants de la figue de barbarie. Les effets de la bétanine et indicaxanthine étaient étudiés sur des modèles *in vitro* (Gentile et al. 2004) pour évaluer l'effet des réactions inflammatoire sur l'expression des molécules d'adhésion endothéliales. Ces deux molécules exercent une légère inhibition sur l'expression des molécules d'adhésion cellulaire ICAM-1. En plus de leurs effets antioxydants et leurs capacités de diminuer les radicaux libres (Gentile et al. 2004), ces pigments peuvent moduler l'expression des molécules d'adhésion dans les cellules endothéliales. L'Isorhamnetine diglycosides avec l'acide férulique et les betacyanines ont montré un effet inhibiteur sur la prolifération des cellules du cancer colorectal HT-29 (Bouic 2001). Et dans une autre étude l'extrait aqueux de la pulpe et les pigments indicaxanthines d'*O. Ficus indica* ont un effet antiprolifératif sur les cellules du cancer du côlon humain Caco-2 (Matias et al. 2014). L'effet antitumoral des bétalaïnes a été également vérifié sur les lignées cellulaires du cancer du sein, d'estomac, du système nerveux central, et des poumons (Reddy et al. 2005). La Taurine contenue dans la pulpe de cactus, est un acide aminé considéré comme un protecteur cellulaire et a montré dans différentes études qu'il joue un rôle important dans la modulation de la réponse inflammatoire et ayant des effets antioxydants (Devamanoharan et al. 1998; Wu et al. 1999).

1.3.4. Effets sur le métabolisme des glucides et le métabolisme lipidique

Les fibres alimentaires joueraient un rôle important dans le contrôle glycémique et dans le contrôle d'absorption des graisses. En effet, concernant le métabolisme des glucides, les polyphénols ont montré des effets remarquables sur le catabolisme des glucides et l'absorption du glucose, ce qui aide à préserver l'homéostasie de glucides (Hanhineva et al. 2010; Kim et al. 2016). Les extraits d'*O. ficus-indica* peuvent réguler le taux d'insuline sérique postprandial, le taux de glucose sanguin et l'augmentation du peptide plasmatique insulinothéropé dépendant

du glucose (une hormone gastro-intestinale) (López-Romero et al. 2014). Grâce à son activité hypocholestérolémique (Padilla-Camberos et al. 2015), l'extrait aqueux d'*O. ficus-indica* a un pouvoir d'inhibition de la fonction enzymatique des lipases pancréatiques. Les acides gras monoinsaturés et polyinsaturés (acide linoléique et l'acide oléique), contenus dans l'huile de graines d'*O. ficus indica*, représentent un potentiel bénéfique pour la santé en raison du rôle de ces acides gras insaturés dans la prévention des maladies cardiovasculaires. Ces types d'acide gras sont connus par leurs activités hypocholestérolémiantes, des LDL (low-density lipoproteins cholesterol) et du glucose (Chougui et al. 2013; Berraouan et al. 2014; Ennouri et al. 2006).

1.3.5. Propriétés neuroprotectrices

La pulpe de fruit, graines et cladodes d'*O. ficus-indica* contiennent des molécules neuroprotectrices (El-Hawary et al. 2020). Les mécanismes moléculaires qui causent des altérations au niveau neuronal sont liés principalement à l'inflammation et au stress oxydant. Les différents composés présents dans *O. ficus indica* peuvent prévenir les phénomènes de destruction et protéger le cerveau et le système nerveux (J.-H. Kim et al. 2006). Les extraits d'*O. ficus-indica* ont montré un effet neuroprotecteur *in vitro* et *in vivo* en cas d'ischémie. OFI était capable de réduire l'excitotoxicité induite au cours de l'ischémie cérébrale, ce qui cause dans la plupart des cas une lésion neuronale sévère (Wie 2000). *O. ficus-indica* contribuerait à la neuroprotection dans les cas de lésions neuronales provoquées par les radicaux libres et la privation en oxygène (Dok-Go et al. 2003). Les composés issus de cactus comme la quercétine, l'hydrate de quercétine et la 3-méthyl-éther-quercétine, sont capables d'atténuer les dégâts cellulaires induites par l' H_2O_2 et la xanthine oxydase dans les cellules corticales de rat (Dok-Go et al. 2003). Le Cerveau est très susceptible au stress oxydant due à sa richesse en acides gras insaturés et la surcharge en métaux de transition comme le fer, sans oublier la fragilité du mécanisme défensif du système nerveux en comparaison à d'autres organes (El-Hawary et al. 2020).

1.4. Applications

Aujourd'hui, les molécules à potentiel antioxydant attirent considérablement le monde industriel, et surtout du domaine agroalimentaire. Les jeunes cladodes du cactus *O. ficus-indica*, sont consommées sous forme de salade alors que le fruit est consommé frais et cru (Bensadón

et al. 2010). Au Brésil, le Chili et au Mexique, le cactus est utilisé comme fourrage pour le bétail. Beaucoup de professionnels de santé suggèrent de l'ajouter dans du pain ou dans les gâteaux (Msaddak et al. 2017; 2015) car il augmenterait l'activité antioxydante des matières grasses et diminue leur dégradation oxydative (Msaddak et al. 2015). La substitution ou l'ajout de la poudre de cladodes dans les produits alimentaires (farine de blé, glace ou maïs) augmente leurs qualités nutritionnelles et propriétés antioxydantes en apportant des fibres, du calcium et des antioxydants sans altérer les propriétés sensorielles et physiques du produit (Msaddak et al. 2017; Oniszczuk et al. 2020; Cornejo-Villegas et al. 2010; El-Samahy et al. 2009). Dans une autre étude, il a été démontré que l'ajout des extraits de fleurs d'*O. ficus-indica* à l'huile d'olive a permis d'augmenter sa stabilité et d'empêcher son oxydation (Ammar et al. 2017).

1.5. L'huile de graine de cactus

Les graines d'OFI, qui sont souvent jetées comme déchets, constituent près de 15% de la masse du fruit. Son huile représente 10 à 15% de la masse totale des graines. Cette huile a été caractérisée par sa teneur élevée en acides gras insaturés, l'acide linoléique étant le principal acide gras (Sawaya et Khan 1982). L'huile d'OFI contient également une quantité importante de tocophérols et stérols (Mannoubi et al. 2009). Il faut noter que la composition d'huile de graines de cactus dépend principalement de l'origine géographique (Matthäus et Özcan 2011).

1.5.1. Extraction

Pour préserver la qualité de l'huile, le processus d'extraction de l'huile de graine de cactus est d'une ultime importance. Différentes méthodes d'extraction sont appliquées, on trouve les méthodes conventionnelles d'extraction, au Soxhlet ou à l'aide d'une presse à froid, qui sont les plus citées dans la littérature et les autres sont des méthodes alternatives avancées, comme l'extraction par le dioxyde de carbone supercritique. Autres procédés d'extraction peuvent également être appliqués, y compris la macération (Ramírez-Moreno et al. 2017), l'autoclave, les micro-ondes et l'extraction par ultrasons. Le rendement en huile dépend de différents facteurs : le cultivar de figue de barbarie, la méthode d'extraction (les solvants d'extraction sont également inclus), l'origine géographique de l'espèce OFI (Matthäus et Özcan 2011; Kolniak-Ostek et al. 2020) la saison de récolte, la maturité des fruits, et le temps d'extraction (Mannoubi et al. 2009; Karabagias et al. 2020; Ortega-Ortega et al. 2017; M. F. Ramadan et Mörsel 2003a) (**Tableau 8**).

1.5.1.1. Méthodes conventionnelles d'extraction

Les méthodes d'extraction conventionnelles, y compris l'extraction par solvant et l'extraction mécanique par presse à vis électrique (Nounah et al. 2020), ou pression à froid des graines à l'aide d'une presse à huile mécanique (Bardaa et al. 2020) sont les plus employées pour extraire l'huile de graines de cactus. En général, la majorité des travaux scientifiques dans le domaine de caractérisation des huiles portent sur des huiles extraites au solvant qui donnent un meilleur rendement. Différents solvants sont utilisés, les plus courants sont l'hexane, l'éther de pétrole, l'acétate d'éthyle et le mélange chloroforme/méthanol (2:1) (Al-Naqeb et Aprea 2021). Trois étapes dans l'extraction par solvant sont appliquées, en commençant par la préparation des graines, l'extraction de l'huile et puis l'évaporation des solvants. La première étape de préparation des graines comprend la séparation des graines du fruit, puis le rinçage, le séchage et le broyage. Le solvant utilisé pour l'extraction de l'huile de graine de cactus a une influence majeure sur le rendement (Kolniak-Ostek et al. 2020). L'utilisation du système de Soxhlet avec le 2-méthoxytoluène (2-MeO) pendant 8 h, donne un rendement plus élevé de $(9,55 \pm 0,12 \text{ g}/100 \text{ g de graines})$ par rapport à celui obtenu avec le n-hexane $(8,86 \pm 0,25 \text{ g}/100 \text{ g de graines})$ (Gharby et al. 2020). Le rendement en huile varie également en fonction du temps d'extraction (Boukeloua et al. 2012; Chougui et al. 2013) (**Tableau 8**). La méthode d'extraction et le solvant utilisé n'affecte pas seulement le rendement mais aussi la composition en acide gras de l'huile extraite (de Wit et al. 2016; Al-Naqeb 2015).

1.5.1.2. Techniques avancées

Peu d'études ont rapporté l'utilisation de méthodes innovantes telles que l'extraction au fluide supercritique, par micro-ondes ou par ultrasons (Ortega-Ortega et al. 2017). L'extraction au fluide supercritique se fait à différentes pressions allant de 100 à 500 bars et différentes températures allant de 35°C jusqu'à 50°C, un réglage de débit de dioxyde de carbone se fixe à 50 g/min, et le rendement était de 6,5 % (Khaled et al. 2020). La comparaison des deux méthodes d'extraction par fluide supercritique et la méthode Soxhlet a été faite (Yeddes et al. 2012), et les résultats ont montré un rendement significativement plus élevé de 10,32 % par la méthode d'extraction au Soxhlet avec du n-hexane par rapport à l'extraction au fluide supercritique (Yeddes et al. 2012) (**Tableau 8**). L'extrait récupéré obtenu par fractionnement

supercritique des graines dégraissées de la figue de barbarie d'*Opuntia ficus-indica* algérienne était riche en molécules à pouvoir antioxydant comme la catéchine, l'épicatéchine et l'acide férulique, connues pour leurs effets bénéfiques sur la santé (Rgui et al. 2014). Pour La technique de micro-extraction *in situ* des composants de l'huile de graines au biais des micro-ondes, est une méthode facultative de quantification des métabolites présents dans la graine de cactus lorsqu'un petit échantillon est disponible. Une seule étude a cité l'utilisation de cette méthode pour extraire l'huile de graines de cactus de huit variantes de figue de barbarie au Mexique, et a permis la récupération de composés phytochimiques de l'huile à haute valeur nutraceutique, y compris le squalène, le β -sitostérol et le γ -tocophérol (Regalado-Rentería et al. 2020).

Tableau 8: Différentes méthodes d'extraction de l'huile de graines de cactus, solvants, temps d'extraction et rendement.(Al-Naqeb et Aprea 2021)

Technique	Méthode	Rendement (%)	Référence
Solvant d'extraction			
2-Methyloxolane et n-hexane	Système de Soxhlet pour 8H	9,55 ± 0,12: 2-methyloxolane 8,86 ± 0,25: n-hexane	(Gharby et al. 2020)
Éther di éthylique	Système de Soxhlet pour 3H	2,61–7,69	(Kolniak-Ostek et al. 2020)
Methanol	Système de Soxhlet pour multiples heures	16,20	(Al-Naqeb et Aprea 2021)
n-Hexane	Système de Soxhlet 4 à 6H	5,40 ± 0,5	(Karabagias et al. 2020)
n-Hexane	Système de Soxhlet	Non déterminé	(Ortega-Ortega et al. 2017)
n-Hexane	Système de Soxhlet 8H	5,40–9,9	(Taoufik et al. 2015)
n-Hexane	Système de Soxhlet 18H	10,45 ± 0,10	(Boukeloua et al. 2012)
n-Hexane	Système de Soxhlet	8,91–10,32	(Yeddes et al. 2012)
n-Hexane	Système de Soxhlet 9H à 120°C	7,30–9,3	(Chougui et al. 2013)
n-Hexane	Système de Soxhlet 10H	11,75	(Mannoubi et al. 2009)
n-Hexane	Système de Soxhlet 9H	11,00	(Ennouri et al. 2005)
Ether de pétrole	Système de Soxhlet 6H à 50°C	5,00–14,4	(Özcan et Al Juhaimi 2011)
Ether de pétrole	Système de Soxhlet	17,20	(Sawaya et al. 1983)
Macération avec solvant			
n-Hexane	24H de macération	6,2±0,3–15,5 ± 0,5	(Regalado-Rentería et al. 2020)
n-Hexane, éthanol et acétate d'éthyle	Mélange de broyat de graines et solvants	Hexane : 11,8 Éthanol et acétate d'éthyle 10,00	(Ramírez-Moreno et al. 2017)

n-Hexane	La poudre de graine trempé dans l'hexane à 25°C à l'obscurité	Non déterminé	(Ortega-Ortega et al. 2017)
Chloroforme et méthanol 2 :1	Trempé dans le chloroforme et méthanol avec l'ajout du BHT (Hydroxytoluène butylé) à 0,001%	4,1–8,8	(de Wit et al. 2018)
n-Hexane, éther de pétrole chloroforme méthanol (2 :1)	Macération avec les solvants (1 :5) à température ambiante pendant 24H	Chloroforme : méthanol 7,8 ± 0,4 n-hexane 5,0 ± 0,4 et Éther de pétrole : 6,1 ± 0,4	(Al-Naqeb 2015)
Chloroforme et méthanol (2 :1)	La poudre trempée dans les solvants	9,9	(M. F. Ramadan et Mörsel 2003a)
Extraction mécanique			
Presse à vis électrique	Extraction suivie d'une centrifugation de 15min à 3000 rpm	Non déterminé	(Nounah et al. 2020)
Presse à froid	Presse à froid mécanique		(Bardaa et al. 2020)
Méthodes de pression à froid	Compression par un piston au moyen d'une presse hydraulique	0,5–6,1	(Regalado-Rentería et al. 2020)
Fluide supercritique			
Fluide supercritique	Des conditions optimales de fractionnement anti-solvant supercritique ont été réalisées dans des conditions de pression de 15 MPa et 30 g/min (débit de CO ₂)	L'extrait est riche en catéchine, épicatechine, et l'acide férulique	(Rgui et al. 2014)
Fluide supercritique	500bar, à 35°C pendant 80min et un débit de CO ₂ de 20g/min	6,5	(Khaled et al. 2020)
Fluide supercritique	Extraction à différentes températures et une pression fixe	1,9 : cactus cultivé 3,4 : cactus sauvage	(Yeddes et al. 2012)
Méthodes d'extraction aux ultrasons	Des ultrasons de 1500W à une fréquence constante de 20kHz et avec l'utilisation d'une sonde de 25 mm pendant 5 à 15 min à 25 °C	3,8–6,0	(Ortega-Ortega et al. 2017)
Microextraction			
Micro-onde	Mélange de 20mg de poudre de graines de cactus avec 1ml d'isooctane, puis tout est mis dans une microonde à 100°C,	Non déterminé	(Regalado-Rentería et al. 2020)

	150W pendant 13min, puis filtré, transestérifié et salinisé		
Hydrodistillation utilisant	Les graines moulues ont été extraites avec	0,6–3,0	(Zito et al. 2013)
Appareil de type Clevenger	n-hexane comme solvant et un Appareil de type Clevenger		

1.5.2. Composition

Les produits dérivés de cactus, comme les graines, sont une source importante de fibres alimentaires et de protéines (Salim et al. 2010; El Kossori et al. 1998). Les graines d'où l'huile est extraite représentent 5 à 10% de la masse de fruit (Barbera et al. 1995), et l'huile représente 17% de la masse totale de la graine (Sawaya et al. 1983). Il y a une très grande variation concernant le nombre de pépins qui va de 120 à 350 graines par fruit (Nobel 2002). Le fruit de cactus est riche en vitamines, mais la teneur varie d'un tissu végétal à un autre. Dans la peau ou l'épicarpe on trouve surtout de la vitamine E, sous forme d' α -tocophérol (M. F. Ramadan et Mörsel 2003b). Alors que, le γ -tocophérol est majoritaire dans l'huile de graine de cactus par rapport à l'huile de la pulpe (Ramadan et Mörsel 2003). Les huiles de graines de cactus sont les plus réputées par rapport à la qualité, le potentiel bioactif de ces constituants pour la santé. L'huile a une forte teneur en acides gras polyinsaturés estimée à (82%), on trouve principalement les acides : linoléique (C18:2), oléique (C18:1), palmitique (C16:0), et stéarique (C18:0) (Özcan et Al Juhaimi 2011; Ghazi et al. 2015; Chougui et al. 2013; Matthäus et Özcan 2011; M. F. Ramadan et Mörsel 2003b). Le pourcentage de chaque acide gras dans l'huile de graine de cactus est déterminé : 61-69% d'acide linoléique, 12–16% d'acide oléique, 18% d'acides gras saturés, 11–16% d'acide stéarique, et 3–4% d'acide palmitique (Labuschagne et Hugo 2010; Matthäus et Özcan 2011; Sawaya et Khan 1982; Salvo et al. 2002; Coşkuner et Tekin 2003; Ennouri et al. 2005). Le corps humain est incapable de synthétiser les acides gras essentiels comme les acides gras omega-3 et omega-6, ce qui explique la nécessité de leurs consommations à partir des aliments et les introduire dans le régime alimentaire quotidien. Les caractéristiques physicochimiques de l'huile de graines de cactus montrent des ressemblances avec d'autres huiles de fruits, comme l'huile de graines de raisin qui contient 68–78% d'acide linoléique, 5–11% d'acide palmitique et 3–6% d'acide stéarique, et l'huile de graine de colza composée de 61% d'acide linoléique, 4% d'acide palmitique, et 2% d'acide stéarique (Labuschagne et Hugo 2010; Matthäus et Özcan 2011; Ennouri et al. 2005) . Les

acides gras palmitoléique et arachidique sont aussi présents mais en petite quantité dans l'huile de graines de cactus (Pantaleón et al. 2009). De plus, l'huile contient des molécules volatiles : des hydrocarbures, aldéhydes, cétones, esters et acides, qui sont de grandes importances parce qu'elles servent à l'évaluation de la qualité des huiles alimentaires et permettent de définir les critères organoleptiques du produit. La présence ou l'absence de ses composés et leurs quantités, dépendent essentiellement de la variété et la méthode d'extraction de l'huile. Les principales classes de composés volatiles identifiés dans l'huile de graine de cactus sont : l'hexanal et 2-méthyl propanal, acétaldéhyde, acide acétique, acétone, 2,3-butanedione, et les plus abondants sont les aldéhydes (2-propenal, pentanal, hexanal, (E)-2-hexenal, heptanal, (Z)-2-heptenal, octanal, 2-octenal, nonanal, 2,4-décadienal, et trans-4,5-époxy-(E)-2-décenal) (Nounah et al. 2020), avec la présence des acides gras volatiles et leurs dérivés et les terpènes (Zito et al. 2013). Une étude faite sur les graines de cactus de différents cultivars a montré qu'elles contiennent un total de composés phénoliques qui varie de 48 à 89 mg d'équivalent acide gallique /100 g de graines de cactus (Chougui et al. 2013) et entre $1,5 \pm 0,1$ et $2,6 \pm 0,2$ mg de quercétine /100g de graines de cactus (Abdel-Hameed et al. 2014). Avec la présence d'autres composés comme le β -sitostérol et γ -tocophérol (M. F. Ramadan et Mörsel 2003a).

1.5.3. Propriétés

Jusqu'à présent, l'ensemble des expérimentations réalisées sur des modèles Animaux ou cellulaires, démontrent les capacités thérapeutiques de l'huile de graine de cactus, antioxydantes (*in vivo* et *in vitro*), antimicrobiennes, anti-diabète, hypolipémiantes, anticancéreuses (*in vitro*), anti-inflammatoires, anti-ulcère (Brahmi et al. 2020). Son contenu riche en acides gras polyinsaturés, stérols et antioxydants rend cet extrait un aliment de grande valeur nutritionnelle. Sur la base des propriétés physicochimiques, l'huile de graines de cactus est considérée comestible et peut être utilisée par l'homme, sa caractérisation chimique rapportée dans de multiples articles scientifiques, a montré la présence des acides gras polyinsaturés (acide linoléique, acide oléique, acides gras oméga-6, acides gras oméga-3), de phytostérols (β -sitostérol, γ -tocophérol), des caroténoïdes, des composés phénoliques et volatiles. Les différences signalées dans la composition en acides gras et en stérol est due à différents facteurs : localisation géographique, la variété et méthodes d'extraction.

1.5.3.1. Activité antioxydante

L'activité et l'efficacité du pouvoir antioxydant de l'huile de graine de cactus (HGC) ont été testées par différentes méthodes *In vitro* : DPPH (2,2-diphényl 1-picrylhydrazyle), ABTS (L'acide 2,2'-azino-bis(3-éthylbenzothiazoline-6-sulphonique)) et la méthode de molybdate (Brahmi et al. 2020). Les résultats varient d'une étude à une autre à cause de méthodes analytiques, méthode d'extraction et le solvant utilisés (Khémiri et Bitri 2019), mais montrent unanimement le pouvoir antioxydant de l'huile de graines de cactus. Dans une étude conduite par Berraouan et al, l'HGC extraite par la méthode de pression à froid à partir des graines de figues de barbaries marocaines a montré la capacité inhibitrice de la formation des radicaux libres exercées par l'huile (Berraouan et al. 2014). Parallèlement, les résultats des expérimentations *in vivo*, indiquent que l'huile de graine de cactus dans des conditions d'inflammation aigüe induite chez les rat a une action antioxydante importante par l'activation des enzymes à activité antioxydantes (Bardaa et al. 2020).

1.5.3.2. Activité antimicrobienne

Face au problème de santé publique lié à la résistance aux antibiotiques, et les dangers de pesticides sur les récoltes, l'effet antimicrobien des extraits de plantes contre les microorganismes pathogènes est de grande importance et est fortement investigué. Les résultats sont différents selon les résultats des études, certains montrent une bonne activité, et d'autres peu ou pas d'activité antimicrobienne. Dans une étude où HGC obtenue par méthode d'extraction presse à froid a été testé sur des souches bactériennes Gram-positive (*Staphylococcus aureus* résistantes au méticilline), Gram-négative (*Escherichia coli* et *Pseudomonas aeruginosa*) et six souches fongiques (*Aspergillus niger*, *Aspergillus flavus*, *Mucor rammaniarrus*, *Aspergillus ochraceus*, *Aspergillus parasitus* et *Candida albicans*) montrant l'absence de l'activité antimicrobienne de l'extrait (Brahmi et al. 2020). Alors que dans d'autres essais, l'huile de graine de cactus a pu réduire la croissance de *Salmonella*, *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*, des levures et les métabolites mycotoxines, *Streptococcus agalactiae*, *Enterobacter cloacae*, *Candida albicans*, *Candida parapsilosis*, *Candida sake*, *Aspergillus niger*, *Penicillium digitatum*, et *Fusarium oxysporum* (Al-Naqeb et Aprea 2021; Khémiri et al. 2019), et l'effet a été comparable aux antibiotiques ampicilline, streptomycine, et sulfaméthoxazole/triméthoprime (Ramírez-Moreno et al. 2017). L'impact de l'HGC sur le biofilm a été aussi évalué, l'extrait était remarquablement capable d'inhiber la

formation de biofilm des bactéries *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, et *Pectobacterium carotovorum* phytopathogène) (Nazzaro et al. 2021).

1.5.3.3. Propriété anti-diabète

L'huile de graines de cactus aide à la prévention contre le diabète. Des rats mâles, ayant reçu un supplément de 5% de l'huile de graines de cactus dans leurs rations alimentaires pendant 2 mois, ont montré une augmentation de la sécrétion d'insuline et par conséquent diminuer la concentration du glucose dans le sang et augmenter le taux de glycogène (Al-Naqeb et Aprea 2021). L'huile de graines de cactus stimule la dégradation du glucose et facilite son incorporation sous forme de glycogène dans le muscle squelettique et le foie pour maintenir l'homéostasie de glucose sanguin (Al-Naqeb et al. 2021; Ennouri et al. 2006). En cas de diabète induit par la streptozotocine (Al-Naqeb 2015) ou l'alloxane (Berraaouan et al. 2015) chez les rats, l'administration orale de l'huile de graine de cactus aide à abaisser significativement le taux de glucose sanguin (Al-Naqeb 2015), le même effet a été observé après traitement par la glibenclamide (médicament du diabète type 2). L'huile de graine de cactus protège contre l'hyperglycémie, ces composants augmentent l'expression de gène transporteur de glucose 2, et réduisent l'expression du gène phosphoénolpyruvate carboxykinase, enzymes clés du métabolisme de glucose (Berraaouan et al. 2014). Une inhibition de l'absorption intestinale de glucose est aussi envisageable due à l'action des acides gras insaturés présents dans l'huile de graines de cactus sur les cellules entériques (González Barra et al. 1995).

1.5.3.4. Propriétés anti-hypercholestérolémie

L'Hypercholestérolémie est souvent associée aux maladies cardiovasculaires. Deux mois de traitement avec de l'huile de graines de cactus a permis de diminuer le taux de cholestérol, LDL et de glucose dans le sang (Al-Naqeb et Aprea 2021). L'HGC n'a pas d'effet sur le poids mais diminue l'indice de consommation. *In vitro*, l'huile de graines de cactus s'est montrée capable de moduler le métabolisme de cholestérol grâce à la présence des composés bioactifs comme le sitostérol, schottenol, spinasterol, les acides gras insaturés, β -carotène, et la vitamine E (El Kharrassi et al. 2014). L'extrait HGC, permet de réguler l'expression génique de récepteurs nucléaires liver X receptor (LXR) et ses gènes cibles, *Abca1* et *Abcg1*, connus par leurs implications dans la régulation du métabolisme du cholestérol. Les phytostérols présents dans l'huile de graine de cactus réduisent le taux du cholestérol total, du triglycéride,

l'indice athérogène, LDL, et du VLDL dans le plasma, sans avoir d'effet sur le HDL (Ennouri et al. 2006).

1.5.3.5. Propriétés cytotoxiques et apoptotiques

Des études récentes sur l'effet de l'huile de graines de cactus sur des cellules cancéreuses (colorectal cancer) Colo-205 et HepG2 (Al-Naqeb et Aprea 2021) ont montré sa capacité à inhiber la croissance cellulaire et à augmenter le taux des espèces réactives d'oxygène, induisant par conséquent la mort cellulaire (Becer et al. 2018). Cet effet sur la croissance cellulaire est lié à la présence de l'acide linoléique connu pour son effet anticancéreux. La composition de l'huile de graines de cactus n'est pas cytotoxique *in vitro* à des concentrations allant de 0,2 à 0,16 g/ml sur les cellules du cancer de seins, de prostate et du colon, mais elle devient toxique pour les cellules MOLT-4 de leucémie à une concentration de 5 mg/ml (Camarena-Ordonez et al. 2010 ; Ait El Cadi et al. 2012). Peu d'études ont évalué la toxicité de l'huile de graines de cactus *in vivo* (Khémiri et al. 2019). Administré par voie orale ou intrapéritonéale, une dose de 5 ml/kg de l'huile de graine de cactus ne cause aucune toxicité, ni mort ou changement de comportement de l'animal (Berraaouan et al. 2015). Tandis que, des doses supérieures à 10ml/kg causent un état d'agitation immédiate et des perturbations comportementales, suivies d'un relâchement, puis d'une perte de conscience. Un état de diarrhéique est constaté chez les animaux qui meurent 12h après l'administration de l'huile (Matthäus et Özcan 2011).

1.5.3.6. Propriétés antiinflammatoires

L'huile de graines de cactus a un pouvoir anti-inflammatoire notable et diminue l'expression de biomarqueurs d'inflammation *in vivo* (Bardaa et al. 2020). En cas d'inflammation aiguë, l'HGC diminue le nombre de leucocytes, des plaquettes, la protéine C-réactive (CRP) et la concentration en fibrinogène dans le plasma, réduit la taille de l'œdème (Al-Naqeb et Aprea 2021), et inhibe la production des espèces oxydantes par les leucocytes et d'autres cellules phagocytaires dans le site d'inflammation (Berraaouan et al. 2015). Ces effets résultent du potentiel antioxydant des composés bioactifs que renferme l'huile de graine de cactus comme les phytostérols, tocophérols, polyphénols, flavonoïdes et les caroténoïdes. En plus, l'usage topique de l'huile de graine de cactus à 0,6 $\mu\text{L}/\text{mm}^2$ accélère la fermeture de la plaie et améliore le processus de cicatrisation (Khémiri et al. 2019). Cet effet serait dû aux

composés bioactifs de l'huile incluant les acides gras insaturés, triacylglycérols, phytostérols, et tocophérols qui permettent : d'augmenter la vitesse de cicatrisation de la plaie, compléter la re-épithélialisation, et améliorer l'aspect externe de la cicatrice. Les Flavonoïdes sont connues à leurs tour par leurs capacités d'atténuer l'effet inflammatoire des prostaglandines (Morimoto et al. 1988).

1.5.3.7. Propriétés antiulcéreuses

L'effet antiulcéreux de l'huile de graine de cactus a été rapporté dans une seule et unique étude (Khémiri et al. 2019). L'administration de l'huile de graines de cactus à deux doses différentes a permis de protéger la muqueuse gastrique contre l'effet ulcéreux de l'éthanol, montrant une grande efficacité de protection de la cytoarchitecture et de la fonction muco-gastrique contre les lésions sévères provoquées par la prise d'éthanol (Khémiri et Bitri 2019). Ces effets ont été expliqués par la richesse nutritionnelle de l'huile par ces composés bioactifs comme les tocophérols, l'acide linoléique, l'acide oléique, et le β -sitostérol, qui agissent synergiquement et d'une manière complémentaire pour assurer la protection de l'estomac et surtout la muqueuse gastrique (Khémiri et Bitri 2019).

1.5.3.8. Propriétés anti-UV

L'huile de graine de cactus est utilisée le plus souvent comme produit cosmétique, mais peu d'études montrent son efficacité envers les rayons UV. Les effets protecteurs de l'huile de graines de cactus contre les UV-C sont dues principalement à l'action des acides gras insaturés et les molécules à pouvoir antioxydants. La protection n'est pas limitée aux rayons UV-C mais aussi capable de protéger contre les rayons du spectre UV-B et UV-A (Chougui et al. 2013). Les études indiquent la forte absorption de l'huile de graine de cactus des rayons UV-A de 320–400 nm, où la lumière ultraviolette est responsable des lésions cellulaires les plus sévères, ainsi que des propriétés d'absorption des UV-B spectre de 290–320 nm et des rayons UV-C entre des longueurs d'onde de 100-290 nm. L'huile de graine de cactus protège les fibroblastes dermique primaires humaines contre les rayons UV (Nounah et al. 2020) et contre la mort cellulaire causée par les UV.

1.5.4. Les molécules issues du cactus

Plusieurs études faites concernant le cactus *O. ficus-indica* (OFI) ont révélées la présence de différents constituants chimiques comme les alcaloïdes, flavonoïdes, terpènes, polysaccharides, et acides organique(E. H. Lee et al. 2003; Alarcon-Aguilar et al. 2003; Saleem et al. 2006), parmi les flavonoïdes on trouve : l'isorhamnetine, l'isorhamnetine-3-rutinoside (narcissine), la quercétine, le ferulaldehyde (4-Hydroxy-3-methoxycinnamaldehyde), le syringaldéhyde et la vanilline.

1.5.4.1. Structures des dérivés de l'HGC

1.5.4.1.1. Isorhamnetine (IR)

L'isorhamnetine est une monométhoxyflavone issue d'une molécule de quercétine dans laquelle le groupe hydroxy de la position 3' est remplacé par un groupe méthoxy. Appelée aussi 3'-Methoxy-3,4',5,7-tétrahydroxyflavone, sa formule chimique est $C_{16}H_{12}O_7$, son poids moléculaire est de 316,26 g/mol, c'est un produit naturellement trouvé dans des plantes comme *Lotus ucrainicus*, *Strychnos pseudoquina*, et le cactus (Pengfei et al. 2009; Y. Wu et al. 2021). (PubChem). (**Figure 3**)

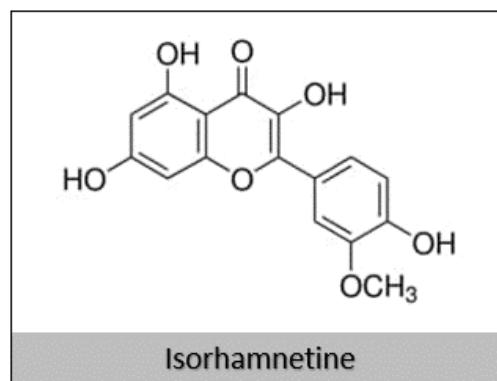


Figure 3: La structure chimique de l'Isorhamnetine

1.5.4.1.2. Isorhamnetine 3-rutinoside (RU)

L'isorhamnetine 3-rutinoside est un dérivé disaccharidique, un glycosyloxyflavone, monométhoxyflavone ou un trihydroxyflavone, appelé aussi : Narcissoside, 3-Rutinosylisorhamnetin, 3-O-Methylquercetin 3-rutinoside, Quercétine 3'-methyl éther 3-rutinoside, 3,4',5,7-Tetrahydroxy 3'-methoxyflavone 3-rutinoside, Isorhamnetine 3-

rhamnoglucoside, Narcissine, ou Isorhamnetine 3-O-rutinoside. Naturellement trouvé dans *Astragalus varius*, *Phoenix canariensis* (PubChem), sa formule chimique est $C_{28}H_{32}O_{16}$, son poids moléculaire est de 624,54g/mol (**Figure 4**).

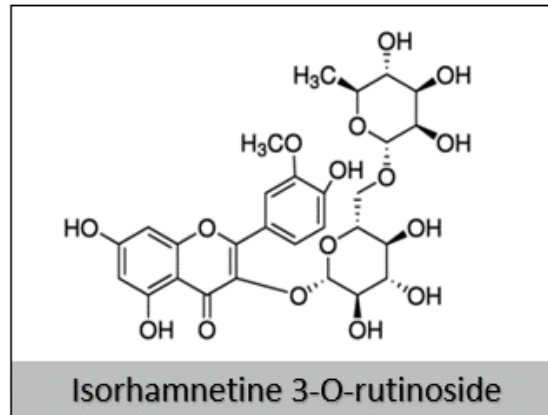


Figure 4: Structure chimique de l'isorhamnetine 3-O-rutinoside

1.5.4.1.3. Quercétine (QE)

La quercétine est un pentahydroxyflavone contenant 5 groupes hydroxy dans les positions 3-, 3'-, 4'-, 5- et 7-. C'est le type de flavonoïde le plus abondant dans les légumes, fruits et vins. Nommée aussi Quercétine dihydrate, 3,3',4',5,7-Pentahydroxyflavone dihydrate, ou 2-(3,4-dihydroxyphényl) -3,5,7-trihydroxy-4H-1-benzopyran-4-one dihydrate, ou 7-hydroxyflavonol, est de formule chimique $C_{15}H_{10}O_7 \cdot 2H_2O$, et de poids moléculaire 338,27 g/mol, et sans les molécules d'eau est de 302.23 g/mol. C'est l'acide conjugué de quercétine-7-olate.(PubChem) (**Figure 5**).

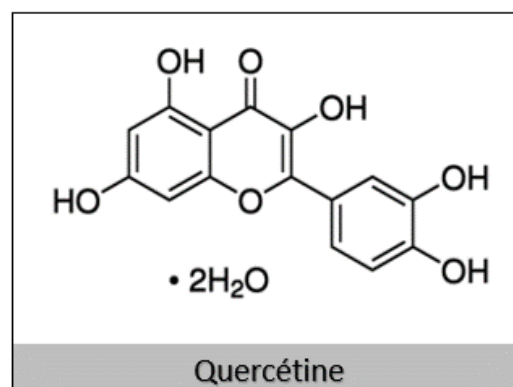


Figure 5: Structure chimique de Quercétine

1.5.4.1.4. Féruladéhyde (4-Hydroxy-3-méthoxycinnamaldéhyde (FA))

Le féruladéhyde (4-Hydroxy-3-méthoxycinnam aldéhyde ou coniféryle), sa formule chimique est $C_{10}H_{10}O_3$, de poids moléculaire 178,18 g/mol. (« Encyclopedia of Dietary Supplements 2nd edition.pdf » s. d.). L'aldéhyde de coniféryle est un membre de la classe des cinnamaldehydes, substitué d'un groupe hydroxy à la position 4 et un groupe méthoxy à la position 3. (PubChem). (**Figure 6**)

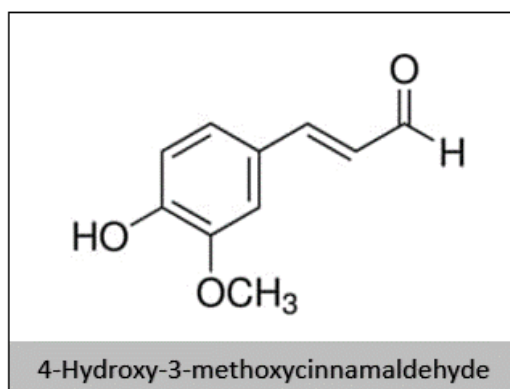


Figure 6: Structure chimique de 4-Hydroxy-3-methoxycinnamaldehyde

1.5.4.1.5. Syringaldehyde (SA)

Le Syringaldehyde, appelé aussi 4-hydroxy-3,5-diméthoxybenzaldéhyde ou 3,5-diméthoxy-4-hydroxybenzaldéhyde de formule chimique $C_9H_{10}O_4$, et de poids moléculaire de 182,17 g/mol (PubChem), est un hydroxybenzaldéhyde, qui est un 4-hydroxybenzaldéhyde substitué par des groupes méthoxy dans la position 3 et 5. Isolé à partir de *Pisonia aculeata* et *Panax japonicus var*, peut être présent également dans *Ficus septica*, et *Mikania laevigata* (PubChem). (**Figure 7**)

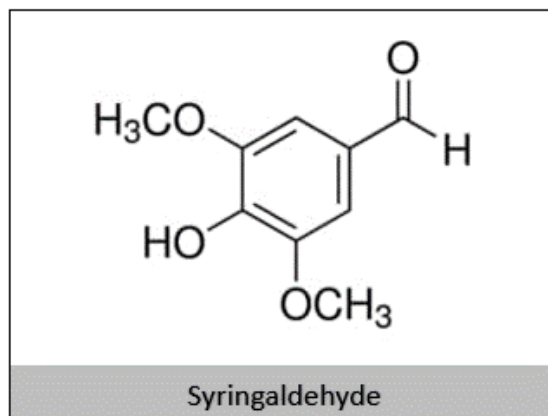


Figure 7: Structure chimique de Syringaldehyde

1.5.4.1.6. Vanilline (VA)

La vanilline est appelée aussi 4-Hydroxy-3-méthoxybenzaldéhyde de formule chimique $C_8H_8O_3$, et d'un poids moléculaire de 152,15 g/mol. La vanilline est un monométhoxybenzène qui appartient à la classe des benzaldéhydes des phénols portant des substituants méthoxy et hydroxy groupes dans les positions 3 et 4, respectivement. Ce produit est naturellement présent dans le *Ficus erecta* var. *beeheyana*, et *Pandanus utilis* (PubChem). (Figure 8)

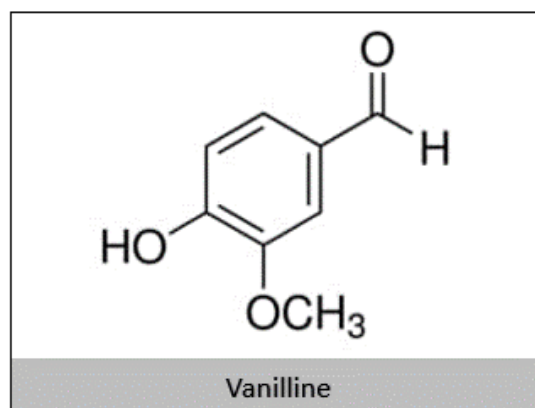


Figure 8: Structure chimique de la vanilline

1.5.4.2. Activités antiinflammatoires et antioxydantes

1.5.4.2.1. Isorhamnetine (IR)

L'isorhamnetine est un flavonoïde, et l'un des composés bioactifs les plus importants de cactus. Il possède des activités pharmacologiques à effets antitumoral, antiviral, anti-inflammatoire, antioxydant et anti-apoptotique (**Tableau 9**). Les études réalisées sur cette molécule ont démontré son effet protecteur pour traiter les maladies cardiovasculaires et cérébro-vasculaires (Y. Xu et al. 2020), et les maladies neurodégénératives (Ishola et al. 2019). Son rôle majeur dans la protection des organes et la prévention contre l'obésité vient de sa capacité à moduler les mécanismes impliquant la régulation de kinases comme la PI3K (Phosphoinositide 3-kinase /Akt/PKB (Protéine kinase B) et MAPK (Mitogen-activated protein kinase) ainsi que d'autres voies de signalisation. Il régule également NF- κ B (nuclear factor-kappa B) et l'expression de certaines cytokines (G. Gong et al. 2020).

L'isorhamnetine protège les cellules cardiovasculaires contre l'inflammation et le stress oxydant et l'apoptose. Ce flavonoïde protège également les cellules endothéliales contre le stress oxydatif provoqué par H₂O₂ et LDL oxydées (Oxidized Low-Density Lipoprotein) (Jiayi et al. 2019). *In vitro*, l'isorhamnetine a montré son pouvoir antioxydant qui permet de capter les radicaux libres dans les tests DPPH et ABTS et d'inhiber la peroxydation lipidique au niveau des mitochondries du foie (G. Gong et al. 2020). Parallèlement, l'isorhamnetine testée sur des cellules RPE (épithélium pigmentaire rétinien) humaines exprime un effet antioxydant contre le stress oxydant et son mécanisme d'action serait lié à l'activation de la voie de transduction du signal par PI3K/Akt (J. Wang et al. 2018). L'isorhamnetine peut également affecter la voie d'apoptose mitochondriale et activer la voie de signalisation Nrf2/ARE (nuclear factor erythroid-2-related factor 2)/ (antioxydant responsive element) protégeant les cardiomyocytes du rat (H9C2) de stress oxydant généré par H₂O₂ et exercer ainsi ses fonctions antioxydantes (Johnson et al. 2008) et anti-apoptotiques (G. Gong et al. 2020). L'isorhamnetine renforce le mécanisme antioxydant de défense cellulaire par l'activation des voies Nrf2/ HO-1(hème oxygénase 1) et ERK (Extracellular signal-regulated kinases), ce qui empêche la cytotoxicité cellulaire des cellules C2C12 induite par le H₂O₂ (Y. H. Choi 2016). L'isorhamnetine 3-O- β -D-glucopyranoside permet l'inhibition du stress oxydatif dans les cellules, en limitant la génération des ROS intracellulaires, et augmenter la production du glutathion (GSH) et l'expression des enzymes antioxydantes, et supprimer les altérations moléculaires induites par TNF- α dans les cellules humaines de la moelle osseuse (C.-S. Kong et al. 2009) (**Tableau 8**).

L'effet anti-inflammatoire de l'isorhamnetine a été démontré à plusieurs reprises dans différentes études scientifiques. Le mécanisme d'inhibition de la réaction inflammatoire est lié principalement à la régulation de la production des médiateurs d'inflammation tels que les cytokines et les ROS (G. Gong et al. 2020). L'inhibition de NF- κ B est le principal mode d'action anti-inflammatoire de l'isorhamnetine. De nombreuses molécules à tous les stades de la réponse inflammatoire sont régulées par NF- κ B, y compris TNF- α , IL-1 β , IL-2, IL-6, IL-8, IL-12, iNOS, COX2, chimiokines, molécules d'adhésion (Yang Li et al. 2016).

Tableau 9: Effets anti-inflammatoires de l'isorhamnetine et ses mécanismes d'actions d'après (G. Gong et al. 2020)

Effet thérapeutique	Expérimentation	Mécanisme d'action	Références
Lésion pulmonaire aiguë	Perfusion intratrachéale de LPS (3 mg/kg) chez des souris mâles BALB/c	Inhibition de l'expression de COX-2	(Yang et al. 2016)
Lésion pulmonaire aiguë	Macrophages de souris RAW264.7 stimulés par LPS et souris mâles BALB/c	Inhibition des voies de MAPK et NF-kappa B	(Chi et al. 2016)
Lésion pulmonaire aiguë	Macrophages de souris RAW264.7 stimulés par LPS et souris mâles BALB/c	Inhibition de l'activation de NF-kappa B et la diminution de sécrétion des cytokines pro-inflammatoires (TNF-1, IL-1, IL-6)	(Yang et al. 2016)
Parodontite/maladie des gencives	Fibroblastes de gencives humaines stimulés par le LPS	L'activation de la voie de signalisation Nrf2, avec la régulation en amont de Nrf2 et HO-1, et l'inhibition de l'activation de NF-kB	(Qi et al. 2018)
Maladies intestinales	Lignée cellulaire de cancer du côlon humain HT-29 et LS174 T et souche de macrophage de souris RAW264.7	Activation de PXR, promotion de l'up régulation du métabolisme médié par PXR des probiotiques et la down-régulation de la transduction du signal NF-kappa B	(Dou et al. 2014)
Inflammation cellules BV2 microgliales	Microglie de souris BV2 stimulée par le LPS	Inhibition de la voie de signalisation NF-kappa B, Antagonisme de TLR4 et élimination de l'accumulation des ROS	(S. Y. Kim et al. 2019)
Arthrose	Cellules cartilagineuses humaines stimulées par IL-1 β	Inhibition de l'expression de NF- κ B et le facteur de transcription p65.	(J. Li et al. 2017)
Tuberculose pulmonaire	Fibroblastes pulmonaires humains (cellules MRC-5) stimulés par l'IFN- γ	La diminution d'expression génique de TNF α , IL1-B, IL-6, IL-12	(Jnawali et al. 2016)

Lésion rénale aiguë	Modèle de lésion d'ischémie-reperfusion chez des rats SD mâles	L'inhibition de l'activation excessive de la voie de signalisation NF-kappa B, réduction de la réponse inflammatoire et du stress oxydant	(G. Gong et al. 2020)
Maladie rénale	Rats diabétiques de type 2 induits par un régime riche en matière grasse et injection intra-abdominale de streptozotocine	Inhibition de l'activité de transduction du signal NF-kappa B, réduction des médiateurs d'inflammation et diminution du stress oxydatif	(Qiu et al. 2016)

1.5.4.2.2. Isorhamnetine 3-O-rutinoside (RU)

L'isorhamnetine 3-O-rutinoside (ou narcissine) est l'un des constituants les plus caractéristiques d'*Opuntia ficus indica* (Cejudo-Bastante et al. 2014), elle se caractérise par ces activités biologiques, hépato-protectrice, antioxydante et apoptotiques dans les cellules leucémiques humaines (Pham et al. 2014; Gevrenova et al. 2015; B.-N. Su et al. 2005; Boubaker et al. 2011) La narcissine comme agent hépato-protecteur, permet l'élimination des lésions produites au niveau du tissu hépatique grâce à son pouvoir antioxydant permettant de capter les radicaux libres et inhiber leurs générations (Gevrenova et al. 2015). La présence de la narcissine comme flavonoïde dans les plantes comestibles permet de protéger contre le diabète par l'inhibition des activités enzymatiques de l' α -glucosidase, et 15-lipoxygénase. L'inhibition de l'enzyme α -glucosidase retarde la libération du D-glucose à partir des oligosaccharides et les disaccharides provenant d'une alimentation riche en sucres complexes et ralentit l'absorption du glucose, ce qui permet de réduire le taux de glucose sanguin postprandial et empêche l'hyperglycémie postprandiale (Gao et al. 2008; Yoo et al. 2018).

L'enzyme 15-lipoxygénase (15-LO) est responsable de la production de médiateurs lipidiques actifs causant des pathologies comme le cancer, le psoriasis, l'athérosclérose et le diabète (type 1 et 2) (Dobrian et al. 2011; Schneider et Bucar 2005). La narcissine aide à l'inhibition de l'angiogenèse tumorale, et des enzymes cyclooxygénases-1 et -2, ainsi que de la tyrosine kinase (B.-N. Su et al. 2005). L'effet cytotoxique provoqué par la narcissine sur les cellules K562 est associé à l'activation de la voie extrinsèque du processus d'apoptose. L'activation de la caspase 8 entraîne une activation de suite de la caspase 3, induisant ainsi un clivage de PARP et la fragmentation d'ADN génomique, observés après 48H d'incubation (Boubaker et al. 2011).

1.5.4.2.3. Quercétine (QE)

La quercétine est une molécule omniprésente dans les aliments d'origine végétale. Ce flavonoïde se caractérise par ces actions antiprolifératives, liées à la modulation des voies de transduction du signal médiées par l'EGFR (Récepteur du facteur de croissance épidermique) (L.-T. Lee et al. 2002) ou les récepteurs d'œstrogènes (Larocca et al. 1996). La quercétine inhibe les voies lipoxigénase et cyclooxygénase empêchant ainsi la production des médiateurs pro-inflammatoires, ce qui expliquerait ces effets anti-inflammatoires et antiallergiques (Laughton et al. 1991). Des extraits de quercétine ont été utilisés pour traiter ou prévenir diverses pathologies, notamment les maladies cardiovasculaires, l'hypercholestérolémie, les maladies rhumatismales, les infections et le cancer. Cependant, son efficacité n'est pas encore élucidée dans des essais cliniques. De plus, la quercétine améliore les performances physiques et mentales et réduit les risques d'infection (Davis et al. 2009).

Elle possède des activités anti-carcinogéniques, anti-inflammatoires, antivirales, antioxydantes, et psychostimulantes, et une capacité d'inhibitrice de la peroxydation lipidique, et stimulatrice de la biogenèse mitochondriale (Aguirre et al. 2011; Chirumbolo 2010). La Quercétine est une substance à effet anti-inflammatoire prolongé (Read 1995; Orsolčić et al. 2004) exprimé dans différents types cellulaires modèles, animal et humain (Manjeet K et Ghosh 1999; Chirumbolo 2010). Elle est connue par son pouvoir de stabilisation des mastocytes et son activité protectrice des cellules gastro-intestinales (Penissi et al. 2003). De plus, la quercétine exerce un effet immunosuppresseur sur la fonction des cellules dendritiques (R.-Y. Huang et al. 2010) en empêchant l'activation directe par TNF- α de certaines kinases comme l'extracellular signal-related kinase (ERK), la c-Jun NH₂-terminal kinase (JNK), ainsi que les facteurs nucléaires c-Jun, et nuclear factor- κ B (NF- κ B). Ces derniers sont des inducteurs forts de l'expression des gènes d'inflammation (S. Zhang et al. 2013). La quercétine peut également prévenir indirectement le processus d'inflammation par l'augmentation de l'activité de PPAR γ (Yao Li et al. 2016).

La quercétine peut jouer le rôle d'un agent antibactérien, antioxydant, et inhibiteur de la protéine kinase, agent antinéoplasique, éboueur des radicaux libres. Les groupes hydroxyles aux positions 5, 7, 3', 4'-hydroxyl sont capables de donner des électrons pour neutraliser les différentes espèces réactives d'oxygène (Psahoulia et al. 2007; Akram et al. 2015). L'administration de la quercétine par voie orale augmente le potentiel antioxydant chez des rat modèles d'ischémie-reperfusion (J.-F. Su et al. 2003). Généralement, trois critères sont

considérés comme fondamental pour évaluer le pouvoir antioxydant d'un flavonoïde *in vitro* : (i) un cycle B avec deux groupes hydroxyles (adjacents) ; (ii) un cycle C avec une double liaison C₂-C₃, un 4-oxo, et un groupe hydroxyle en position 3 ; et (iii) la présence d'un cycle A avec deux groupes hydroxyles C₅-C₇. Par conséquent, la quercétine remplit ces 3 critères, supposant un fort pouvoir antioxydant ((Salem 2009) (PubChem)) (**Figure 9**).

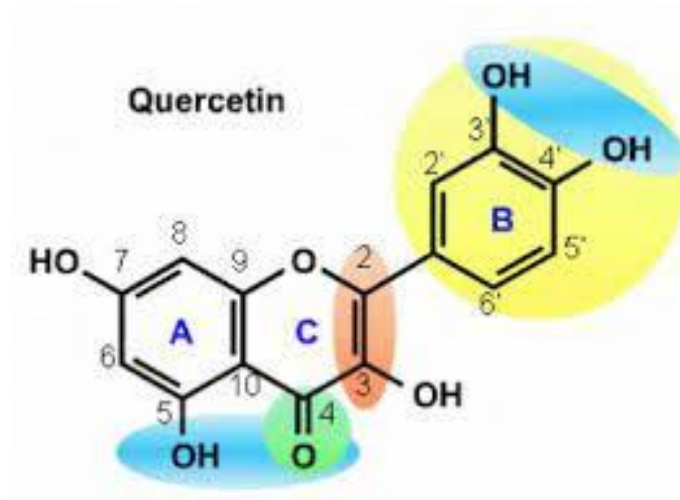


Figure 9. Eléments structuraux nécessaires à l'obtention d'une activité antioxydante (Salem 2009)

1.5.4.2.4. Le féruladéhyde (4-Hydroxy-3-méthoxycinnamaldehyde)

Le féruladéhyde (FA) (appelé encore aldéhyde de coniféryle ou 4-hydroxy-3-méthoxycinnamaldehyde), est un composé phénolique naturel trouvé dans différentes plantes médicinales comme *Salvia plebeai*, *Phyllanthus emblica*, *Diplomorpha canescens*, *Cinnamomum cebuense* et *Allophylus longipes* (Yao Zhang et al. 2016). Il a été démontré dans plusieurs études que ces plantes possèdent des activités anti-inflammatoires (Akram et al. 2015; Jung et al. 2009) , et en particulier le composé HMC a montré un effet anti-inflammatoire dans des modèles *in vivo* et *in vitro*, son mécanisme d'action diminue significativement l'expression de iNOS ainsi que la production de NO pendant le processus inflammatoire par l'inhibition de la voie de signalisation JAK2 (Janus kinase 2) -STAT1(Signal transducer and activator of transcription 1)-iNOS(oxyde nitrique synthase inductible) (Akram et al. 2016). L'effet antioxydant et anti-radicaux *in vitro* ont été rapportés dans plusieurs études (Weng et Wang 2000; Barclay et al. 1997; Potapovich et al. 2011) . L'induction des enzymes antioxydantes par des agents chimio-préventifs, permet de protéger les cellules des substances oxydantes

capables d'altérer l'intégrité de l'ADN et initier une carcinogénèse. Le férulaldéhyde possède un potentiel anti-mutagénique et antioxydant. L'activation de l'hème oxygénase-1 (HO-1) par FA permet de protéger les cellules contre les lésions induites par le stress oxydant. le FA induit la phosphorylation et la translocation nucléaire du *nuclear factor erythroid-2-related factor 2* (Nrf2) jouant un rôle critique dans la défense cellulaire avec la participation des voies de signalisation p38 MAPK et la protéine kinase C (H.-H. Chen et al. 2015).

1.5.4.2.5. Le Syringaldehyde

Le syringaldehyde (SA) est une molécule trouvée naturellement dans des plantes *Manihot esculenta* et *Magnolia officinalis* (Shen et al. 2009). Elle possède des propriétés antimicrobienne (Lv et al. 2019) et anti-diabétique (Friedman, Henika, et Mandrell 2003; Kuo et al. 2014; C.-H. Huang et al. 2012). Dans les neutrophiles, le SA montre un effet inhibiteur sur la formation des ROS et la production des myéloperoxydase (Van den Worm et al. 2001; Shahzad et al. 2020). De plus, il présente un effet anti-hyperglycémique dans le diabète induit par la streptozotocine chez le rat (C.-H. Huang et al. 2012). Ses capacités antioxydantes, et anti-inflammatoires (Dong et al. 2021) permettent d'inhiber l'action de la cyclooxygénase-2 (COX-2) dans les macrophages de souris (Stanikunaite et al. 2009). Les aliments riches en SA sont très bénéfiques sur la santé et permettent de soulager les endommagements des maladies cardiovasculaires induites par les ROS (Shahzad et al. 2018). Ainsi, le SA a un potentiel cardio-protecteur par sa capacité d'éliminer les ROS, la peroxydation lipidique, et l'inflammation dues aux altérations du muscle cardiaque (Shahzad et al. 2018). Autres études ont montré que grâce à ses effets anti-oxydants et anti-apoptotiques, le SA peut jouer un rôle neuroprotecteur au cas des lésions cérébrales causées par l'ischémie (Bozkurt et al. 2014).

1.5.4.2.6. La Vanilline

La vanilline (VA) possède des propriétés anti-inflammatoire, anticancéreuse, anti-apoptotique et antioxydante (Srinual et al. 2017; J. Liu et Mori 1993; Bezerra et al. 2016; Dhanalakshmi et al. 2015). La vanilline permet de réduire significativement la production de NO et des cytokines pro-inflammatoires, à l'exemple de l'interleukine (IL)-1 β , le TNF- α , et l'interleukine-6 (IL-6). Elle diminue également le taux de nitroxyde synthase inductible (iNOS) et la COX-2, ainsi que les taux des ARNm IL-1 β , TNF- α , et IL-6. Il inhibe également la phosphorylation des mitogen-activated protein kinases (MAPKs) et nuclear factor (NF)- κ B. La

vanilline peut jouer un rôle thérapeutique naturel contre les maladies neuroinflammatoires (M. E. Kim et al. 2019). L'effet antioxydant et antiinflammatoire de la vanilline permettent de protéger contre les altérations du tissu hépatique et la fibrose (Makni et al. 2011). Ce composé chimique est à l'origine de l'odeur et la saveur de la vanille. Il est utilisé pour lutter contre le sommeil et jouerait un rôle d'agent aphrodisiaque (Bythrow 2005). Son rôle chimio-préventif a été décrit dans plusieurs modèles de cancérogenèse chez le rat (Akagi et al. 1995) et préviendrait l'invasion et la migration des cellules cancéreuses (W.-Y. Cheng et al. 2008). Par ailleurs, elle peut aussi être utilisée dans le traitement de la drépanocytose (C. Zhang et al. 2004). De plus, la vanilline est capable d'inhiber l'activation de NF-kB et l'expression du gène codant pour la COX-2 induite par les lipopolysaccharides dans les macrophages de souris (Y. Murakami et al. 2007). Généralement, les enzymes antioxydantes comme la catalase et la SOD peuvent être désactivées par les peroxydes lipidiques ou les espèces réactives d'oxygène, mais la présence de la vanilline permet de moduler l'activité de ces enzymes antioxydantes dans le tissu hépatique. (Makni et al. 2011). Le mécanisme d'action de VA reposerait sur l'élimination du processus oxydatif de protéines et de lipides, et l'augmentation de l'expression des enzymes antioxydantes et l'inhibition des médiateurs de l'inflammation permettant ainsi le rétablissement des paramètres biologiques (Makni et al. 2011).

2. Le peroxysome

Le peroxysome un organite subcellulaire cytoplasmique de diamètre allant 0,1 à 1µm (Raas, Gondcaille, et al. 2019). C'est un organite ubiquitaire présent dans presque toutes les cellules eucaryotes. Il est composé d'une seule membrane constituée d'une bicouche phospholipidique entourant une matrice finement granulaire et homogène, possédant chez certains rongeurs un corps cristallin associé à la présence de l'activité de l'urate oxydase (Y Fujiki et al. 1982; Schrader et Fahimi 2008) (**Figure 10**). Découvert pour la première fois dans le rein de souris par microscopie électronique par Rhodin en 1954 (Rhodin 1954) et reconnu sous le nom de « *microbody* », puis isolé par de Duve et Baudhuin en 1966 à partir du foie de rat (de Duve et Baudhuin 1966). Le peroxysome comporte des centaines d'enzymes, en particulier des oxydases, participant à différentes voies cataboliques ou anaboliques (Yukio Fujiki 2016). Le nom peroxysome provient de leurs rôles dans le métabolisme du peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) (He et al. 2021). L'hétérogénéité du nombre, la taille, la morphologie, et les activités des peroxysomes dépendent particulièrement de la nature, l'âge, la fonction du type cellulaire, les signaux cellulaires et environnementaux qui sont en étroite communication

et coordination, notamment avec le réticulum endoplasmique, les gouttelettes lipidiques ou les mitochondries (He et al. 2021). Morphologiquement, les peroxysomes peuvent exister sous différentes formes, ronde ou allongée (“Dictionary - Cell: Peroxisomes - The Human Protein Atlas”).

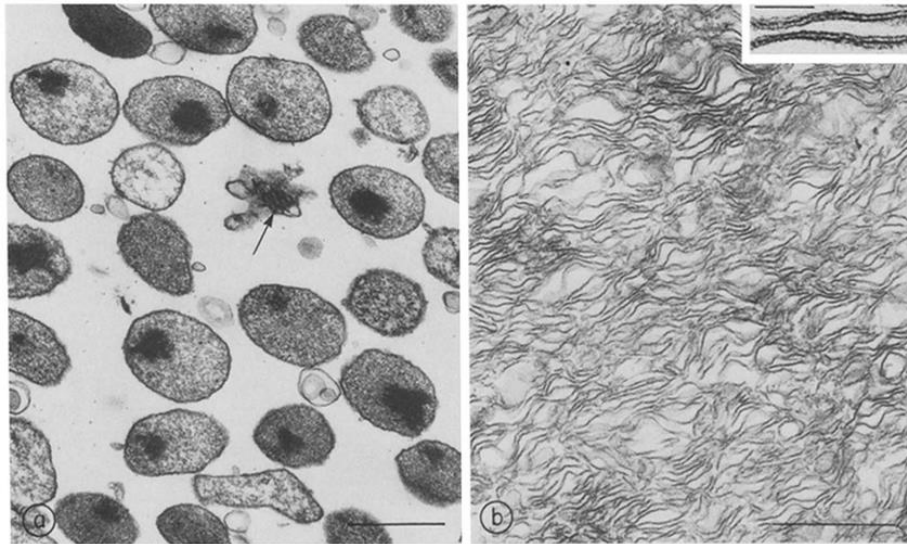


Figure 10: Micrographies électroniques de peroxysomes après purification (a) et les membranes peroxysomales préparées avec un traitement au carbonate de sodium (b), La flèche indique le noyau cristallin peroxysomal libre. Barre, 0.5 μ m. (a) x 48000. (b) x 65000. encadré : structure tri-laminaire de membranes isolées après traitement par du bicarbonate de sodium barre, 50 nm, x 212000 (Y Fujiki et al. 1982).

2.1. Fonctions peroxysomales

Longtemps appelés organites fossiles et considérés comme acteurs passifs de différentes réactions métaboliques (Schrader et Fahimi 2006). Comme la mitochondrie, le peroxysome remplit plusieurs fonctions au sein de la cellule. Des fonctions métaboliques telles que l’oxydation des acides gras (Schrader et Fahimi 2004), la régulation de l’homéostasie redox cellulaire, la synthèse de l’acide biliaire, le cholestérol et les plasmalogènes (Schrader et Fahimi 2008; Baarine et al. 2012; Brites et al. 2004). La β -oxydation des acides gras à très longue chaîne (AGTLC) se déroule exclusivement dans le peroxysome. Ce qui rend l’accumulation des AGTLC un biomarqueur clé pour diagnostiquer certains dysfonctionnements peroxysomaux (Stradomska 2018). Aujourd’hui, les peroxysomes sont considérés comme des organites dynamiques et polyvalents, et constituent un carrefour de voies de signalisation critiques qui intègre les signaux provenant des réactions métaboliques et communiquent avec d’autres organites pour répondre à divers facteurs de stress, notamment le stress oxydatif, l’hypoxie, le jeûne, le froid, le bruit et les agents pathogènes (He et al. 2021). Les ROS, l’acétyl-

CoA et les éther lipides, issus du métabolisme peroxysomal, jouent un rôle important dans la signalisation cellulaire et l'adaptation métabolique au stress. Les peroxysomes contrôlent l'hydrolyse de lipides et leurs mobilisations durant une restriction calorique grâce à leur habilité d'engager une interaction moléculaire avec d'autres organites et générer des métabolites de signalisation comme l'acétyl-CoA (He et al. 2021). Alors que les lipides générés par le peroxysome permettent de maintenir l'homéostasie cellulaire pendant le stress hypoxique, régulent la dynamique mitochondriale au cours de la thermogénèse induite par le froid et participent au contrôle de la réponse immunitaire innée face aux agents pathogènes infectieux (Ferreira et al. 2019). Les dysfonctionnements peroxysomaux sont à l'origine de maladies neurodégénératives. Ces dysfonctionnements concernent soit la biogenèse du peroxysome ou un déficit concernant une enzyme ou un transporteur peroxysomal soulignant l'importance fonctionnelle de cet organite.

Les fonctions connues du peroxysome peuvent être résumés comme suit :

- a) Rôle critique dans l'immunité innée,
- b) Métabolisme des ROS, génération et dégradation des peroxydes (une homéostasie médiée par ses deux activités enzymatiques liées aux oxydases et à la catalase) (Schrader et Fahimi 2008; Baarine et al. 2012),
- c) La métabolisation des acides gras à longues et très longues chaînes, ou le nombre de carbone est supérieur à 22 et les acides gras à chaînes branché (Schrader et Fahimi 2004; Wanders et Waterham 2006),
- d) Synthèse du plasmalogène et des facteurs d'activation des plaquettes sanguines,
- e) Détoxification des éléments chimiques par la superoxyde dismutase (SOD),
- f) La synthèse des lipides essentiels au cerveau, comme la myéline la gaine de neurones composée de 30% de protéines et 70% de lipides majoritairement du cholestérol et du sphingomyéline. (Harauz et al. 2004),
- g) Synthèse de l'acide docosahénoïque DHA (DHA,C22:6 n-3) et des plasmalogènes (nécessaires pour la croissance des cellules neuronales), ainsi que la participation aux premières étapes de la synthèse du cholestérol (Brites et al. 2004)

2.2. Régulation des fonctions peroxysomales

Depuis la découverte par Lazarow et de Duve en 1976 (Lazarow and de Duve 1976), d'une activité de β -oxydation des acides gras dans les peroxysomes purifiés de foie de rat, de

nombreuses études ont démontré sa présence dans divers tissus de différentes espèces, particulièrement au niveau hépatique et au niveau du cortex rénal (Yu et al. 1997). Chez les mammifères, la β -oxydation a lieu à la fois dans la mitochondrie et dans le peroxysome. La contribution de ce dernier organite à cette β -oxydation serait entre 10 à 30% dans le foie de rat (Grum et al. 1994; Mannaerts et al. 1979). Alors que, l' α -oxydation se déroule entièrement dans le peroxysome et permet la conversion nécessaire du 3-méthyl-acyl-CoA en 2-méthyl-acyl-CoA avant la β -oxydation de ce dernier (Schrader et Fahimi 2006). Chez l'homme, l' α -oxydation permet de convertir l'acide phytanique (acide 3,7,11,15-tétraméthylhexadécanoïque ; toxique pour les cellules) en acide pristanique (acide 2,6,10,14-tétraméthylpentadécanoïque) qui est ensuite dégradé par β -oxydation peroxysomale. La β -oxydation nécessite au préalable l'entrée et l'activation des acides gras par la transformation des acides gras en acyl coA une réaction catalysée par une acyl-coA synthétase. Une fois activés ces acyl-CoAs sont pris en charge par le transporteur ABC (ATP binding cassette) de la membrane peroxysomale pour leurs permettre de rejoindre la matrice peroxysomale. Les membres de la famille ABC permettent le passage de divers substrats à travers les membranes lipidiques grâce à la fixation et l'hydrolyse de l'ATP. Le cycle de dégradation des acides gras par β -oxydation est composé de 4 réactions, et chaque passage à travers ce cycle libère une molécule d'acétyl-CoA et une molécule d'acyl-CoA écourté de deux carbones produisant un FADH_2 et un NADH,H^+ par cycle de β -oxydation (Hashimoto 2000; Lazarow et de Duve 1976). Les acyl-CoA subissent par la suite plusieurs cycles de β -oxydation jusqu'à la formation d'un acyl-CoA à 8 atomes de carbone (octanoyl-CoA). Un cycle de β -oxydation consiste à une série de réactions enzymatiques catalysée par 3 enzymes (Hashimoto 2000) : l'acyl CoA oxydase, l'enzyme bifonctionnelle et la cétoacyl-CoA-thiolase conduisant à former à partir d'un acyl coA, un acyl coA raccourci de 2 atomes de carbones et une molécule d'acétyl-CoA. L'octanoyl-CoA qui résulte de ce catabolisme est transformé en carnitine octanoyl avant de sortir du peroxysome pour finir son oxydation dans la mitochondrie. Certains produits intermédiaires de la β -oxydation peroxysomale (par exemple le DHA-CoA) peuvent également être hydrolysés en AG et CoA par des thioestérases spécifiques avant de sortir du peroxysome pour rejoindre d'autres destinations (**Tableau 10**).

Chez l'homme et la souris, la protéine ACOX1 est codée par un seul gène localisé respectivement sur les chromosomes 17 et 11. Il est constitué de 15 exons et 14 introns avec 2 exons 3 nommés 3a et 3b (Varanasi et al. 1994; Ferdinandusse et al. 2007) (UCSC Genome Browser). L'épissage alternatif du pré-ARNm permet la synthèse de 2 isoformes d'ACOX1,

ACOX1a et ACOX1b avec une spécificité de substrat pour chacune des deux isoformes (David Oaxaca-Castillo et al. 2007; Vluggens et al. 2010). La protéine codée par ce gène est la première enzyme de la voie de β -oxydation, elle catalyse la réaction de déshydrogénation d'un acyl-CoA en une molécule de 2-trans-énoyl-CoA (**Tableau 10**), avec un transfert direct des électrons à une molécule d'oxygène, générant ainsi du peroxyde d'hydrogène.



Une altération d'expression de ce gène, cause de la pseudo-adrénoleucodystrophie néonatale, une maladie caractérisée par l'accumulation des acides gras à très longue chaîne (Arora et al. 2022).

Le gène *Acox1* est associé à 146 réactions dans 16 différents systèmes subcellulaires, présents dans les compartiments cellulaires : Cytosol, Mitochondrie, Noyau, Peroxysome. (The Human Protein Atlas).

Tableau 10: Les voies métaboliques associées au gène Acox1 présentes dans différents compartiments cellulaires avec le nombre de protéines, de métabolites et de réactions.

Voie métabolique	Compartiments cellulaires associés	Nombre de protéines	Nombre de métabolites	Nombre de réactions
β-oxydation des acides gras insaturés (n-9) (peroxysome)	Peroxysome	9	47	9
Métabolisme de l'acide arachidonique	Cytosol, Peroxysome, RE Extracellulaire, Noyau, Mitochondrie	108	87	6
β-oxydation d'acide gras (peroxysomale)	Peroxysome	9	59	12
β-oxydation de l'acide phytanique (peroxysomale)	Peroxysome, Cytosol	24	37	3
Réactions de transport	Cytosol, Extracellulaire, Lysosome, Peroxisome, Mitochondrie, Appareil de Golgi, RE, Noyau, Membrane mitochondriale interne	608	1603	2
Métabolisme de la Vitamine E	Mitochondrie, Cytosol, RE	55	68	13
Oxydation des acides gras	Cytosol, RE, Peroxysome, Mitochondrie, Extracellulaire	69	375	68
Métabolisme de Leucotriène	Peroxysome, Mitochondrie, Cytosol, RE, Noyau, Extracellulaire	206	105	11
Métabolisme des acides gras Omega 6	Cytosol, Mitochondrie, Peroxysome	39	56	4
Biosynthèse de l'acide biliaire	Peroxysome, RE, Cytosol, Mitochondrie, Extracellulaire	97	173	3

β-oxydation des AG insaturés (n-7) (peroxysomale)	Peroxysome	9	17	2
Métabolisme des médicaments	Cytosol, Mitochondrie, Peroxysome, Extracellulaire, RE	55	210	3
β-oxydation des acides gras polyinsaturés (mitochondriale)	Mitochondrie	11	34	4
Métabolisme des AG oméga3	Cytosol, Peroxysome, Noyau, RE	53	73	1
β-oxydation des acides gras di-insaturés (n-6) (peroxysomale)	Peroxysome	11	28	4
Autres	Cytosol, Mitochondrie, Extracellulaire, RE, Lysosome, Noyau, Peroxysome	94	138	1

Le gène ABCD1 est localisé sur le chromosome X bras q28 codant pour le transporteur peroxysomal ABC, appelé « protéine de l'adrénoleucodystrophie » ALDP, qui participe à l'entrée AGTLC-CoA dans le peroxysome.

Certains gènes codant pour des protéines de transport et de la β -oxydation peroxysomale des AG sont en effet fortement induit dans le foie des rongeurs par des proliférateurs de peroxysome et agissent en se fixant et en activant le récepteur nucléaire PPAR α (J. K. Reddy et Hashimoto 2001).

Mechanisms Mediating the Regulation of Peroxisomal Fatty Acid Beta-Oxidation by PPAR α

Mounia Tahri-Joutey^{1,2}, Pierre Andreoletti¹ , Sailesh Surapureddi³, Boubker Nasser², Mustapha Cherkaoui-Malki¹  and Norbert Latruffe^{1,*} 

¹ Bio-PeroxiL Laboratory, University of Bourgogne Franche-Comté, 21000 Dijon, France; mouniajoutey@gmail.com (M.T.-J.); pierre.andreoletti@u-bourgogne.fr (P.A.); malki@u-bourgogne.fr (M.C.-M.)

² Laboratory of Biochemistry, Neurosciences, Natural Resources and Environment, Faculty of Sciences & Techniques, University Hassan I, BP 577, 26000 Settat, Morocco; boubker.nasser@uhp.ac.ma

³ Office of Pollution Prevention and Toxics, United States Environmental Protection Agency, Washington, DC 20460, USA; surapureddi.sailesh@epa.gov

* Correspondence: Norbert.Latruffe@u-bourgogne.fr



Citation: Tahri-Joutey, M.; Andreoletti, P.; Surapureddi, S.; Nasser, B.; Cherkaoui-Malki, M.; Latruffe, N. Mechanisms Mediating the Regulation of Peroxisomal Fatty Acid Beta-Oxidation by PPAR α . *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, 8969. <https://doi.org/10.3390/ijms22168969>

Academic Editors:
Manuel Vázquez-Carrera and
Walter Wahli

Received: 9 July 2021

Accepted: 15 August 2021

Published: 20 August 2021

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2021 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 (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract: In mammalian cells, two cellular organelles, mitochondria and peroxisomes, share the ability to degrade fatty acid chains. Although each organelle harbors its own fatty acid β -oxidation pathway, a distinct mitochondrial system feeds the oxidative phosphorylation pathway for ATP synthesis. At the same time, the peroxisomal β -oxidation pathway participates in cellular thermogenesis. A scientific milestone in 1965 helped discover the hepatomegaly effect in rat liver by clofibrate, subsequently identified as a peroxisome proliferator in rodents and an activator of the peroxisomal fatty acid β -oxidation pathway. These peroxisome proliferators were later identified as activating ligands of Peroxisome Proliferator-Activated Receptor α (PPAR α), cloned in 1990. The ligand-activated heterodimer PPAR α /RXR α recognizes a DNA sequence, called PPRE (Peroxisome Proliferator Response Element), corresponding to two half-consensus hexanucleotide motifs, AGGTCA, separated by one nucleotide. Accordingly, the assembled complex containing PPRE/PPAR α /RXR α /ligands/Coregulators controls the expression of the genes involved in liver peroxisomal fatty acid β -oxidation. This review mobilizes a considerable number of findings that discuss miscellaneous axes, covering the detailed expression pattern of PPAR α in species and tissues, the lessons from several PPAR α KO mouse models and the modulation of PPAR α function by dietary micronutrients.

Keywords: PPAR α ; peroxisome; β -oxidation; PPRE; ligand; coregulator; micronutrients; PPAR α knockout

1. Introduction

As reported in the review by Latruffe and Vamecq [1], peroxisomes are ubiquitous, single membrane-bound organelles. They belong to the fundamental class of intracellular compartments named microbodies. According to the evolutionists, microbodies and eukaryotic cells appeared on Earth around 1.5 billion years ago. Based on their related cell origin, these organelles are defined as glycosomes, glyoxysomes, hydrogenosomes or peroxisomes. Peroxisomes are found in higher vertebrates; glycosomes exist only in trypanosomes; glyoxysomes are found in leaves and seeds; hydrogenosomes are found in anaerobic unicellular ciliates, flagellates, and fungi. The latter two microbody structures belong to lower eukaryotic species, and all these compartments metabolize hydrogen peroxide. According to the endosymbiotic theory, peroxisomes, mitochondria, and chloroplasts may have derived from free-living prokaryotic ancestors. Only mitochondria and chloroplasts are semi-autonomous organelles, containing a DNA genome, which encodes for just some of their proteins.

In the mammalian liver, very-long-chain-fatty acids (VLCFA) are exclusively shortened in peroxisome through a specific β -oxidation system. Then, shortened fatty acids are metabolized by mitochondrial β -oxidation. Peroxisomes also contain the first enzymatic steps of plasmalogen synthesis [1]. In addition, they are involved in maintaining a redox state through the NAD^+/NADH balance, linked to the pyruvate/lactate level. In 1965, a milestone was reached by Hess et al. [2] who described, for the first time, hepatomegaly induced by clofibrate (ethyl 2-(4-chlorophenoxy)-2-methylpropanoate) in rats, subsequently established as a peroxisome proliferator in rodents and an activator of the fatty acid peroxisomal β -oxidation [3]. Later, Isseman and Green [4] identified peroxisome proliferators (PPs) as activator ligands of a special class of nuclear receptors termed Peroxisome Proliferator-Activated Receptor α (PPAR α). Afterward, several PPAR isoforms were characterized as members of the superfamily of the nuclear steroid receptors. It is recognized that the phylogenetic origin of PPARs dates back 200 million years to the fish-mammalian divergence period [5]. PPARs evolved three times faster than other members of the hormone nuclear receptor superfamily, and are represented now in three isoforms (α , β/δ , and γ).

1. Peroxisomal β -Oxidation Systems

In mammalian cells, both mitochondria and peroxisomes can degrade fatty acid chains. Although each organelle harbors its own fatty acid β -oxidation pathway, only the distinct mitochondrial β -oxidation system feeds the oxidative phosphorylation pathway for ATP synthesis, while the peroxisomal β -oxidation pathway participates in cellular thermogenesis [6]. Historically, we owe the first description of the mammalian peroxisomal fatty acid β -oxidation system to Lazarow and de Duve (1976) [7]. Later, a second peroxisomal β -oxidation system was characterized [6]. However, the very-long-chain fatty acids, part of the long-chain class and long-chain dicarboxylic acids, are exclusively processed by the peroxisomal β -oxidation system, whereas other common long-chain fatty acids are oxidized by mitochondria [6,8]. The entry of fatty acids into peroxisome, and activation as acyl-CoAs, depend on ABC membrane transporters (ABCD subfamily) and very-long-chain acyl-CoA synthetases [9,10]. The first β -oxidation system comprises three enzymes: acyl-CoA oxidase 1 (ACOX1), multifunctional protein (L-bifunctional peroxisomal enzyme (L-PBE, also referred to as EHHADH or MFP-1) [11,12], and 3-ketoacyl-CoA thiolases [13] (Figure 1). These three enzymes catalyze four successive reactions, starting with the α,β -dehydrogenation by ACOX1 of the acyl-CoA into 2-trans-enoyl-CoA. L-PBE catalyzes enoyl-CoA hydration into L-3-hydroxyacyl-CoA, which is dehydrogenated, giving the 3-ketoacyl-CoA. Then, the 3-ketoacyl-CoA is subjected to a thiolytic cleavage by thiolase to produce one acetyl-CoA molecule and a two-carbon-shortened acyl-CoA [13] (Figure 1).

The second peroxisomal β -oxidation system (Figure 1), converting fatty carboxylates with a 2-methyl branch, such as pristanic acid and bile acid intermediates, includes the 2-methylacyl-CoA-specific oxidases (trihydroxycoprostanoyl-CoA oxidase and pristanoyl-CoA oxidase), the second multifunctional protein (named MFP-2) [11,14,15], and a 58 kDa sterol-carrier protein (SCP-2) containing thiolase activity [6,16] (Figure 1). Although both LBP/MFP-1 and DBP/MFP-2 provide hydratase and dehydrogenase activities, these proteins exhibit opposite stereospecificities. While LBP/MFP-1 hydrates 2-trans-enoyl-CoAs into L-3-hydroxyacyl-CoAs, and dehydrogenates the L-isomers [11,12], the DBP/MFP-2 transforms 2-trans-enoyl-CoAs into D-3-hydroxyacyl-CoA and dehydrogenates the D-isomers [6,11,14,15]. Despite the fact that the MFP enzymes are structurally unrelated to each other, both MFPs can hydrate 2-methyl-enoyl-CoAs [14]. The 3-hydroxy isomers formed by MFP-2 have the same (3R, 2R) configuration, or (24R, 25R) configuration in bile acid intermediates, underlining the role of MFP-2 in both pristanic acid degradation and bile acid synthesis [15]. Recently, it was demonstrated that LBP/MFP-1 is indispensable for the β -oxidation of dicarboxylic acids and the production of their medium-chain derivatives [6,15,17,18].

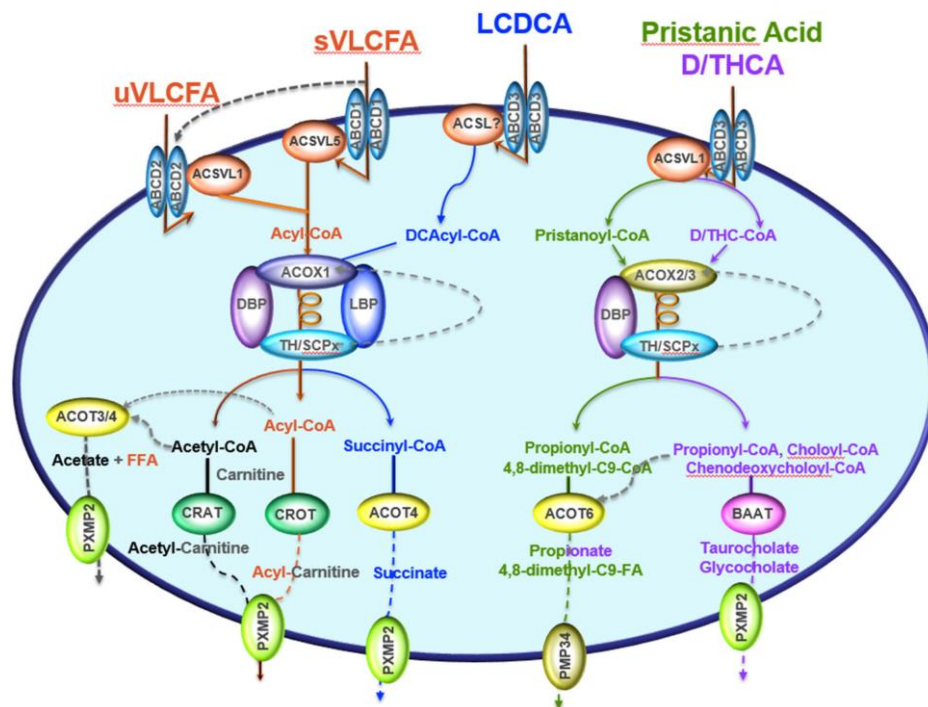


Figure 1. Peroxisomal β -oxidation pathways, including different enzymes and transporters. Saturated or unsaturated very-long-chain fatty acids (sVLCFA or uVLCFA) are imported by the solute ABC-transporters ABCD1 and ABCD2, respectively, into peroxisome, where they are transformed into their acyl-CoAs by one of the peroxisomal acyl-CoA synthetases (ACSVL5 for sVLCFA, and ACSVL1 for uVLCFA). The long-chain dicarboxylic acids (LCDCA), originating from the endoplasmic reticulum ω -oxidation, are imported by ABCD3 and activated to their acyl-CoA thioesters (DCAcyl-CoA) by an unknown acyl-CoA synthetase (ACSL?). The reactions that are catalyzed by ACSVL and ACSL use CoASH and hydrolyze ATP to AMP and pyrophosphate to activate VLCFA or LCDCA molecules, giving acyl-CoA. Acyl-CoA oxidase 1 (ACOX1) is the first flavoenzyme in the straight-chain β -oxidation system, oxidizing sVLCFA, uVLCFA, or LCDCA to their enoyl-CoA derivatives. The second enzyme metabolizing sVLCFA and uVLCFA is the D-bifunctional protein (also called MFP2 or HSD4B17), while the dicarboxylic enoyl-CoA are taken by the L-bifunctional enzyme (also called MFP1 or EHHADH). The thiolytic cleavage is catalyzed by one of the two peroxisomal thiolases (TH: thiolase/ACAA1/2 or SCPx: sterol carrier protein-x). After several rounds of β -oxidation, the peroxisomal system gives shortened acyl-CoA derivatives as hexanoyl- or octanoyl-CoA, and one molecule of acetyl-CoA/round. Both shortened acyl-CoA and acetyl-CoA can be hydrolyzed by acyl-CoA thioesterases 3 or 4 (ACOT3/4) to CoASH, while free fatty acid and acetate are exported by the pore-forming protein PXMP2 (or PMP22) to the cytosol. However, acetyl-CoA and acyl-CoA derivatives can also be transformed to acetyl-carnitine or acyl-carnitine by carnitine acetyl- and carnitine octanoyl transferases (CRAT and CROT), respectively, and then exported by PXMP2 to the cytosol. β -oxidation of DCAcyl-CoAs leads to the production of succinyl-CoA, hydrolyzed to succinate and CoASH by ACOT4, and shipped outside by peroxisome PXMP2. Bile acid intermediates, dihydroxycholestanoic acid (DHCA) and trihydroxycholestanoic acid (THCA), imported by ABCD3 transporter, are beta-oxidized by ACOX2, DBP and SCPx enzymes, leading to the formation of choloyl-CoA and chenodeoxycholoyl-CoA, which are conjugated to glycine or taurine by the bile acid-CoA: amino acid N- acyltransferase (BAAT) and then exported by PXMP2. D/THC-CoA indicate DHCA and THCA co-enzyme A thioesters.

Distinct carnitine transferases and thioesterase enzymes handle products created from the peroxisomal β -oxidation fatty acyl-CoA derivatives. Carnitine moiety is then transferred to the acyl-CoA or the acetyl-CoA by carnitine octanoyltransferase (CROT) or carnitine acetyltransferase (CRAT). On the other hand, a specific peroxisomal thioesterase can hydrolyze the acyl-CoA or the acetyl-CoA, giving a free fatty acid or acetate that can

be transported to the cytosol by the peroxisomal membrane solute transporters, such as PXMP2 or PMP34 (Figure 1) [19].

1. Peroxisome Proliferator Response Element, PPRE

PPAR α is an ultimate lipid sensor [20] that has the potential to orchestrate and prompt the expression of a plethora of target genes implicated in a broad range of fatty acid metabolism processes [21,22], particularly under conditions of fasting-induced lipolysis and a lipid-rich diet [23–25]. Indeed, PPAR α activates many enzymatic pathways involved in fatty acid uptake, intracellular transport [26,27], fatty acid activation and β -oxidation, lipogenesis, ketogenesis and lipoprotein/cholesterol metabolism [28]. As a member of the PPARs family, PPAR α regulates the target gene expression in a transcriptional manner through heterodimerization with another transcription factor, the retinoid X receptor (RXR) encoded by the *NR2B1* gene [29,30]. Once activated by a ligand in the ligand-binding domain (LBD), the dimer binds to a specific DNA sequence element, the peroxisome proliferator response element (PPRE), located in the promoter region of target genes, to modulate their expression [31]. It is noteworthy that this regulation can require the recruitment of coregulators [32–36]. The PPAR α response element is usually composed of a direct repeat 1 type (DR-1), which means two immediate repetitions of the hexanucleotide AGGTCA consensus sequence, spaced by one nucleotide [37] (Figure 2). PPAR α and RXR α bind the first and the second hexamer sequences, respectively. The sequence logo of the PPAR α /RXR α PPRE consensus sequence ATGTAGGTCAAAGGTCA from the MA1148.1 Jaspar matrix [38], and the associated percentage of the four nucleotides at each position, is presented in Figure 2.

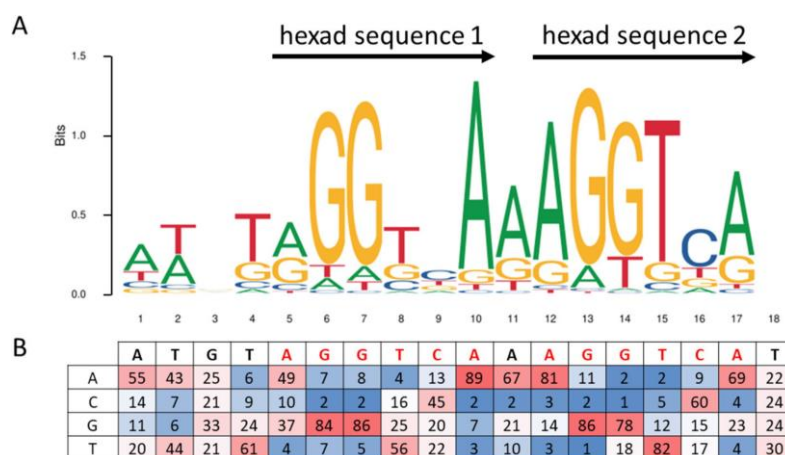


Figure 2. Sequence logo and consensus matrix of the PPAR α /RXR α PPRE consensus sequence from MA1148.1 Jaspar matrix [38]. (A) Sequence logo of the MA1148.1 Jaspar matrix, presenting the conservation of nucleotides from multiple alignments of 1000 PPAR α /RXR α PPRE sequences. Adenosine (A), cytosine (C), guanosine (G), and thymidine (T) nucleotides are respectively green-, blue-, yellow-, and red-colored, and the relative size of the letters represents their frequency in the consensus. The total height of a logo position corresponds to the degree of conservation in the corresponding multiple sequence alignment. (B) A table representing the percentage of the four bases for each position of the consensus. The color gradient code highlights the percentage of conservation of bases from blue to red for the whole table.

Among the hundreds of genes known to be regulated by PPAR α , eight are encoding enzymes that are commonly localized in the peroxisomal compartment (Figure 3), and belong to the three species: human, mouse, and rat. Table 1 presents validated PPREs sequences for functional genes, of which four (*Acox1*, *Ehhadh*, *Acaa1b*, and *Scp2*) are encoding very-long-chain fatty acid β -oxidation enzymes, and the remaining genes are *Cat*, encoding

the catalase enzyme, and *Mlycd* (malonyl-CoA decarboxylase gene), expressing an enzyme with both cytoplasmic and peroxisomal localization. The latter form is believed to be involved in the peroxisomal degradation of malonyl-CoA produced by odd-chain-length dicarboxylic fatty acid β -oxidation [39], and finally, the *Pex11a* gene, which participates particularly in peroxisome biogenesis (Pex11 α).

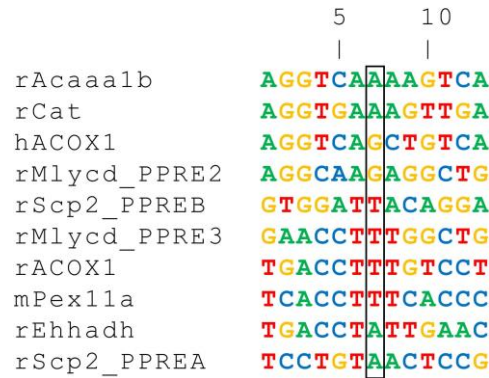


Figure 3. Multiple alignments of PPRE sequences, identified in peroxisomal gene promoters, and experimentally proved to be regulated through PPAR α binding. Adenosine (A), cytosine (C), guanosine (G) and thymidine (T) nucleotides are respectively green-, blue-, yellow- and red-colored.

Table 1. Peroxisomal genes experimentally proved to be regulated through the PPAR α binding to PPREs.

Gene	Protein	Species	PPRE ^a	PPRE Sequence ^b	Reference
<i>Acaaa1b</i>	acetyl-coenzyme A acyltransferase 1B	rat	PPRE2	<u>AGGTCAAAAAGTCA</u>	[40]
<i>ACOX1</i>	acyl-CoA oxidase 1	human	PPRE	<u>AGGTCAAGCTGTCA</u>	[41]
<i>Acox1</i>	acyl-CoA oxidase 1	rat	PPRE	<u>TGACCTTTGTCTT</u>	[36]
<i>Aldh3a2</i>	aldehyde dehydrogenase family 3, subfamily A2	mouse	PPRE	nd	[42]
<i>Cat</i>	catalase	rat	PPRE	<u>AGGTGAAAGTTGA</u>	[43]
<i>Ehhadh</i>	enoyl-CoA hydratase and 3-hydroxyacyl CoA dehydrogenase	rat	PPRE	<u>TGACCTATTGAAC</u>	[44]
<i>Mlycd</i>	malonyl-CoA decarboxylase	rat	PPRE-2	<u>AGGCAAGAGGCTG</u>	[45]
<i>Mlycd</i>	malonyl-CoA decarboxylase	rat	PPRE-3	<u>GAACCTTTGGCTG</u>	[45]
<i>Pex11a</i>	peroxisomal biogenesis factor 11 alpha	mouse	PPRE	<u>TCACCTTTCACCC</u>	[46]
<i>Scp2</i>	sterol carrier protein 2	rat	PPRE-A	<u>TCCTGTAACTCCG</u>	[47]
<i>Scp2</i>	sterol carrier protein 2	rat	PPRE-B	<u>GTGGATTACAGGA</u>	[47]

carbohydrate-lipid metabolism, cancer, inflammation, cell proliferation, and differentiation [55–58]. To sustain their protein stability and transcriptional activity, PPARs are subjected to post-translational modifications, such as phosphorylation [59], SUMOylation [60], and ubiquitylation [61]. PPARs act altogether in harmony, to maintain and control cellular and whole-body energy homeostasis by modulating the expression of their specific target genes [57].

The focus here will be on the PPAR α isoform. PPAR α is a type-II non-steroid ligand-regulated nuclear hormone receptor [4,32,62] transcribed from the human PPARA gene, which spans ~93.2 kb [53] and consists of eight exons [63]. It has been mapped to chromosome 15 in the mouse DNA and to chromosome 22 in humans [31]. The PPAR α protein possesses five main functional domains (A–F) embodied in a modular canonical structure [64] (Figure 4). The N-amino terminal end harbors the activation function-1 (AF-1) or A/B domain, which operates autonomously in a ligand-independent manner. The 65 amino acid-long DNA-binding domain (DBD), or C domain, consists of 2 highly conserved zinc finger-like motifs that promote the receptor’s binding to the PPRE sequence of the target genes. The D domain or hinge region that bridges the DBD to the ligand-binding domain (LBD) acts as a docking site for cofactors. In the C-terminal region, the LBD, or E/F domain, is responsible for ligand specificity and contains the activation function 2 (AF-2) [28,65]. This latter contains a tyrosine residue on the helix 12, which plays an ultimate role in interacting with the carboxyl group of the ligands [66]. When a ligand enters the LBD pocket of PPAR α , the interface of AF-2 stabilizes and facilitates so that PPAR α can recruit coactivators [67]. The LBD is still a center of interest in numerous pharmaceutical investigations. Recent publications to date on studies based on X-ray crystallography, referenced in the protein data bank website (PDB; <http://www.pdb.org/>, accessed on 1 July 2021), provide fascinating, detailed insight into the LBD domain structure, albeit limited to comparing it with other PPAR receptors. It describes a relatively large Y-shaped hydrophobic cavity in the PPAR α -LBD pocket volume of 1400 Å³ [68], which allows PPAR α to interact with a broad range of structurally distinct natural and synthetic ligands [67,69].

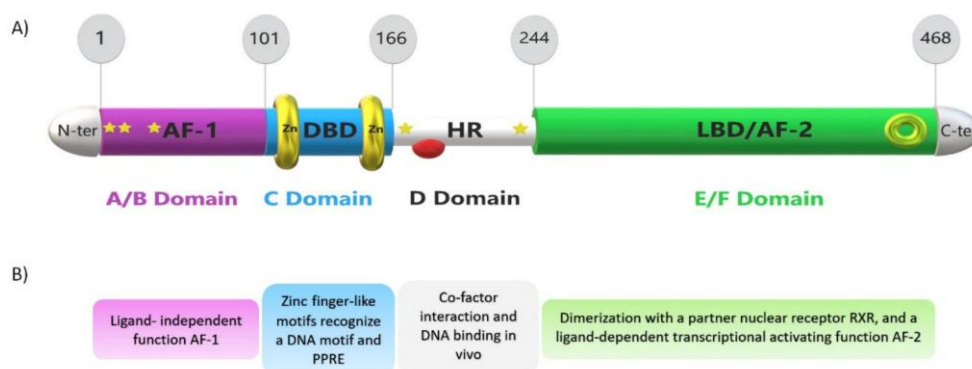


Figure 4. Schematic view of PPAR α structure and domain function, with phosphorylation and cofactor binding sites. From the left N-terminus to the right C-terminus of the PPAR α protein, (A) domain structure of the PPAR α protein with the ligand-independent activation function-1 (AF-1) domain or A/B domain shown in purple, the DNA-binding domain (DBD) or C domain shown in blue with two zinc finger-like motifs, the hinge region (HR) or D domain shown in white, and the ligand-binding domain (LBD) or E domain together with the activation function 2 (AF-2) or F domain shown in green. Phosphorylation sites are labeled with yellow stars (6, 12, 21, 179, 230) amino acids, the corepressor site is marked with a red half-sphere, and the coactivator binding site is shown with a green ring. The panels on top show the number of amino acid residues. (B) Structural function of A/B, C, D, and E/F domains, respectively.

1. PPAR α Ligands

Recently, PPAR α -ligands have gained consistent interest in several complex metabolic disease investigations [60,67], such as lipid metabolism disorders. Due to their engagement in physiological and pathophysiological metabolic processes, and their role in activating transcriptional regulatory networks, these ligands are becoming intriguing bona fide treatment opportunities and present a way to unveil many relevant potential roles of PPAR α , also known as promising versatile drug targets.

Evidence indicates that a wide variety of lipophilic molecules, the so-called ligands, can activate PPAR α , encompassing natural saturated, unsaturated, and polyunsaturated fatty acids (PUFAs) [70,71], and synthetic ligands that are collectively referred to as PPAR α -activators [72].

1.1. PPAR α Natural Ligands

Natural ligands include endogenous metabolites products derived from the lipid metabolism, such as acyl CoAs [73,74], oxidized fatty acids [63], phospholipids [75], certain nitrated derivatives of fatty acids, eicosanoids [76], endocannabinoid-like molecules [77], and lipoprotein lipolytic products [78]. PPAR α natural activators could also originate from an exogenous source that is either found in dietary constituents [65], e.g., dietary ω -3 polyunsaturated fatty acids (docosahexaenoic acid and eicosapentaenoic acid) or issuing from traditionally used medicinal plants (reviewed by Rigano et al. [79]) (Figure 5).

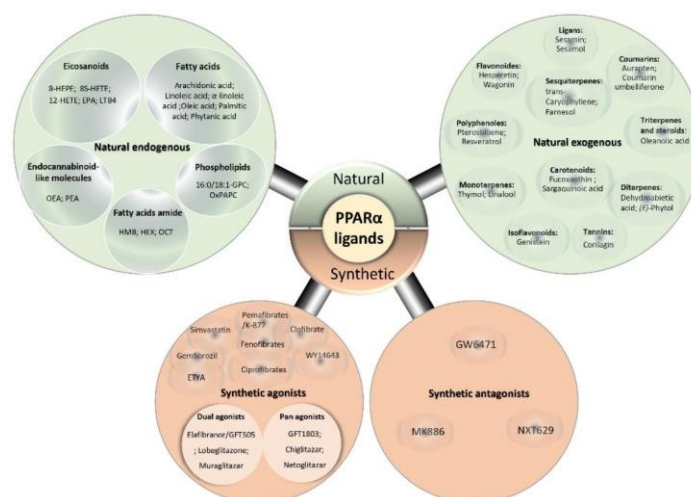


Figure 5. Diagram of different types and classes of PPAR α ligands. The natural ligands type encompasses endogenous natural ligands (fatty acids [28,80–82], eicosanoids [31,83–85], phospholipids [75,86], fatty-acid amide [87] and endocannabinoid-like molecules [77], and exogenous natural ligands [30,88] (polyphenol flavonoids, isoflavonoids, monoterpenes, sesquiterpenes, diterpenes, triterpenes and steroids, carotenoids, coumarins, ligans, and tannins). The synthetic ligands type includes various classes of synthetic agonists [28,31,62,67,69,88–91] with various activation and binding modes (single [88,92], dual [28,91,93,94] and pan agonists [28,92]), and synthetic antagonists [89,90,95]. Abbreviations: 8-HEPE: 8-hydroxyeicosapentaenoic acid, 12-HETE: 12-hydroxyeicosatetraenoic acid, 8S-HETE: 8 (S)-hydroxyeicosatetraenoic acids, 16:0/18:1-GPC: phosphatidylcholine(1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycerol-3-phosphocholine), EPA: eicosapentaenoic acid (20:5), ETYA: eicosatetraenoic acid, HEX: hexadecanamide, HMB: 3-hydroxy-(2,2)-dimethyl butyrate, OCT:9-octadecenamide, OEA: oleoyl-ethanolamide, OxPAPC: oxidized 1-palmitoyl-2-arachidonoyl-sn-glycero-3-phosphocholine, PEA: palmitoyl-ethanolamine.

Numerous findings provide evidence that natural ligands exhibit different binding affinities, which subsequently impact PPAR α activation potency. Previous reports showed that omega-3 eicosapentaenoic acid (20:5, ω 3) and, to a lesser extent, docosahexaenoic acid (22:6, ω 3), are potent ligands [96,97] and consistent activators of PPAR α [98–100], while omega-3 PUFA like linolenic acid (C18:3, ω 3) and docosapentaenoic (22:5, ω 3) acids, and omega-6 PUFA such as linoleic (C18:2, ω 6) and arachidonic (C20:4, ω 6) acids are weaker PPAR α activators [74,99,100]. In addition, experiments performed by Ellinghaus et al. and Zomer et al. [101,102] revealed that phytanic acid (3,7,11,15-tertamethylhexadecanoic acid) is a strong natural physiological ligand for PPAR α . These assumptions were then followed by reports from Hostetler et al. [103], showing that PPAR α binds the fatty acyl-CoAs (3–20 nM Kds) and branched-chain fatty acyl-CoA (BCFA-CoAs, phytanoyl-CoA, pristanoyl-CoA; Kds near 11 nM) with the highest affinities (i.e., Kd at nM range).

Natural PPAR α ligands description studies, using full-length- or chimeric LBD-PPAR α constructs, revealed the ability of many saturated and unsaturated fatty acids to activate target gene expression through PPAR α modulation. Several PPAR α -responsive genes are involved in fatty acid oxidation: (i) mitochondrial β -oxidation pathway (i.e., carnitine palmitoyltransferase 1A) [104]; (ii) microsomal ω -hydroxylation (i.e., CYP4A1-subclass of cytochrome P450 enzymes); and (iii) peroxisomal β -oxidation pathway (i.e., ACOX1; enoyl-CoA hydratase/3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase [105], 3-ketoacyl-CoA Thiolase and SCPx) [7,106,107].

The abovementioned results were recently supported by Chen et al. [108], reporting that feeding animals a diet high in rapeseed oil (rich in erucic acid, a very-long-chain fatty acid) leads to PPAR α activation with an adaptive elevation in peroxisomal β -oxidation capacity, which suggested that erucic acid might act as a potential ligand for PPAR α . In line with prior communicated data, Maheshwari et al. [109] reported that treating rat Fao cells with a fungal lipid extract rich in monomethyl BCFAs (*Conidiobolus heterosporous*) increases mRNA levels of the PPAR α target genes *Acox1*, *Cyp4a1*, *Cpt1A*, and *Slc22A5*, strongly suggesting that BCFAs are similarly potent PPAR α activators [109]. Taken together, these relevant results from our laboratory and from others all affirm that the peroxisomal β -oxidation substrates are potent PPAR α ligands that modulate the expression of a battery of lipid-metabolizing enzymes to maintain lipid homeostasis and to alleviate the toxic effect of VLCFA and BCFA overload [57].

1.1. PPAR α Synthetic Ligands

In the same way, PPAR α binds to synthetic ligands termed PPAR α activators. Interestingly, PPAR α -activators exhibit structural features like a carboxylic acid head and a hydrophobic tail, connected via an aliphatic chain and a central aromatic ring [101]. This group of compounds includes various insecticides (2,4-dichlorophenoxyacetic acid); herbicides (phenoxyacetate derivatives) [110]; surfactants (perfluorooctanoic acid-PFOA); organic chlorinated hydrocarbons solvents such as perchloroethylene and trichloroethylene [111]; food flavors [112]; leukotriene D4 receptor antagonists [113]; phthalate plasticizers, such as di-(2-ethylhexyl)-phthalate and di-(2-ethylhexyl) adipate [114]; and amphipathic carboxylic acids [98]. The latter form the hypolipidemic fibrate class of drugs, acknowledged as the archetypal PPAR α agonists, including clofibrates [88,89]; pema fibrates [67,69]; fenofibrates [67], and ciprofibrates [115]. It is notable that certain synthetic ligands are designed to act as dual agonists, like muraglitazar [93], that target both PPAR α and PPAR γ isotypes; others act as pan-agonists that activate all PPAR receptors like bezafibrates [92]; or as a PPAR α partial agonist such as GW9662 [69], known as a PPAR γ -selective antagonist (Figure 5). Interestingly, GW9662 displays dual effects by acting as agonist and antagonist against PPAR α and also has the ability to enhance agonistic activities of certain less potent fibrates [69], whereas PPAR α antagonists like GW6471 [89], MK886 [90], and NXT629 [95] represent the rare range of synthetic ligands that prevent other molecules from binding to this nuclear receptor.

To date, various synthetic single, dual and pan agonists, respectively, are in clinical use as medications to treat dyslipidemia, hyperglycemia in patients with Type 2 diabetes mellitus, hypertriglyceridemia, and cardiovascular disease [28,72,91]. Indeed, potent synthetic ligands could elicit both desirable and undesirable side effects. Studies conducted by Preiss et al. [116] proved that the chronic administration of peroxisome proliferators to rodents causes hepatocellular carcinoma, and it may also increase the risk of gallstones and cause anemia and leukopenia [117]. Much of what we know about PPAR α -ligands comes from a collective knowledge primarily derived from rodent studies, via the treatment of mice or rats with synthetic PPAR α peroxisome proliferators or by using PPAR α null mice [98]. It has been reported that human and mouse PPAR α have different binding affinities and physiological effects [118] and are diversely activated by specific ligands, including phthalates and fibrates [119]. Nevertheless, these differences are negligible and do not call into question the tenet of the ultimate role that PPAR α plays as a general lipid sensor in both species [98].

To date, tremendous efforts are in progress to develop new, highly PPAR α -specific ligands with different activation and binding modes that could more selectively activate PPAR α -RXR α transcriptional complex assembly, with tissue-selective and gene-selective activities, to reduce unwanted side effects and assure reasonable safety. In parallel, the “micronutrients” found in food that activate PPAR receptors are gaining increasing interest, as nutritional therapy becomes an unstoppable trend for treating lipid disorders [79].

1. PPAR α and Coregulators

The identification of PPAR in the 1990s heralded a new era of biotic and xenobiotic sensing by the liver [4]. The PPAR subfamily of nuclear receptors functions as sensors for fatty acids and fatty acid derivatives and controls critical metabolic pathways involved in lipid and energy metabolism [120,121] and catabolism [122–125]. The transcriptional activation of genes is a complex process that involves the participation of many transcription factors [126]. While the nuclear receptors (NRs) mediated gene-regulation provide the backbone for the transcription factor-specific gene regulation, coregulators provide the much-needed tissue-, cell-, and species-specific differences in the peroxisome proliferator-induced pleiotropic responses of PPAR α [127,128]. However, we would like to focus this review section on the role of PPAR α and its associated proteins in regulating peroxisomal beta-oxidation genes/pathways. Coregulators are proteins that bind to the nuclear receptor by a specific domain LXXLL, a hallmark for all coregulators [129]. Most coregulators have more than one LXXLL domain and are essential for protein–protein interactions between the nuclear receptor and the coregulator [130] (Figure 6). Moreover, each LXXLL could function in a specific nuclear interaction, suggesting that the coregulators are shared between different NRs.

Coregulators can be broadly classified into subgroups, such as essential vs. non-essential, repressors vs. activators, and DNA binding region (DBD) vs. ligand binding-region (LBD) interacting coregulators [127]. Essential coregulators are proteins deemed critical for the survival of the offspring, and their absence results in embryonic lethality: cAMP-response element-binding protein (CBP); PPAR-interacting protein/activating signal cointegrator 2 (PRIP/ASC2); PPAR-binding protein/mediator complex subunit 1 (PBP/Med1); mediator complex subunit 25 (Med25) [131–133]. Non-essential coregulators are proteins with such critical functional responsibilities that they are usually represented by more than one isoform—steroid receptor coactivators (SRCs) [131,132,134], Asp-Glu-Ala-Asp (DEAD)-box helicases [135–137], sirtuins (SIRT) [96,97], PPAR γ coactivators (PGCs) [138–141]—and the loss of one isoform is compensated by others. Repressors that bind to the nuclear receptor PPAR α in the absence of/or independent of ligands prevent it from binding to the peroxisomal proliferator response elements (PPRE) of the target genes as nuclear corepressor (NCoR) and silencing mediator of retinoic acid and thyroid hormone (SMRT) [96] (Figure 7A). This group of proteins usually bind to the AF-1 domain of the DNA binding region of the receptor. The ligand-independent coregulators (heat-

shock protein-70) could also prevent the PPAR α from proteolytic degradation in the cytosol before PPAR α could translocate to the nucleus in the activated state [131] and, typically, these proteins bind to the hinge region of the nuclear receptor that interconnects the DNA binding region to the ligand-binding region of the receptor [127]. The activators, on the other hand, could help PPAR α zero in onto the specific PPREs of the target genomic region, help attach it to the PPREs with the assistance of nucleosomal-specific functions such as histone methylases (SRC proteins) [142], histone acetyltransferases (CBP/p300) [143,144], DNA-helicases [145], PRIC285 [124], and PRIC320 [146]. The activators would also function by stabilizing the transcriptional complex (PRIP/ASC2 [147]) and potentiate the recruitment of RNA-polymerase complex proteins to the transitional complex (mediator complex, PBP [148,149] (Figure 7B). Additionally, the activators would consist of proteins responsible for separating the transcribed mRNA from the genomic region (protein-L-isoaspartate (D-aspartate) O-methyltransferase (PIMT) [147]. These proteins activate the AF-2 domain of the nuclear receptor and enhance transcription by linking the liganded nuclear receptor to the basal transcription machinery. We have identified almost all these groups of coregulators using either a direct protein-protein interaction assay, such as a yeast two-hybrid assay [150], GST-pull downs [124], and ligand affinity chromatography [141] to identify the PPAR α -interacting proteins and a functional transcriptional activation complex [131]. PPARs, like other nuclear receptors, interact with coactivators such as SRC-1 (steroid receptor coactivator-1) or corepressors such as NCoR and SMRT. PPAR α -interacting coactivators and corepressors augment or repress, respectively, the PPAR α transactivation activity. Since the cloning of SRC-1 twenty-five years ago, over 300 coactivators/coregulators have been identified, with new members still being added to this expanding spectrum. PPAR α is known to interact with some of these coregulators [151]. These include CBP/p300-dependent binding complex [152], members of the SRC/p160 superfamily, members of PBP/MED1 complex (PBP/TRAP220/DRIP205/MED1 [133,149,153], members of PRIP/NCoA6 (ASC2/RAP250/TRBP/NRC), members of PRIC complex PRIC285 [124], PRIC295 [141], PRIC320 [146], PPAR gamma-binding proteins, PGC-1 α [147,154], and PGC-1 β [155,156], as well as coactivator-associated proteins PIMT [131] (NCoA6IP) and coactivator-associated arginine methyltransferase 1 (CARM-1) [157,158]. The PPAR α -interacting coregulator (PRIC) complex isolated from rat liver nuclear extracts reveals many coregulators, presumably forming one mega-complex. An almost similar complex was isolated with ciprofibrate as the ligand in affinity chromatography. This diversity raises several issues about the evolutionary importance of the versatility and complexity of coregulatory molecules, their relative abundance in various cell types, and their affinity for a given nuclear receptor in orchestrating transcription in gene-, cell-, and developmental stage-specific transcription. In the absence of a specific ligand, PPAR α interacts with the corepressors NCoR and SMRT, but the importance of PPAR α action is not well documented, as endogenous ligands could potentially activate PPAR α [159]. The homozygous deletion of NCoR or SMRT in mice is embryonically lethal, indicating that they cannot fully compensate for each other during development [160–162]. Furthermore, another corepressor, the receptor-interacting protein 140 (RIP140), which can interact with PPAR α , is known to repress the activity of NRs by competing with coactivators and by recruiting downstream effectors such as histone deacetylases (HDACs) [163]. Interestingly, the phenotype of RIP140 knockout mice suggests a role for this corepressor in PPAR α signaling, as these mice exhibit resistance to high-fat diet-induced obesity, resulting from the upregulation of genes involved in energy dissipation [163]. Interestingly, hepatic sirtuin 1 (SIRT1) regulates lipid homeostasis by positively regulating PPAR α [164,165]. On the other hand, SIRT1 interacts with PPAR γ and is regulated by PPAR γ in a negative feedback mechanism [166]. SIRT6 binds NCOA2, a PPAR α coactivator and part of the SRC family of coactivators; the binding results in the decrease of the acetylation of SRC2/NCOA2 K780 in the liver, thus, interaction with SIRT6 mediates the activation of PPAR α and thus the inhibition of SREBP-dependent cholesterol and triglyceride synthesis [167]. The ligand binding to a nuclear receptor triggers a molecular switch that releases corepressors and begins the

recruitment of coactivator complexes, such as members of the CBP/p300 family, which exhibit the histone acetyltransferase activity required to facilitate chromatin remodeling. The subsequent recruitment of other coregulators, either singly or as preassembled multi-subunit protein complexes, including mediator complex and RNA polymerase machinery, is facilitated by the interaction of the general basal transcription machinery to enhance the transcription of a specific set of genes [97,168]. As discussed previously, coregulators contain an LXXLL motif that forms two turns of the α -helix and binds to a hydrophobic cleft on the surface of the nuclear receptor. The identification and characterization of coregulators have been derived mostly from in vitro experiments, but there is a paucity of information about individual coactivators in vivo cell- and gene-specific functional roles [131].

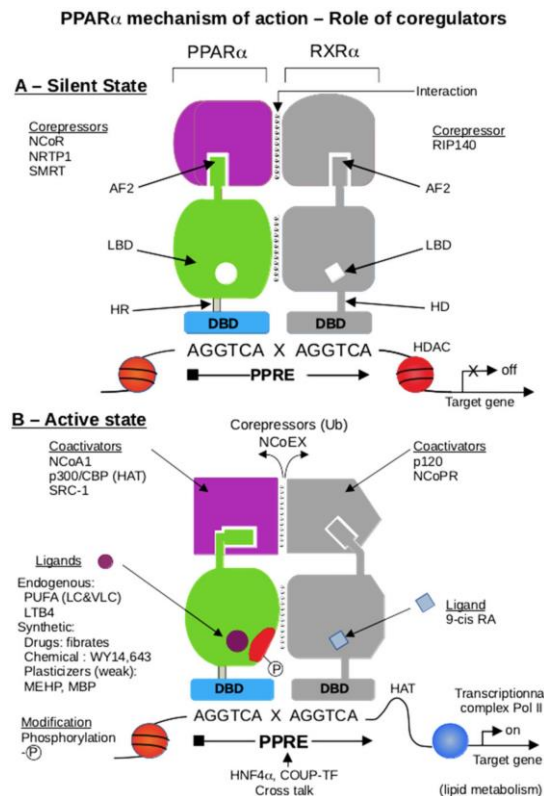
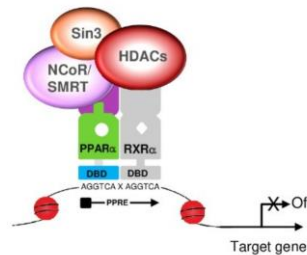


Figure 6. Scheme of heterodimer PPAR α /RXR α , located on a PPRE DNA region. The graphic displays two parts: part (A), the silent state, and part (B), the active state. Part (A). In the absence of the ligand, PPAR α interacts with transcriptional corepressors (NCoR, SMRT, NRTR-P-1) by recognizing the AF2 region. The same process is at the RXR, where AF2 interacts with RIP140 as RXR α corepressor [169]. Due to the chromatin condensed state, the heterodimer cannot bind the PPRE properly. Part (B). In the presence of a PPAR α ligand, either a long-chain or very-long-chain polyunsaturated fatty acid, leukotriene LTB4, fibrate or other chemicals [170], and a 9-cis retinoic acid as RXR α ligand, an exchange corepressor/coactivator is made by NCoEX, which suppresses the repressive of corepressor state by ubiquitinylation-inducing degradation by the proteasome system. The fixation of a ligand induces an allosteric LBD conformational change of AF2, allowing the recruitment of coactivators, either NCoR1, p300/CBP, or SRC1 for PPAR α , and p120 and NCoPR for RXR α [171]. The CBP-dependent HAT activity induces the remodeling of chromatin and allows the PPAR α /RXR α heterodimer to bind to PPRE correctly, then activates the Pol II transcription complex and triggers the transcription of lipid metabolism-encoding genes. Some post-translational

modifications of PPAR α regulate its activity [172,173]. For instance, phosphorylation stimulates PPAR α transcriptional activity [174]. The HNF4 α transcription factor recognizes a similar response element as the PPRE and interplay with PPAR α [175]. A comparable mechanism has been reported with the Coup-TF transcription factor. While several works consider PGC-1 α [176] as an important coregulator of PPAR α , it seems to be more specific for PPAR γ . The 15(S)-HETE, 15-hydroxyicosatetraenoic acid, family of arachidonic acid metabolites; 9-cisRA, retinoic acid cis conformation in carbon 9; AF1, activating domain 1; AF2, activating domain 2; CBP, CREBP binding protein; CoPRs, COPR1 and COPR2 as corepressors of PPAR and RXR, respectively; COUP-TF, chicken ovalbumin upstream promoter transcription factor; CTBP-2, C-terminal binding protein-2; DBD, DNA binding domain; HAT, histone acetyl-transferase; HD, hinge domain; HNF-4 α , hepatic nuclear factor 4 α ; HDAC, histone de-acetyl transferase; LBD, ligand binding domain; LTB4, leukotrien B4; MBP, mono butyl phthalate; MEHP, mono ethyl hexyl phthalate; NCoA1, nuclear receptor coactivator 1; NCoEX, nuclear receptor corepressor Excit; NCoR1, nuclear receptor corepressor 1; NRTP-1, nuclear repressor transcription factor; p120, protein 120 kDa; p300, protein 300 kDa; Pol II, RNA polymerase class II; PGC-1 α PPAR γ co-activator-1 α ; PPRE, peroxisome proliferator response element; PRIP/RAP250, PPAR interacting-protein methyl transferase; PUFA (LC & VLC), polyunsaturated fatty acids (long-chain or very-long-chain); RIP140 receptor interacting protein corepressor; SMRT, silencing mediator of retinoid and thyroid receptors; SRC1, steroid receptor coactivator-1.

A: Corepressor complex



B : Coactivator complex

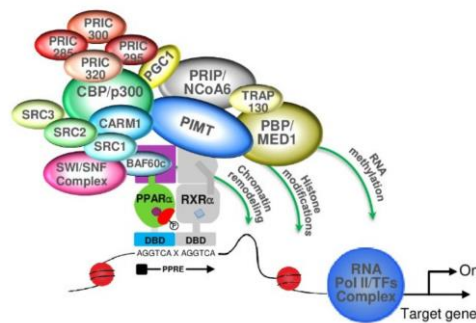


Figure 7. Interaction of PPAR α -RXR α heterodimer with corepressor complex (A) or coactivator complex (B). (A) The corepressor complex, including Sin 3, NCoR/SMRT, and HDAC proteins, is recruited to an unliganded PPAR α -RXR α heterodimer, so there is no transcription of the PPAR α -target genes. (B) in the presence of PPAR α -ligand, the PPAR α -RXR α heterodimer exhibits a conformational change, leading to the dissociation of the corepressor complex, the recruitment of coactivator proteins, and the binding of PPAR α to the peroxisome proliferator response element (PPRE). Different subcomplex modules participate in chromatin remodeling, through the acetylation (SRCs, p300) and the methylation (CARM1) of nucleosomes. Mediator components interact with PPAR α and promote the recruitment of the basal transcription factors (TFs) to establish a connection with the RNA polymerase II to transcription of PPAR α -target genes.

1. Metabolic Regulation of the Peroxisomal β -Oxidation Pathways

The regulation of the peroxisomal pathways is mainly associated with the cellular increase of the peroxisome population, which is highly promoted by several diverse natural and synthetic compounds nominated as peroxisome proliferators (PPs). Such compounds raise a peroxisome number quantitatively, mainly in hepatic parenchymal cells, and provoke delayed pleiotropic responses, including the development of hepatocarcinoma in rats and mice [8,131]. Based on several pieces of experimental evidence, earlier reports from Reddy's group proposed a receptor-mediated mechanism to explain the phenomenon of hepatic peroxisome proliferation. Accordingly, the induction of peroxisomal β -oxidation is a consequence of ligand hepatic overload, leading to lipid metabolism dysregulation, accompanied by an augmentation in the extrahepatic lipolysis and a substantial hepatic influx of free fatty acids [96]. Furthermore, the unique pleiotropic responses raised by structurally unrelated peroxisome proliferators in hepatocytes drive a synchronized transcriptional activation of the peroxisomal β -oxidation genes [13,96,131].

Lazarow and De Duve [7] demonstrated previously that clofibrate administration in rat liver strikingly enhances the peroxisomal β -oxidation activity. A similar observation was reported by Hashimoto and coworkers [177], showing that feeding a diet containing a phthalate ester plasticizer di-(2-ethylhexyl)phthalate, a PPAR α activator, leads to a 20-fold increase in the expression of peroxisomal β -oxidation enzymes in rat liver. In addition, a previous study reported that synthetic ligands such as WY-14643 exhibited a high affinity to PPAR α , compared to the natural endogenous ligand (16:0/18:1-GPC) in the induction of fatty acid β -oxidation [75]. Moreover, Rogue et al. [93] showed that *Acox1* and *Cpt1A* genes in oleic-acid-overloaded HepaRG cells were significantly upregulated from 1 day, and remained at high levels after 14 days, upon treatment with the dual agonist muraglitazar, which stimulates the fatty acid β -oxidation pathway. These results are in close concordance with previous experiments conducted by Lee et al. [126], showing that after feeding hypolipidemic agents to mice lacking PPAR α expression, the mutant animals accumulated lipid droplets in their tissues, which strongly supports the idea that PPAR α activators promote the transcription of genes involved in the lipid catabolism process.

Structurally, PPs molecules may be chemically unrelated, including hypolipidemic drugs, such as clofibrate, ciprofibrate, gemfibrozil, and Wy-14,643, as well as some nutritional conditions, especially high-fat diet or vitamin E-deficient diet and leukotriene D4 receptor antagonists. In addition, several herbicides, such as 2,4-dichlorophenoxyacetic acid or 4-chloro-2-methylphenoxyacetic acid [8,178] and certain phthalate ester plasticizers, induce a similar liver peroxisome proliferation as do prototypic fibrate derivatives. In addition, the administration to rodents of a C19-steroid, dehydroepiandrosterone, promotes peroxisomal fatty acid β -oxidation and peroxisome proliferation [179]. Though the response to PPs has been demonstrated in several tissues from PPs-treated rodents, the hepatic responsiveness is by far the most powerful, accounting for a 10- to 20-fold induction of peroxisomal fatty acid β -oxidation activities, accompanied by a proliferation of peroxisomes and strong hepatomegaly pathogenesis [8,131].

The description of PPAR α -target genes shows that this nuclear hormone receptor largely governs those genes involved in hepatic and cardiac muscle transport, oxidation, and the degradation of lipids. Transcriptionally, PPAR α activates several genes, including the lipoprotein lipase gene permitting the release of fatty acids from lipoprotein particles [180], genes encoding fatty acid translocase CD36, and fatty acid-binding protein- facilitating fatty acids capture and transport them through the plasma membrane [8,180]. The acyl-CoA synthetase, activating fatty acids to acyl-CoAs, is another gene-target of PPAR α [96,98]. Regarding the genes encoding peroxisomal β -oxidation enzymes, the induction of the peroxisomal fatty acyl-CoA ABC transporter D2 (ALDRP) by PPs was shown to be partially PPAR α -dependent in mice hepatocytes [179]; however, the regulation of, e.g., ACOX1, L-PBE and ThB, are entirely reliant on PPAR α [8,98,181]. Nevertheless, the regulation of genes implicated in the mitochondrial fatty acid β -oxidation, including the carnitine palmitoyltransferase-1 and the medium chain-acyl-CoA dehydrogenase, is also

coordinated by PPAR α [98,182,183]. Thus, PPAR α arises as a master regulator controlling the hepatic metabolism of free fatty acids. The development of PPAR α null mice evidenced the crucial role played by PPAR α in the concerted regulation of peroxisome proliferation and expression of its target genes involved in both β - and ω -fatty acid oxidations [181]. By contrast to *Ppara*^{-/-} mice, which exhibit mild hepatic steatosis, *Acox1* null mice develop strong hepatic steatosis, showing a hepatic peroxisome proliferation and the sustained activation of PPAR α and expression of its target genes [147,184]. Thus, paradoxically, the defect in ACOX1 activity leads to the hepatic accumulation of ACOX1 substrates, of which some have been shown [147] as efficient endogenous PPAR α ligands, mediating the sustained activation of PPAR α . On the other hand, the strong PPAR α activation of fatty acid β -oxidation genes increases hepatic dicarboxylic acid production and accumulation. Thus, in the absence of ACOX1 activity, these dicarboxylic acids are still unmetabolized and act as firm inhibitors of mitochondrial fatty acid β -oxidation [185]. Moreover, the *Ppara*^{-/-}; *Acox1*^{-/-} double-knockout mice exhibit a few periportal clusters of steatotic hepatocytes, and (re-)expression of human *ACOX1* in mice liver results in a substantial reduction in both PPAR α activation and hepatic steatosis [8,180]. Peroxisomal fatty acid β -oxidation is induced by starvation in a PPAR α -dependent manner, as validated by its impairment in PPAR α null mice [8,180]. Accordingly, the deacetylase sirtuin-1 is dispensable to PPAR α -inducing peroxisomal fatty acid β -oxidation and needs SIRT1-PPAR α interaction, and the deletion of hepatic SIRT1 negatively impacts PPAR α signaling [165]. The MAP kinase kinase kinase TGF β -activated kinase 1 (TAK1) acts upstream to PPAR α , and its deletion also impaired the PPAR α -dependent induction of peroxisomal fatty acid β -oxidation [186]. PPAR α signaling has also been shown to involve the AMPK-SIRT1-PGC-1 α axis via the adiponectin receptors [187] (Figure 8). These results strongly highlight the detrimental role of the peroxisomal β -oxidation pathway in the sensing of PPAR α activity.

Several peroxisomal β -oxidation substrates display a substantial role as PPAR α modulators. It is believed that the activities of (inducible and non-inducible) peroxisomal fatty acid β -oxidation systems are modulated by PPAR α [108]. Moreover, several findings provide significant evidence that VLCFA and BCFA, which are considered potentially toxic fatty acids, are potent inducers of PPAR α that enhance the transcription of peroxisomal enzymes mediating fatty acid β -oxidation [57,188].

Interestingly, Oleoylethanolamide, a naturally occurring lipid regulating satiety and body weight, exhibited a high-affinity binding to PPAR α and the activation of its lipid-metabolizing target genes [189]. Nonetheless, we should consider that most fatty acids are subject to elongation, desaturation, esterification, and β -oxidation, which could modify the availability of PPAR α ligands. Accordingly, very-long-chain saturated and unsaturated fatty acids are exclusively metabolized by peroxisomal β -oxidation, which participates in their degradation, synthesis, or retro conversion. One defect in this pathway is associated with the accumulation of VLCFAs and a deficit in certain PUFAs' synthesis, such as DHA. Interestingly, a mouse deficiency of ACOX1, the rate-limiting enzyme in the peroxisomal β -oxidation, leads to the sustained activation of hepatic PPAR α and the induction of its target genes [190]. The role of ACOX1 in PPAR α lipid sensing was highlighted by *Acox1*^{-/-}; *ob/ob* double knockout mice. Thus, the sustained activation of PPAR α when linked to the absence of ACOX1 activity attenuates the metabolic consequences of leptin deficiency, due to the *ob/ob* genotype, showing less obesity with the recovery of glucose homeostasis and alleviating insulin resistance [131,147]. Collectively, accumulated data underline the key role of peroxisomal β -oxidation in sensing PPAR α -dependent lipid and energy metabolism.

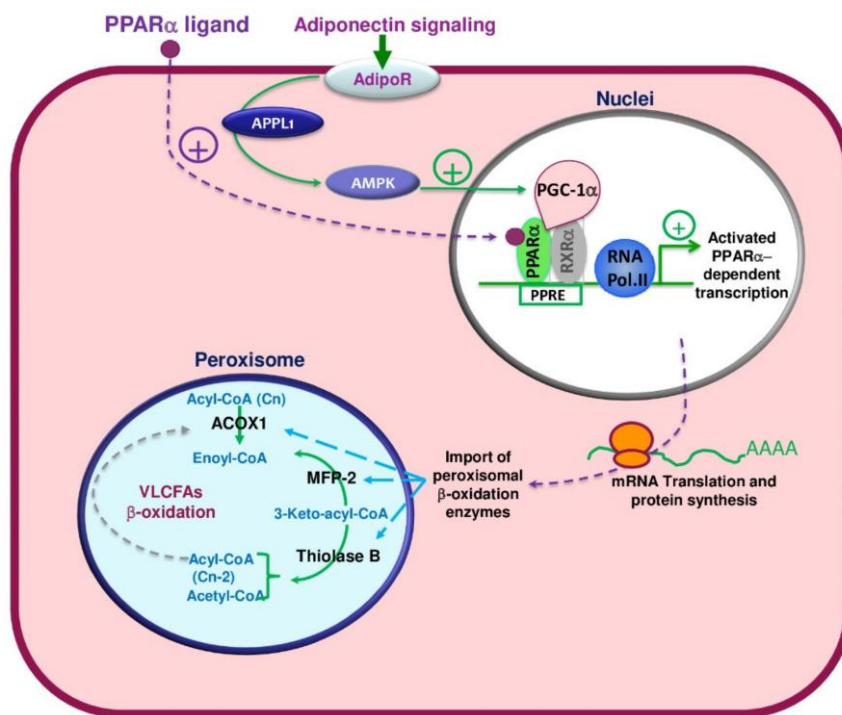


Figure 8. PPAR α -dependent regulation of peroxisomal fatty acid β -oxidation in rat liver through adiponectin signaling. Adiponectin: a hormone produced by adipose tissue that plays a role in lipid and glucose metabolism regulation; AdipoR, adiponectin receptor; APPL1, an adaptor protein containing a PH domain, PTB domain, and leucine zipper motif 1, plays a central role as the main contributing factor in the adiponectin and insulin signaling; AMPK, AMP kinase; PGC1- α , PPAR γ coactivator1 α ; PPRE, peroxisome proliferator-activated receptor; RNA Pol. II, RNA-polymerase II; ACOX1, acyl-CoA oxidase 1; MFP2, multifunctional protein 2; thiolase B, 3-ketoacyl-CoA thiolase B; VLCFA, very-long-chain fatty acid.

1. PPAR α Expression in Species and Tissue Distribution

1.1. PPAR α Expression in Different Species

PPAR is ubiquitous among animal species, i.e., worms [191], insects, fish, frogs [192], reptiles, mammals, including hamsters [193], and humans. A PPAR β subtype was detected in zebrafish. This PPAR β mutant shows lower expression in liver and visceral mass, which were associated with lipid accumulation [194]. In a jerboa (*Jaculus orientalis*) liver, both active wild-type PPAR α (PPAR α 1 wt) and a truncated PPAR α 2 forms were expressed. The availability of active PPAR α 1 wt is differentially regulated during fasting-associated hibernation [195].

1.2. PPAR α Tissue Distribution

PPAR α tissue expression is also ubiquitous, although on a different level. PPAR α is mainly expressed in tissues with high rates of fatty acid catabolism, i.e., those involved in digestive function (liver, stomach, enterocytes) and muscular activity (heart, skeletal muscle, kidney at proximal tubules). In the nervous system, the expression is moderated (low in retinal, or lacking expression in the central nervous system). Low expression is found in the pancreas and adipose tissue [196], while in the brain, PPAR α is found at the highest levels in neurons, followed by astrocytes, and is weakly expressed in microglia [62,197]—more likely, to upregulate the expression of several synaptic related genes coding proteins engaged in excitatory neurotransmission and the neuroprotective mechanism [198–200]. In the immune system, PPAR α expression is detected in the spleen, monocytes/macrophages,

and neutrophils [201]. In addition, expression is seen in reproductive organs and the epidermis. PPAR α is also associated with tumorigenesis in colorectal carcinoma [202]. Concerning the expression in developmental tissue in rats, *Ppara* transcripts are detectable in mouse embryo at 13.5 gestation days, to reach the maximum level at birth [203].

1.1. Lessons from *Ppara* Knockout

This part of the manuscript provides recent findings from the last five years related to *Ppara* knockout animals, with the intent of disentangling the PPAR α 's various biological functions in health and disease and to evaluate its engagement in fatty acid catabolism and clearance in liver and heart tissues, where PPAR α and FAO are both abundant. A growing body of evidence indicates that PPAR α is a crucial regulator of systemic lipid metabolism. PPAR α deficiency is considered to be a prime factor that either causes or exacerbates fatty acid metabolism impairment, which leads inevitably to the development of numerous metabolic diseases, to name but a few—obesity [204,205], type 2 diabetes mellitus, insulin resistance, dyslipidemia, myocardial infarction, hepatic steatosis without ethanol consumption, termed non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD), which includes severe phenotypes such as non-alcoholic steatohepatitis (NASH), liver fibrosis, and hepatocellular carcinoma [206–210]. Therefore, many investigations were conducted using mainly PPAR α knockout mouse models, because of the relative equivalent expression of *Ppara* mRNA between mice and humans in different tissues [98]. Knockout animal models are generated either with the global (*Ppara*^{-/-}) or hepatocyte-specific abrogation of the *Ppara* gene, such as *Ppara*^{Hep-/-} (reviewed by Wang et al. [181]). The goal was to identify the pathophysiological mechanisms underlying the abnormal phenotypes associated with PPAR α dysfunction and to assess the distinct contribution of hepatic and extrahepatic PPAR α to global energy and immune system homeostasis in vivo.

1.2. Lessons from *Ppara*-KO in the Liver

Hepatic PPAR α activation occurs during suckling [211], with a high-fat diet, and during fasting [212–214], boosting fatty acid oxidation (FAO), which participates in the restoration of energy homeostasis and provides energy supply for the extrahepatic tissues. For that reason, most of the studies were focused on hepatic PPAR α . Furthermore, hepatic PPAR α can protect the liver against fasting/high-fat diet-induced steatosis, by transactivating the genes required for fatty acid catabolism and repressing several inflammatory genes. Thus, during the fasting process, metabolic substrates stored in white adipose tissue are released into the circulation and captured by the liver. Subsequently, this increases β -oxidation and ketogenesis to maintain the energy balance [212]. It was observed that fasted *Ppara*^{-/-} and *Ppara*^{Hep-/-} mice developed hypoketonemia, hypoglycemia, and hypothermia with decreased serum triglycerides. Additionally, the ectopic accumulation of medium-chain fatty acids and long-chain fatty acids in the liver manifests as an increase of hepatic fat mass, termed steatosis, with pronounced oxidative stress and lipid peroxidation compared to wild-type mouse liver. These effects result from the altered mitochondrial and peroxisomal fatty acid β -oxidation pathways in the liver [212,214,215]. Furthermore, mice in which *Ppara* was deleted uniquely in hepatocytes could not modulate bone marrow monocyte egress upon fasting [216], suggesting that PPAR α contributes to the regulation of monocyte homeostasis during fasting.

Regarding high-fat diet (HFD)-induced obesity, mice with the hepatocyte-specific deletion of *Ppara* develop steatosis and inflammation [217]. These observations corroborate previous results communicated by Stec and al. [205], showing that *Ppara*^{Hep-/-} mice on HFD had worsened hepatic inflammation associated with steatosis, and exhibited high levels of LDL, which is considered an emerging risk factor for cardiovascular disease in NAFLD. PPAR α could also protect against obesity. In *ob/ob* obese mice, the absence of PPAR α resulted in increased obesity and led to severe hepatic steatosis [184]. Interestingly, mice lacking only hepatocyte-PPAR α developed steatosis spontaneously but without obesity in aging [212,214]. Indeed, extrahepatic PPAR α activity blunts and compensates

when hepatic PPAR α is disrupted, by elevating FAO and lipase activity in other tissues to increase and utilize excess lipid, thus maintaining lipid homeostasis [215]. Likewise, the transcriptome, lipidome, and metabolome results communicated by Régnier et al. and Batatinha et al. [217,218] demonstrate the significant contribution of extrahepatic PPAR α activity to the metabolic homeostasis response to HFD consumption. By using double-knockout mice, *Ppara*⁻¹/*Cyp2a5*⁻¹, Chen et al. [108,206] together indicate that PPAR α interacts with CYP2a5 (cytochrome P450 2A5) an antioxidant enzyme to protect against steatosis. Fibroblast growth factor 21 (FGF21) acts as a downstream molecule of the PPAR α signaling pathway to regulate the liver lipid metabolism and contribute to the CYP2a5 protective effects on alcoholic fatty liver disease [206]. In an experiment conducted by Brocker et al. [219], it was observed that treatment with WY-14643, a PPAR α agonist, caused weight loss and severe hepatomegaly in WT and *Ppara* ^{Δ Mac} mice but not in *Ppara*^{Hep-1} and *Ppara*⁻¹ mice, suggesting that cell proliferation is mediated exclusively by PPAR α activation in hepatocytes in response to WY-14643 agonist treatment.

Pparab is one of the two *Ppara* paralogs, highly expressed in zebrafish tissues with high oxidative activity. Li and coworkers generated *Pparab-knockout* in the zebrafish model [194]. *Pparab*-null zebrafish demonstrated a lower expression of critical enzymes involved in FAO, and lower mitochondrial and peroxisomal FAO in the liver and muscle, associated with lipid accumulation in the liver. Furthermore, PPAR α deficiency increases glucose oxidation, protein synthesis, and reduced amino acid breakdown, while in rodents, the loss of PPAR α increases amino acid breakdown [194].

1.1. Lessons from *Ppara*-KO in the Heart

PPAR α is a crucial regulator of substrate utilization in the heart. Fatty acids are a primary energy source for the heart, and fatty acid β -oxidation provides almost 70% of cardiac ATP; the remainder is obtained primarily from glycolysis and lactate oxidation [220]. Thus, *Ppara* KO mice, in response to chronic pressure overload, exhibit enhanced cardiac dysfunction. In contrast, mild PPAR α activation in mice showed a positive effect on myocardial energetic functions, especially during progressive and pressure-overloaded heart failure, revealing the virtue of PPAR α -associated FAO modulation as a promising therapeutic strategy for heart failure [221]. In addition, *Ppara* ablation exacerbated myocardial ischemia-reperfusion injury in *Ppara* KO mice models subjected to cardiac ischemia-reperfusion, and interestingly, after the treatment with PEA microparticles (PEA-um[®], 10 mg/Kg), an endogenous PPAR α ligand, only *Ppara* WT mice showed the cardioprotective effect of PEA-um[®], but not in *Ppara* KO mice. Although PEA-um[®] had a protective and beneficial effect on inflammatory disorders associated with ischemic myocardial failure, it also negatively regulates inflammation through PPAR α activation by reducing the activation of the nuclear factor- κ B (NF- κ B) pathway and production of pro-inflammatory cytokines [222]. Thus, PPAR α could augment heart function and cardiac fatty acid oxidation, whereas in the *Ppara* KO mouse model, a more severe sepsis phenotype is observed due to deteriorated cardiac performance and fatty acid oxidation, associated with both a hyperinflammatory cytokine storm as well as immune paralysis [223]. Furthermore, during sepsis, WT hearts showed a decrease in PPAR α and other FAO genes' mRNA expression, and this reduction was more dramatic in *Ppara*-null mouse hearts [223]. Taken together, PPAR α expression increased fatty acid oxidation and subsequently supported the hyperdynamic cardiac response early during sepsis or pressure-overloaded heart failure, which may prevent morbidity and mortality.

2. PPAR α and Micronutrients

As reported above, PPAR α is activated by different ligands of both natural and synthetic origins, involved in several signaling and metabolic pathways. Some natural ligands are issued from the lipid metabolism, such as PUFAs and their derivatives. Interestingly, micronutrients, such as minerals, vitamins, phytophenols, and phytosterols are non-energetic compounds with essential signaling activity. Of particular interest, polyphenols, oil prod-

ucts, and some terpenoids and alkaloids impact cell functions through the modulation of PPAR α activity.

1. Effect of Polyphenols, Known as Antioxidants and Anti-Aging Compounds

1.1. Resveratrol

Resveratrol, or 3,4',5-trihydroxystilbene, is a natural polyphenol present in large amounts in Japanese knotweed (*Polygonum cuspidatum*) root. This phytoalexin is produced by a wide variety of plants, some of which are edible for humans, such as grapes, blackberries, blackcurrants, blueberries, and cranberries, to name but a few [224]. However, in the last two decades, the effect of resveratrol on animal models related to several disorders, such as autism spectrum disorder, mitochondrial myopathies, type 2 diabetic nephropathy, or renal lipotoxicity has been increasingly reported.

The effect of resveratrol in the presence of quercetin has been studied on PPAR α -mediating uncoupling protein regulation in visceral white adipose tissue from metabolic syndrome rats. Resveratrol treatment leads to a significantly increased expression of both *Ppara* mRNA and protein levels [225]. Remarkably, resveratrol prevents renal lipotoxicity in a high-fat diet-treated mouse model by regulating the PPAR α pathway, enhancing the expression of lipolytic genes, and raising the renal PPAR α protein level and AMPK phosphorylation level [226]. Due to known dyslipidemia in autism spectrum disorders, PPARs have been proposed as therapeutic targets of resveratrol. Furthermore, in autism, impaired mitochondrial fatty acid oxidation suggests the potential implications for regulating mitochondrial oxidation flux by PPAR activators, especially resveratrol [227].

Numerous natural ligands, including polyphenolic compounds, control the expression of PPAR receptors [228]. They have several health-promoting properties, including antioxidant, anti-inflammatory, and antineoplastic activities. Resveratrol is an active biological modulator of several signaling proteins, including PPAR α . Resveratrol activates the AMPK-SIRT1-PGC-1 α axis and PPAR α via the adiponectin receptors in the renal cortex [187]. Adiponectin has multiple functions, including insulin sensitization and lipid metabolism regulation. Similarly, in mitochondrial myopathy, resveratrol has been shown to potentially target many mitochondrial metabolic pathways comprising fatty acid β -oxidation and oxidative phosphorylation, leading to the up-regulation of the energy supply via AMPkinase-SIRT1-PGC-1 α signaling pathways [229].

1.2. Quercetin

Quercetin (2-(3,4-dihydroxyphenyl)-3,5,7-trihydroxy-4H-chromen-4-one) is a flavonoid polyphenol found in plants and a variety of other natural sources—red grape, onion, broccoli, tomatoes and lettuce [224]. PPAR α is significantly upregulated and enhances β -oxidation by mulberry-leaf powder containing quercetin [230]. Quercetin-3-O- β -D-glucuronide (Q3GA) ameliorates dyslipidemia in fatty livers by modulating the PPAR α /sterol regulatory element-binding protein-1c (SREBP-1c) signaling. Q3GA reduced lipogenesis through downregulation of SREBP-1c and fatty acid synthase levels, and raised lipolysis and fatty acid oxidation by increasing the expression of PPAR α , carnitine palmitoyl-transferase1 and medium-chain acyl-coenzyme A dehydrogenase, both in vivo and in vitro [231].

1.3. EGCG (Epigallocatechin-3-Gallate)

Epigallocatechin-3-gallate (EGCG) is catechin conjugated with gallic acid. It belongs to the flavonol class and is found abundantly in green tea [232] and cocoa, which have the highest content of catechins, followed by prune juice, broad bean pods, and argan oil [224].

EGCG and green tea polyphenol extract display crosstalk with PPAR α . Reported studies in cancer cells revealed that EGCG induced the expression level of PPAR α protein in a dose-dependent manner. Clofibrate, a PPAR α agonist, blocks heme oxygenase-1 (HO-1) induction and sensitizes cancer cells to EGCG-promoted cell death. Moreover, PPAR α interacts with the PPRE of the HO-1 promoter. The activation of PPAR α sensitizes cancer cells to epigallocatechin-3-gallate (EGCG) treatment by suppressing HO-1 expression [233].

In rats, green tea polyphenols reduce the renal oxidative stress induced by a high-fat diet through deacetylation of SIRT3 mediated by PPAR α upregulation [234].

1.1. Curcumin

Curcumin (1,7-bis-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-hepta-1,6-diene-3,5-dione) belongs to a chemical class of polyphenols that is extracted from the rhizomes of the turmeric plant (*Curcuma longa*) [224]. Tetrahydro-curcumin improves oleic acid-induced hepatic steatosis and ameliorates insulin resistance in HepG2 cells, likely through downregulation of the expression of the lipogenic proteins, SREBP-1c and PPAR γ , and the stimulation of lipolysis by upregulating PPAR α and CPT-1a, which are involved in fatty acid β -oxidation [235].

1.2. Anthocyanins

Among berries, blueberries contain higher amounts of anthocyanins. These polyphenols are known to exhibit hypolipidemic properties. Rimando et al. reported that both anthocyanins and catechins do not activate PPAR α , while pterostilbene revealed the dose-dependent activation of PPAR α in H4IIEC3 hepatocytes [236]. In addition, pterostilbene showed a significant increase in *Ppara* gene expression, but at a lower extent than fenofibrate [236]. Although pterostilbene and resveratrol, as PPAR α activators, are under the threshold for effective concentrations in blueberry extract, hepatic mRNA *Ppara* expression has increased in hamsters fed on a diet containing blueberry extract [236].

1.3. Coffee

Coffee consumption has been shown to upregulate mouse hepatic PPAR α expression and its target-gene *Acox1*, consequently leading to the induction of liver peroxisomal fatty acid β -oxidation. Such FAO induction, with induced intestinal cholesterol efflux and reduced lipid digestion, prevents the high-fat diet-induced fatty liver through the lipid-sensing modulation of the gut–liver axis [237].

1.4. Edible Oil Products

The effect of polyphenols has been investigated in a rat model of bowel disease by 3 months diet supplementation with extra-virgin olive oil with a high or low phenolic content [238]. The presence of polyphenols in olive oil significantly attenuates the intestinal inflammation associated with hypocholesterolemia and the induction of PPAR- α gene expression in the liver [238]. In a model of insulin resistance of rats fed a high-fat diet, the administration of the major metabolite of oleuropein, hydroxytyrosol, increases the hepatic mRNA levels of *Ppara* and its target genes, i.e., fibroblast growth factor 21 and carnitine palmitoyltransferase 1a [239]. Similarly, mice receiving a high-fat diet develop hepatic steatosis and inflammation, which were attenuated by hydroxytyrosol supplementation through PPAR α activation, Nrf2 (nuclear factor, erythroid 2 like 2) mediated-antioxidative pathway, and by the downregulation of NF- κ B-associated inflammation [240]. Used as food supplementation, argan oil or olive oil was shown to restore the expression of genes involved in liver mitochondrial and peroxisomal fatty acid β -oxidation and gluconeogenesis in the mice sepsis model when injected with lipopolysaccharides. This preventive effect of argan oil likely involves the hepatic upregulation of PPAR α , PGC-1 α , and the estrogen-related receptor α [241].

Likewise, ginsenoside Rb3 micronutrients, derived from ginseng, or nuciferine, found in *Nelumbo nucifera* leaves, was shown to activate the PPAR α pathway by regulating energy metabolism in cardiomyocytes [242], or hepatic steatosis diabetic streptozocin-induced mice fed a high-fat diet [243], while bilobetin, a biflavonoid, modulates PPAR α activity by PKA-dependent phosphorylation. Finally, berberine, an alkaloid, binds PPAR α LBD with a hypolipidemic effect and a comparable affinity to fenofibrate [244].

1. Conclusions and Future Directions

In all these tested situations, irrespective of the tissue, animal, or pathological condition, micronutrients appear to have an advantageous effect on *Ppara* expression and activity. Furthermore, almost all these compounds are potent antioxidants and can activate signaling pathways via PGC1- α and AMP kinase. Numerous natural products might modulate PPAR α , including terpenes, polyketides, phenylpropanoids, polyphenols, and alkaloids; for instance, the linalool effect is ten times less compared to fenofibrate [88], demonstrating the potential beneficial effects of dietary micro-components to modulate PPAR α functions desirably in a population with an ever-increasing high-fat diet consumption. The question is the dietary relevance of these effects, since most of the data were obtained from in vitro studies, and secondly, these micronutrients are often present at very low doses in the diet, except for some polyphenols.

Despite tremendous signs of progress on the critical role of PPAR α -dependent regulation in lipid metabolism, the characterization of peroxisomal enzymes and transporters, there are still gaps that need to be filled to fully define the exact role and regulation of PPAR α and peroxisomal fatty acid β -oxidation in the cellular homeostasis of lipid metabolism. Particular attention needs to be focused on:

1. The shuttling of substrates and cofactors from and into peroxisome.
2. What is the exact role of peroxisomal β -oxidation in lipid metabolism and cell signaling?
3. How can peroxisome be a mediator and responder of metabolic and environmental stresses?
4. What are the molecular events that are required at the metabolic level?
 - (a) Does heterodimerization of PPAR/RXR control the regulation? Is it controlled by coregulators?
 - (b) What is the nature of ligands?
 - (c) What is the nature of micronutrients? Are they natural agonists or antagonists or their balance?
 - (d) Is PPAR α the only nuclear receptor governing peroxisomal β -oxidation-related genes?
 - (e) How do coregulators play in concert to fine-tune metabolically peroxisomal β -oxidation pathway?

All these as yet unanswered questions deserve our complete focus in the near future.

There is an increasing demand from health institutions and pharmaceutical industries for efficient drugs. PPAR α binding pocket-ligand interactions are being increasingly recognized as a source for therapeutic interventions. Bio structural analysis based on X-ray crystallography and ligand structure pharmacophore modeling approaches afford new biophysical and structural parameters that are important in designing and developing novel potent and highly PPAR α -specific ligands to preserve human health and safety. However, the overall goal of increasing the peroxisomal fatty acid oxidation and β -oxidation safely, without increasing the lipid peroxidation and free radical-based risk of non-genotoxic carcinogenesis in the high-fat Western diet-fed population, is a challenge that is still unmet and requires continuous exploration of avenues to activate PPAR α dependent pathways safely.

Author Contributions: Conceptualization, N.L., M.C.-M. Investigation: M.T.-J., P.A., S.S., M.C.-M., N.L. Writing—original draft: M.T.-J., P.A., S.S., M.C.-M., N.L. Formal analysis: M.T.-J., P.A., S.S., M.C.-M., N.L., B.N. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by the Ministère de l'Enseignement et de la Recherche and the CNRST (Mounia Tahri-Joutey, PhD excellence grant number: 17UHP2019, Morocco) and by the Action Intégrée of the Comité Mixte Inter-universitaire Franco-Marocain (n° TBK 19/92 n° Campus France: 41501R) from the PHC Toubkal program, Ministère des Affaires Étrangères.

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: Not applicable.

Acknowledgments: The authors would like to acknowledge networking support by the COST Action CA 16,112 NutRedOx (Personalized Nutrition in aging society: redox control of major age-related diseases), supported by COST (European Cooperation in Science and Technology). We thank Nathalie Bancod for her helpful contribution in figure conception.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Latruffe, N.; Vamecq, J. Evolutionary Aspects of Peroxisomes as Cell Organelles, and of Genes Encoding Peroxisomal Proteins. *Biol. Cell* **2000**, *92*, 389–395. [[CrossRef](#)]
2. Hess, R.; Stäubli, W.; Riess, W. Nature of the Hepatomegalic Effect Produced by Ethyl-Chlorophenoxy-Isobutyrate in the Rat. *Nature* **1965**, *208*, 856–858. [[CrossRef](#)]
3. Lalwani, N.D.; Reddy, M.K.; Qureshi, S.A.; Sirtori, C.R.; Abiko, Y.; Reddy, J.K. Evaluation of Selected Hypolipidemic Agents for the Induction of Peroxisomal Enzymes and Peroxisome Proliferation in the Rat Liver. *Hum. Toxicol.* **1983**, *2*, 27–48. [[CrossRef](#)][[PubMed](#)]
4. Issemann, I.; Green, S. Activation of a Member of the Steroid Hormone Receptor Superfamily by Peroxisome Proliferators. *Nature* **1990**, *347*, 645–650. [[CrossRef](#)]
5. Zhou, T.; Yan, X.; Wang, G.; Liu, H.; Gan, X.; Zhang, T.; Wang, J.; Li, L. Evolutionary Pattern and Regulation Analysis to Support Why Diversity Functions Existed within PPAR Gene Family Members. *BioMed Res. Int.* **2015**, *2015*, e613910. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
6. Wanders, R.J.; Waterham, H.R.; Ferdinandusse, S. Metabolic Interplay between Peroxisomes and Other Subcellular Organelles Including Mitochondria and the Endoplasmic Reticulum. *Front. Cell Dev. Biol.* **2015**, *3*, 83. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
7. Lazarow, P.B.; De Duve, C. A Fatty Acyl-CoA Oxidizing System in Rat Liver Peroxisomes; Enhancement by Clofibrate, a Hypolipidemic Drug. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1976**, *73*, 2043–2046. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
8. Cherkaoui-Malki, M.; Surapureddi, S.; El-Hajj, H.I.; Vamecq, J.; Andreoletti, P. Hepatic Steatosis and Peroxisomal Fatty Acid Beta-Oxidation. *Curr. Drug Metab.* **2012**, *13*, 1412–1421. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
9. Andreoletti, P.; Raas, Q.; Gondcaille, C.; Cherkaoui-Malki, M.; Trompier, D.; Savary, S. Predictive Structure and Topology of Peroxisomal ATP-Binding Cassette (ABC) Transporters. *Int. J. Mol. Sci.* **2017**, *18*, 1593. [[CrossRef](#)]
10. Watkins, P.A.; Ellis, J.M. Peroxisomal Acyl-CoA Synthetases. *Biochim. Biophys. Acta* **2012**, *1822*, 1411–1420. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
11. Caira, F.; Clémencet, M.C.; Cherkaoui-Malki, M.; Dieuaide-Noubhani, M.; Pacot, C.; Van Veldhoven, P.P.; Latruffe, N. 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. *Biochem. J.* **1998**, *330 Pt 3*, 1361–1368. [[CrossRef](#)]
12. Osumi, T.; Ishii, N.; Hijikata, M.; Kamijo, K.; Ozasa, H.; Furuta, S.; Miyazawa, S.; Kondo, K.; Inoue, K.; Kagamiyama, H.; et al. Molecular Cloning and Nucleotide Sequence of the cDNA for Rat Peroxisomal Enoyl-CoA: Hydratase-3-Hydroxyacyl-CoA Dehydrogenase Bifunctional Enzyme. *J. Biol. Chem.* **1985**, *260*, 8905–8910. [[CrossRef](#)]
13. Latruffe, N. Human Peroxisomal 3-Ketoacyl-CoA Thiolase: Tissue Expression and Metabolic Regulation: Human Peroxisomal Thiolase. *Adv. Exp. Med. Biol.* **2020**, *1299*, 161–167. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Baes, M.; Van Veldhoven, P.P. Hepatic Dysfunction in Peroxisomal Disorders. *Biochim. Biophys. Acta* **2016**, *1863*, 956–970. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Van Veldhoven, P.P.; De Schryver, E.; Young, S.G.; Zwijsen, A.; Franssen, M.; Espeel, M.; Baes, M.; Van Ael, E. Slc25a17 Gene Trapped Mice: PMP34 Plays a Role in the Peroxisomal Degradation of Phytanic and Pristanic Acid. *Front. Cell Dev. Biol.* **2020**, *8*, 144. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. Seedorf, U.; Brysch, P.; Engel, T.; Schrage, K.; Assmann, G. Sterol Carrier Protein X Is Peroxisomal 3-Oxoacyl Coenzyme A Thiolase with Intrinsic Sterol Carrier and Lipid Transfer Activity. *J. Biol. Chem.* **1994**, *269*, 21277–21283. [[CrossRef](#)]

17. Ranea-Robles, P.; Violante, S.; Argmann, C.; Dodatko, T.; Bhattacharya, D.; Chen, H.; Yu, C.; Friedman, S.L.; Puchowicz, M.; Houten, S.M. Murine Deficiency of Peroxisomal L-Bifunctional Protein (EHHADH) Causes Medium-Chain 3-Hydroxydicarboxylic Aciduria and Perturbs Hepatic Cholesterol Homeostasis. *Cell. Mol. Life Sci.* **2021**. [[CrossRef](#)]
18. Wang, H.; Lu, J.; Chen, X.; Schwalbe, M.; Gorka, J.E.; Mandel, J.A.; Wang, J.; Goetzman, E.S.; Ranganathan, S.; Dobrowolski, S.F.; et al. Acquired Deficiency of Peroxisomal Dicarboxylic Acid Catabolism Is a Metabolic Vulnerability in Hepatoblastoma. *J. Biol. Chem.* **2021**, 100283. [[CrossRef](#)]
19. Tillander, V.; Alexson, S.E.H.; Cohen, D.E. Deactivating Fatty Acids: Acyl-CoA Thioesterase-Mediated Control of Lipid Metabolism. *Trends Endocrinol. Metab.* **2017**, *28*, 473–484. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
20. Bowen, K.J.; Kris-Etherton, P.M.; Shearer, G.C.; West, S.G.; Reddivari, L.; Jones, P.J.H. Oleic Acid-Derived Oleoylethanolamide: A Nutritional Science Perspective. *Prog. Lipid Res.* **2017**, *67*, 1–15. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
21. Desvergne, B.; Michalik, L.; Wahli, W. Transcriptional Regulation of Metabolism. *Physiol. Rev.* **2006**, *86*, 465–514. [[CrossRef](#)]
22. Varga, T.; Czimmerer, Z.; Nagy, L. PPARs Are a Unique Set of Fatty Acid Regulated Transcription Factors Controlling Both Lipid Metabolism and Inflammation. *Biochim. Biophys. Acta* **2011**, *1812*, 1007–1022. [[CrossRef](#)]
23. Mandard, S.; Müller, M.; Kersten, S. Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Alpha Target Genes. *Cell. Mol. Life Sci.* **2004**, *61*, 393–416. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

24. More, V.R.; Campos, C.R.; Evans, R.A.; Oliver, K.D.; Chan, G.N.; Miller, D.S.; Cannon, R.E. PPAR- α , a Lipid-Sensing Transcription Factor, Regulates Blood-Brain Barrier Efflux Transporter Expression. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* **2017**, *37*, 1199–1212. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Ning, L.-J.; He, A.-Y.; Lu, D.-L.; Li, J.-M.; Qiao, F.; Li, D.-L.; Zhang, M.-L.; Chen, L.-Q.; Du, Z.-Y. Nutritional Background Changes the Hypolipidemic Effects of Fenofibrate in Nile Tilapia (*Oreochromis Niloticus*). *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 41706. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Martin, G.; Schoonjans, K.; Lefebvre, A.M.; Staels, B.; Auwerx, J. Coordinate Regulation of the Expression of the Fatty Acid Transport Protein and Acyl-CoA Synthetase Genes by PPARalpha and PPARgamma Activators. *J. Biol. Chem.* **1997**, *272*, 28210–28217. [[CrossRef](#)]
27. Motojima, K.; Passilly, P.; Peters, J.M.; Gonzalez, F.J.; Latruffe, N. Expression of Putative Fatty Acid Transporter Genes Are Regulated by Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Alpha and Gamma Activators in a Tissue- and Inducer-Specific Manner. *J. Biol. Chem.* **1998**, *273*, 16710–16714. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
28. Han, L.; Shen, W.-J.; Bittner, S.; Kraemer, F.B.; Azhar, S. PPARs: Regulators of Metabolism and as Therapeutic Targets in Cardiovascular Disease. Part I: PPAR- α . *Future Cardiol.* **2017**, *13*, 259–278. [[CrossRef](#)]
29. Kandel, B.A.; Thomas, M.; Winter, S.; Damm, G.; Seehofer, D.; Burk, O.; Schwab, M.; Zanger, U.M. Genomewide Comparison of the Inducible Transcriptomes of Nuclear Receptors CAR, PXR and PPAR α in Primary Human Hepatocytes. *Biochim. Biophys. Acta* **2016**, *1859*, 1218–1227. [[CrossRef](#)]
30. Lefebvre, P.; Benomar, Y.; Staels, B. Retinoid X Receptors: Common Heterodimerization Partners with Distinct Functions. *Trends Endocrinol. Metab.* **2010**, *21*, 676–683. [[CrossRef](#)]
31. Wójtowicz, S.; Strosznajder, A.K.; Jeżyna, M.; Strosznajder, J.B. The Novel Role of PPAR Alpha in the Brain: Promising Target in Therapy of Alzheimer's Disease and Other Neurodegenerative Disorders. *Neurochem. Res.* **2020**, *45*, 972. [[CrossRef](#)]
32. Corrales, P.; Vidal-Puig, A.; Medina-Gómez, G. PPARs and Metabolic Disorders Associated with Challenged Adipose Tissue Plasticity. *Int. J. Mol. Sci.* **2018**, *19*, 2124. [[CrossRef](#)]
33. Dreyer, C.; Krey, G.; Keller, H.; Givel, F.; Helftenbein, G.; Wahli, W. Control of the Peroxisomal Beta-Oxidation Pathway by a Novel Family of Nuclear Hormone Receptors. *Cell* **1992**, *68*, 879–887. [[CrossRef](#)]
34. Feige, J.N.; Gelman, L.; Tudor, C.; Engelborghs, Y.; Wahli, W.; Desvergne, B. Fluorescence Imaging Reveals the Nuclear Behavior of Peroxisome Proliferator-Activated Receptor/Retinoid X Receptor Heterodimers in the Absence and Presence of Ligand. *J. Biol. Chem.* **2005**, *280*, 17880–17890. [[CrossRef](#)]
35. Kliewer, S.A.; Umesono, K.; Noonan, D.J.; Heyman, R.A.; Evans, R.M. Convergence of 9-Cis Retinoic Acid and Peroxisome Proliferator Signalling Pathways through Heterodimer Formation of Their Receptors. *Nature* **1992**, *358*, 771–774. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
36. Tugwood, J.D.; Issemann, I.; Anderson, R.G.; Bundell, K.R.; McPheat, W.L.; Green, S. The Mouse Peroxisome Proliferator Activated Receptor Recognizes a Response Element in the 5' Flanking Sequence of the Rat Acyl CoA Oxidase Gene. *EMBO J.* **1992**, *11*, 433–439. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
37. Tzeng, J.; Byun, J.; Park, J.Y.; Yamamoto, T.; Schesing, K.; Tian, B.; Sadoshima, J.; Oka, S. An Ideal PPAR Response Element Bound to and Activated by PPAR α . *PLoS ONE* **2015**, *10*, e0134996. [[CrossRef](#)]
38. Fornes, O.; Castro-Mondragon, J.A.; Khan, A.; Van Der Lee, R.; Zhang, X.; Richmond, P.A.; Modi, B.P.; Correard, S.; Gheorghe, M.; Baranašić, D.; et al. JASPAR 2020: Update of the Open-Access Database of Transcription Factor Binding Profiles. *Nucleic Acids Res.* **2020**, *48*, D87–D92. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
39. Koch, J.; Pranjić, K.; Huber, A.; Ellinger, A.; Hartig, A.; Kragler, F.; Brocard, C. PEX11 Family Members Are Membrane Elongation Factors That Coordinate Peroxisome Proliferation and Maintenance. *J. Cell Sci.* **2010**, *123*, 3389–3400. [[CrossRef](#)]
40. Hansmann, F.; Clémencet, M.-C.; Le Jossic-Corcus, C.; Osumi, T.; Latruffe, N.; Nicolas-Francés, V. Functional Characterization of a Peroxisome Proliferator Response-Element Located in the Intron 3 of Rat Peroxisomal Thiolase B Gene. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2003**, *311*, 149–155. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
41. Woodyatt, N.J.; Lambe, K.G.; Myers, K.A.; Tugwood, J.D.; Roberts, R.A. The Peroxisome Proliferator (PP) Response Element Upstream of the Human Acyl CoA Oxidase Gene Is Inactive among a Sample Human Population: Significance for Species Differences in Response to PPs. *Carcinogenesis* **1999**, *20*, 369–372. [[CrossRef](#)]
42. Ashibe, B.; Motojima, K. Fatty Aldehyde Dehydrogenase Is Up-Regulated by Polyunsaturated Fatty Acid via Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Alpha and Suppresses Polyunsaturated Fatty Acid-Induced Endoplasmic Reticulum Stress. *FEBS J.* **2009**, *276*, 6956–6970. [[CrossRef](#)]
43. Girnun, G.D.; Domann, F.E.; Moore, S.A.; Robbins, M.E.C. Identification of a Functional Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Response Element in the Rat Catalase Promoter. *Mol. Endocrinol.* **2002**, *16*, 2793–2801. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. Bardot, O.; Aldridge, T.C.; Latruffe, N.; Green, S. PPAR-RXR Heterodimer Activates a Peroxisome Proliferator Response Element Upstream of the Bifunctional Enzyme Gene. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1993**, *192*, 37–45. [[CrossRef](#)]
45. Lee, G.Y.; Kim, N.H.; Zhao, Z.-S.; Cha, B.S.; Kim, Y.S. Peroxisomal-Proliferator-Activated Receptor Alpha Activates Transcription of the Rat Hepatic Malonyl-CoA Decarboxylase Gene: A Key Regulation of Malonyl-CoA Level. *Biochem. J.* **2004**, *378*, 983–990. [[CrossRef](#)]
46. Shimizu, M.; Yamashita, D.; Yamaguchi, T.; Hirose, F.; Osumi, T. Aspects of the Regulatory Mechanisms of PPAR Functions: Analysis of a Bidirectional Response Element and Regulation by Sumoylation. *Mol. Cell. Biochem.* **2006**, *286*, 33–42. [[CrossRef](#)]

47. Lopez, D.; Irby, R.B.; McLean, M.P. Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Alpha Induces Rat Sterol Carrier Protein x Promoter Activity through Two Peroxisome Proliferator-Response Elements. *Mol. Cell. Endocrinol.* **2003**, *205*, 169–184. [[CrossRef](#)]
48. Evans, R.M.; Barish, G.D.; Wang, Y.-X. PPARs and the Complex Journey to Obesity. *Nat. Med.* **2004**, *10*, 355–361. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
49. Fan, W.; Evans, R. PPARs and ERRs: Molecular Mediators of Mitochondrial Metabolism. *Curr. Opin. Cell Biol.* **2015**, *33*, 49–54. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
50. Green, S.; Wahli, W. Peroxisome Proliferator-Activated Receptors: Finding the Orphan a Home. *Mol. Cell. Endocrinol.* **1994**, *100*, 149–153. [[CrossRef](#)]
51. Zhu, Y.; Qi, C.; Korenberg, J.R.; Chen, X.N.; Noya, D.; Rao, M.S.; Reddy, J.K. Structural Organization of Mouse Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Gamma (MPPAR Gamma) Gene: Alternative Promoter Use and Different Splicing Yield Two MPPAR Gamma Isoforms. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1995**, *92*, 7921–7925. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
52. Göttlicher, M.; Widmark, E.; Li, Q.; Gustafsson, J.A. Fatty Acids Activate a Chimera of the Clofibrilic Acid-Activated Receptor and the Glucocorticoid Receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1992**, *89*, 4653–4657. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
53. Sher, T.; Yi, H.F.; McBride, O.W.; Gonzalez, F.J. cDNA Cloning, Chromosomal Mapping, and Functional Characterization of the Human Peroxisome Proliferator Activated Receptor. *Biochemistry* **1993**, *32*, 5598–5604. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
54. Vamecq, J.; Lathurte, N. Medical Significance of Peroxisome Proliferator-Activated Receptors. *Lancet* **1999**, *354*, 141–148. [[CrossRef](#)]
55. Brown, J.D.; Plutzky, J. Peroxisome Proliferator-Activated Receptors as Transcriptional Nodal Points and Therapeutic Targets. *Circulation* **2007**, *115*, 518–533. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
56. Hong, F.; Pan, S.; Guo, Y.; Xu, P.; Zhai, Y. PPARs as Nuclear Receptors for Nutrient and Energy Metabolism. *Molecules* **2019**, *24*, 2545. [[CrossRef](#)]
57. Lamichane, S.; Dahal Lamichane, B.; Kwon, S.-M. Pivotal Roles of Peroxisome Proliferator-Activated Receptors (PPARs) and Their Signal Cascade for Cellular and Whole-Body Energy Homeostasis. *Int. J. Mol. Sci.* **2018**, *19*, 949. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
58. Moore, J.T.; Collins, J.L.; Pearce, K.H. The Nuclear Receptor Superfamily and Drug Discovery. *ChemMedChem* **2006**, *1*, 504–523. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
59. Floyd, Z.E.; Stephens, J.M. Controlling a Master Switch of Adipocyte Development and Insulin Sensitivity: Covalent Modifications of PPAR γ . *Biochim. Biophys. Acta* **2012**, *1822*, 1090–1095. [[CrossRef](#)]
60. Wadosky, K.M.; Willis, M.S. The Story so Far: Post-Translational Regulation of Peroxisome Proliferator-Activated Receptors by Ubiquitination and SUMOylation. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **2012**, *302*, H515–H526. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
61. Kim, T.-H.; Kim, M.-Y.; Jo, S.-H.; Park, J.-M.; Ahn, Y.-H. Modulation of the Transcriptional Activity of Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Gamma by Protein-Protein Interactions and Post-Translational Modifications. *Yonsei Med. J.* **2013**, *54*, 545–559. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
62. Tufano, M.; Pinna, G. Is There a Future for PPARs in the Treatment of Neuropsychiatric Disorders? *Molecules* **2020**, *25*, 1062. [[CrossRef](#)]
63. Bougarne, N.; Weyers, B.; Desmet, S.J.; Deckers, J.; Ray, D.W.; Staels, B.; De Bosscher, K. Molecular Actions of PPAR α in Lipid Metabolism and Inflammation. *Endocr. Rev.* **2018**, *39*, 760–802. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
64. Pawlak, M.; Lefebvre, P.; Staels, B. General Molecular Biology and Architecture of Nuclear Receptors. *Curr. Top. Med. Chem.* **2012**, *12*, 486–504. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
65. Lamas Bervejillo, M.; Ferreira, A.M. Understanding Peroxisome Proliferator-Activated Receptors: From the Structure to the Regulatory Actions on Metabolism. *Adv. Exp. Med. Biol.* **2019**, *1127*, 39–57. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
66. Oyama, T.; Toyota, K.; Waku, T.; Hirakawa, Y.; Nagasawa, N.; Kasuga, J.I.; Hashimoto, Y.; Miyachi, H.; Morikawa, K. Adaptability and Selectivity of Human Peroxisome Proliferator-Activated Receptor (PPAR) Pan Agonists Revealed from Crystal Structures. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **2009**, *65*, 786–795. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
67. Kawasaki, M.; Kambe, A.; Yamamoto, Y.; Arulmozhiraja, S.; Ito, S.; Nakagawa, Y.; Tokiwa, H.; Nakano, S.; Shimano, H. Elucidation of Molecular Mechanism of a Selective PPAR α Modulator, Pemafibrate, through Combinational Approaches of X-Ray Crystallography, Thermodynamic Analysis, and First-Principle Calculations. *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, *21*, 361. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
68. Xu, H.E.; Lambert, M.H.; Montana, V.G.; Plunket, K.D.; Moore, L.B.; Collins, J.L.; Oplinger, J.A.; Kliewer, S.A.; Gampe, R.T.; McKee, D.D.; et al. Structural Determinants of Ligand Binding Selectivity between the Peroxisome Proliferator-Activated Receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2001**, *98*, 13919–13924. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
69. Kamata, S.; Oyama, T.; Saito, K.; Honda, A.; Yamamoto, Y.; Suda, K.; Ishikawa, R.; Itoh, T.; Watanabe, Y.; Shibata, T.; et al. PPAR α Ligand-Binding Domain Structures with Endogenous Fatty Acids and Fibrates. *iScience* **2020**, *23*, 101727. [[CrossRef](#)]
70. Forman, B.M.; Chen, J.; Evans, R.M. Hypolipidemic Drugs, Polyunsaturated Fatty Acids, and Eicosanoids Are Ligands for Peroxisome Proliferator-Activated Receptors Alpha and Delta. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1997**, *94*, 4312–4317. [[CrossRef](#)]
71. Kliewer, S.A.; Sundseth, S.S.; Jones, S.A.; Brown, P.J.; Wisely, G.B.; Koble, C.S.; Devchand, P.; Wahli, W.; Willson, T.M.; Lenhard, J.M.; et al. Fatty Acids and Eicosanoids Regulate Gene Expression through Direct Interactions with Peroxisome Proliferator-Activated Receptors Alpha and Gamma. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1997**, *94*, 4318–4323. [[CrossRef](#)]
72. Takada, I.; Makishima, M. Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Agonists and Antagonists: A Patent Review (2014–Present). *Expert Opin. Ther. Pat.* **2020**, *30*, 1–13. [[CrossRef](#)]

73. Elholm, M.; Dam, I.; Jorgensen, C.; Krogsdam, A.M.; Holst, D.; Kratchmarova, I.; Gottlicher, M.; Gustafsson, J.A.; Berge, R.; Flatmark, T.; et al. Acyl-CoA Esters Antagonize the Effects of Ligands on Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Alpha Conformation, DNA Binding, and Interaction with Co-Factors. *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 21410–21416. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
74. Hostetler, H.A.; Kier, A.B.; Schroeder, F. Very-Long-Chain and Branched-Chain Fatty Acyl-CoAs Are High Affinity Ligands for the Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Alpha (PPARalpha). *Biochemistry* **2006**, *45*, 7669–7681. [[CrossRef](#)]
75. Chakravarthy, M.V.; Lodhi, I.J.; Yin, L.; Malapaka, R.R.V.; Xu, H.E.; Turk, J.; Semenkovich, C.F. Identification of a Physiologically Relevant Endogenous Ligand for PPARalpha in Liver. *Cell* **2009**, *138*, 476–488. [[CrossRef](#)]
76. Brown, J.D.; Karimian Azari, E.; Ayala, J.E. Oleoylethanolamide: A Fat Ally in the Fight against Obesity. *Physiol. Behav.* **2017**, *176*, 50–58. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
77. Campolongo, P.; Roozendaal, B.; Trezza, V.; Cuomo, V.; Astarita, G.; Fu, J.; McGaugh, J.L.; Piomelli, D. Fat-Induced Satiety Factor Oleoylethanolamide Enhances Memory Consolidation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2009**, *106*, 8027–8031. [[CrossRef](#)]
78. Azhar, S. Peroxisome Proliferator-Activated Receptors, Metabolic Syndrome and Cardiovascular Disease. *Future Cardiol.* **2010**, *6*, 657–691. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
79. Rigano, D.; Sirignano, C.; Tagliatalata-Scafati, O. The Potential of Natural Products for Targeting PPAR α . *Acta Pharm. Sin. B* **2017**, *7*, 427–438. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
80. Green, S. PPAR: A Mediator of Peroxisome Proliferator Action. *Mutat. Res.* **1995**, *333*, 101–109. [[CrossRef](#)]
81. Yu, K.; Bayona, W.; Kallen, C.B.; Harding, H.P.; Ravera, C.P.; McMahon, G.; Brown, M.; Lazar, M.A. Differential Activation of Peroxisome Proliferator-Activated Receptors by Eicosanoids. *J. Biol. Chem.* **1995**, *270*, 23975–23983. [[CrossRef](#)]
82. Goto, T.; Takahashi, N.; Kato, S.; Egawa, K.; Ebisu, S.; Moriyama, T.; Fushiki, T.; Kawada, T. Phytol Directly Activates Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Alpha (PPARalpha) and Regulates Gene Expression Involved in Lipid Metabolism in PPARalpha- Expressing HepG2 Hepatocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2005**, *337*, 440–445. [[CrossRef](#)]
83. Wahli, W.; Michalik, L. PPARs at the Crossroads of Lipid Signaling and Inflammation. *Trends Endocrinol. Metab.* **2012**, *23*, 351–363. [[CrossRef](#)]
84. Narala, V.R.; Adapala, R.K.; Suresh, M.V.; Brock, T.G.; Peters-Golden, M.; Reddy, R.C. Leukotriene B4 Is a Physiologically Relevant Endogenous Peroxisome Proliferator-Activated Receptor-Alpha Agonist. *J. Biol. Chem.* **2010**, *285*, 22067–22074. [[CrossRef](#)]
85. Lin, Q.; Ruuska, S.E.; Shaw, N.S.; Dong, D.; Noy, N. Ligand Selectivity of the Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Alpha. *Biochemistry* **1999**, *38*, 185–190. [[CrossRef](#)]
86. Delerive, P.; Furman, C.; Teissier, E.; Fruchart, J.; Duriez, P.; Staels, B. Oxidized Phospholipids Activate PPARalpha in a Phospholipase A2-Dependent Manner. *FEBS Lett.* **2000**, *471*, 34–38. [[CrossRef](#)]
87. Roy, A.; Kundu, M.; Jana, M.; Mishra, R.K.; Yung, Y.; Luan, C.-H.; Gonzalez, F.J.; Pahan, K. Identification and Characterization of PPAR α Ligands in the Hippocampus. *Nat. Chem. Biol.* **2016**, *12*, 1075–1083. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
88. Bernardes, A.; Souza, P.C.T.; Muniz, J.R.C.; Ricci, C.G.; Ayers, S.D.; Parekh, N.M.; Godoy, A.S.; Trivella, D.B.B.; Reinach, P.; Webb, P.; et al. Molecular Mechanism of Peroxisome Proliferator-Activated Receptor α Activation by WY14643: A New Mode of Ligand Recognition and Receptor Stabilization. *J. Mol. Biol.* **2013**, *425*, 2878–2893. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
89. Huang, H.-T.; Liao, C.-K.; Chiu, W.-T.; Tzeng, S.-F. Ligands of Peroxisome Proliferator-Activated Receptor-Alpha Promote Glutamate Transporter-1 Endocytosis in Astrocytes. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **2017**, *86*, 42–53. [[CrossRef](#)]
90. Moraes, L.A.; Piqueras, L.; Bishop-Bailey, D. Peroxisome Proliferator-Activated Receptors and Inflammation. *Pharmacol. Ther.* **2006**, *110*, 371–385. [[CrossRef](#)]
91. Mirza, A.Z.; Althagafi, I.I.; Shamshad, H. Role of PPAR Receptor in Different Diseases and Their Ligands: Physiological Importance and Clinical Implications. *Eur. J. Med. Chem.* **2019**, *166*, 502–513. [[CrossRef](#)]
92. Tenenbaum, A.; Motro, M.; Fisman, E.Z. Dual and Pan-Peroxisome Proliferator-Activated Receptors (PPAR) Co-Agonism: The Bezafibrate Lessons. *Cardiovasc. Diabetol.* **2005**, *4*, 14. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
93. Rogue, A.; Anthérieu, S.; Vluggens, A.; Umbdenstock, T.; Claude, N.; de la Moureyre-Spire, C.; Weaver, R.J.; Guillouzo, A. PPAR Agonists Reduce Steatosis in Oleic Acid-Overloaded HepaRG Cells. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **2014**, *276*, 73–81. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
94. Shin, N.-R.; Park, S.-H.; Ko, J.-W.; Cho, Y.-K.; Lee, I.-C.; Kim, J.-C.; Shin, I.-S.; Kim, J.-S. Lobeglitazone Attenuates Airway Inflammation and Mucus Hypersecretion in a Murine Model of Ovalbumin-Induced Asthma. *Front. Pharmacol.* **2018**, *9*, 906. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
95. Stebbins, K.J.; Broadhead, A.R.; Cabrera, G.; Correa, L.D.; Messmer, D.; Bunday, R.; Baccei, C.; Bravo, Y.; Chen, A.; Stock, N.S.; et al. In Vitro and in Vivo Pharmacology of NXT629, a Novel and Selective PPAR α Antagonist. *Eur. J. Pharmacol.* **2017**, *809*, 130–140. [[CrossRef](#)]
96. Duszka, K.; Gregor, A.; Guillou, H.; König, J.; Wahli, W. Peroxisome Proliferator-Activated Receptors and Caloric Restriction-Common Pathways Affecting Metabolism, Health, and Longevity. *Cells* **2020**, *9*, 1708. [[CrossRef](#)]
97. Kosgei, V.J.; Coelho, D.; Gueant-Rodriguez, R.M.; Gueant, J.L. Sirt1-PPARS Cross-Talk in Complex Metabolic Diseases and Inherited Disorders of the One Carbon Metabolism. *Cells* **2020**, *9*, 1882. [[CrossRef](#)]
98. Kersten, S.; Stienstra, R. The Role and Regulation of the Peroxisome Proliferator Activated Receptor Alpha in Human Liver. *Biochimie* **2017**, *136*, 75–84. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
99. Laleh, P.; Yaser, K.; Alireza, O. Oleoylethanolamide: A Novel Pharmaceutical Agent in the Management of Obesity-an Updated Review. *J. Cell. Physiol.* **2019**, *234*, 7893–7902. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

100. Pawar, A.; Jump, D.B. Unsaturated Fatty Acid Regulation of Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Alpha Activity in Rat Primary Hepatocytes. *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 35931–35939. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
101. Ellinghaus, P.; Wolfrum, C.; Assmann, G.; Spener, F.; Seedorf, U. Phytanic Acid Activates the Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Alpha (PPARalpha) in Sterol Carrier Protein 2-/Sterol Carrier Protein x-Deficient Mice. *J. Biol. Chem.* **1999**, *274*, 2766–2772. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
102. Zomer, A.W.; van Der Burg, B.; Jansen, G.A.; Wanders, R.J.; Poll-The, B.T.; van Der Saag, P.T. Pristanic Acid and Phytanic Acid: Naturally Occurring Ligands for the Nuclear Receptor Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Alpha. *J. Lipid Res.* **2000**, *41*, 1801–1807. [[CrossRef](#)]
103. Hostetler, H.A.; Petrescu, A.D.; Kier, A.B.; Schroeder, F. Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Alpha Interacts with High Affinity and Is Conformationally Responsive to Endogenous Ligands. *J. Biol. Chem.* **2005**, *280*, 18667–18682. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
104. Brady, P.S.; Marine, K.A.; Brady, L.J.; Ramsay, R.R. Co-Ordinate Induction of Hepatic Mitochondrial and Peroxisomal Carnitine Acyltransferase Synthesis by Diet and Drugs. *Biochem. J.* **1989**, *260*, 93–100. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
105. Marcus, S.L.; Miyata, K.S.; Zhang, B.; Subramani, S.; Rachubinski, R.A.; Capone, J.P. Diverse Peroxisome Proliferator-Activated Receptors Bind to the Peroxisome Proliferator-Responsive Elements of the Rat Hydratase/Dehydrogenase and Fatty Acyl-CoAOxidase Genes but Differentially Induce Expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1993**, *90*, 5723–5727. [[CrossRef](#)]
106. Reddy, J.K.; Mannaerts, G.P. Peroxisomal Lipid Metabolism. *Annu. Rev. Nutr.* **1994**, *14*, 343–370. [[CrossRef](#)]
107. Zhang, B.; Marcus, S.L.; Miyata, K.S.; Subramani, S.; Capone, J.P.; Rachubinski, R.A. Characterization of Protein-DNA Interactions within the Peroxisome Proliferator-Responsive Element of the Rat Hydratase-Dehydrogenase Gene. *J. Biol. Chem.* **1993**, *268*, 12939–12945. [[CrossRef](#)]
108. Chen, X.; Shang, L.; Deng, S.; Li, P.; Chen, K.; Gao, T.; Zhang, X.; Chen, Z.; Zeng, J. Peroxisomal Oxidation of Erucic Acid Suppresses Mitochondrial Fatty Acid Oxidation by Stimulating Malonyl-CoA Formation in the Rat Liver. *J. Biol. Chem.* **2020**, *295*, 10168–10179. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
109. Maheshwari, G.; Ringseis, R.; Wen, G.; Gessner, D.K.; Rost, J.; Fraatz, M.A.; Zorn, H.; Eder, K. Branched-Chain Fatty Acids as Mediators of the Activation of Hepatic Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Alpha by a Fungal Lipid Extract. *Biomolecules* **2020**, *10*, 1259. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
110. Latruffe, N.; Cherkaoui Malki, M.; Nicolas-Frances, V.; Clemencet, M.C.; Jannin, B.; Berlot, J.P. Regulation of the Peroxisomal Beta-Oxidation-Dependent Pathway by Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Alpha and Kinases. *Biochem. Pharmacol.* **2000**, *60*, 1027–1032. [[CrossRef](#)]
111. Klaunig, J.E.; Babich, M.A.; Baetcke, K.P.; Cook, J.C.; Corton, J.C.; David, R.M.; DeLuca, J.G.; Lai, D.Y.; McKee, R.H.; Peters, J.M.; et al. PPARalpha Agonist-Induced Rodent Tumors: Modes of Action and Human Relevance. *Crit. Rev. Toxicol.* **2003**, *33*, 655–780. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
112. Reddy, J.K.; Lalwai, N.D. Carcinogenesis by Hepatic Peroxisome Proliferators: Evaluation of the Risk of Hypolipidemic Drugs and Industrial Plasticizers to Humans. *Crit. Rev. Toxicol.* **1983**, *12*, 1–58. [[CrossRef](#)]
113. Gonzalez, F.J.; Peters, J.M.; Cattley, R.C. Mechanism of Action of the Nongenotoxic Peroxisome Proliferators: Role of the Peroxisome Proliferator-Activator Receptor Alpha. *J. Natl. Cancer Inst.* **1998**, *90*, 1702–1709. [[CrossRef](#)]
114. Maloney, E.K.; Waxman, D.J. Trans-Activation of PPARalpha and PPARgamma by Structurally Diverse Environmental Chemicals. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **1999**, *161*, 209–218. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
115. Akbiyik, F.; Cinar, K.; Demirpence, E.; Ozsullu, T.; Tunca, R.; Haziroglu, R.; Yurdaydin, C.; Uzunalimoglu, O.; Bozkaya, H. Ligand-Induced Expression of Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Alpha and Activation of Fatty Acid Oxidation Enzymes in Fatty Liver. *Eur. J. Clin. Invest.* **2004**, *34*, 429–435. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
116. Preiss, D.; Tikkanen, M.J.; Welsh, P.; Ford, I.; Lovato, L.C.; Elam, M.B.; LaRosa, J.C.; DeMicco, D.A.; Colhoun, H.M.; Goldenberg, J.; et al. Lipid-Modifying Therapies and Risk of Pancreatitis: A Meta-Analysis. *JAMA* **2012**, *308*, 804–811. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
117. Estrela, G.R.; Arruda, A.C.; Torquato, H.F.V.; Freitas-Lima, L.C.; Perilhão, M.S.; Wasinski, F.; Budu, A.; Fock, R.A.; Paredes-Gamero, E.J.; Araujo, R.C. Gemfibrozil Induces Anemia, Leukopenia and Reduces Hematopoietic Stem Cells via PPAR- α in Mice. *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, *21*, 5050. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
118. Oswal, D.P.; Balanarasimha, M.; Loyer, J.K.; Bedi, S.; Soman, F.L.; Rider, S.D.; Hostetler, H.A. Divergence between Human and Murine Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Alpha Ligand Specificities. *J. Lipid Res.* **2013**, *54*, 2354–2365. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
119. Oswal, D.P.; Alter, G.M.; Rider, S.D.; Hostetler, H.A. A Single Amino Acid Change Humanizes Long-Chain Fatty Acid Binding and Activation of Mouse Peroxisome Proliferator-Activated Receptor α . *J. Mol. Graph. Model.* **2014**, *51*, 27–36. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
120. Chawla, A.; Repa, J.J.; Evans, R.M.; Mangelsdorf, D.J. Nuclear Receptors and Lipid Physiology: Opening the X-Files. *Science* **2001**, *294*, 1866–1870. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
121. Krey, G.; Braissant, O.; L'Horsset, F.; Kalkhoven, E.; Perroud, M.; Parker, M.G.; Wahli, W. Fatty Acids, Eicosanoids, and Hypolipidemic Agents Identified as Ligands of Peroxisome Proliferator-Activated Receptors by Coactivator-Dependent Receptor Ligand Assay. *Mol. Endocrinol.* **1997**, *11*, 779–791. [[CrossRef](#)]
122. Cave, M.C.; Clair, H.B.; Hardesty, J.E.; Falkner, K.C.; Feng, W.; Clark, B.J.; Sidey, J.; Shi, H.; Aqel, B.A.; McClain, C.J.; et al. Nuclear Receptors and Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Biochim. Biophys. Acta* **2016**, *1859*, 1083–1099. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

123. Francque, S.; Szabo, G.; Abdelmalek, M.F.; Byrne, C.D.; Cusi, K.; Dufour, J.F.; Roden, M.; Sacks, F.; Tacke, F. Nonalcoholic Steatohepatitis: The Role of Peroxisome Proliferator-Activated Receptors. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* **2021**, *18*, 24–39. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
124. Sinha, R.A.; Rajak, S.; Singh, B.K.; Yen, P.M. Hepatic Lipid Catabolism via PPARalpha-Lysosomal Crosstalk. *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, *21*, 2391. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
125. Wagner, N.; Wagner, K.-D. The Role of PPARs in Disease. *Cells* **2020**, *9*, 2367. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
126. Lee, S.S.; Pineau, T.; Drago, J.; Lee, E.J.; Owens, J.W.; Kroetz, D.L.; Fernandez-Salguero, P.M.; Westphal, H.; Gonzalez, F.J. 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. *Mol. Cell. Biol.* **1995**, *15*, 3012–3022. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
127. Amber-Vitos, O.; Chaturvedi, N.; Nachliel, E.; Gutman, M.; Tsfadia, Y. The Effect of Regulating Molecules on the Structure of the PPAR-RXR Complex. *Biochim. Biophys. Acta* **2016**, *1861*, 1852–1863. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
128. Surapureddi, S.; Yu, S.; Bu, H.; Hashimoto, T.; Yeldandi, A.V.; Kashireddy, P.; Cherkaoui-Malki, M.; Qi, C.; Zhu, Y.J.; Rao, M.S.; et al. Identification of a Transcriptionally Active Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Alpha-Interacting Cofactor Complex in Rat Liver and Characterization of PRIC285 as a Coactivator. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2002**, *99*, 11836–11841. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
129. Skowron, K.J.; Booker, K.; Cheng, C.; Creed, S.; David, B.P.; Lazzara, P.R.; Lian, A.; Siddiqui, Z.; Speltz, T.E.; Moore, T.W. Steroid Receptor/Coactivator Binding Inhibitors: An Update. *Mol. Cell. Endocrinol.* **2019**, *493*, 110471. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
130. Surapureddi, S.; Rana, R.; Reddy, J.K.; Goldstein, J.A. Nuclear Receptor Coactivator 6 Mediates the Synergistic Activation of Human Cytochrome P-450 2C9 by the Constitutive Androstane Receptor and Hepatic Nuclear Factor-4alpha. *Mol. Pharmacol.* **2008**, *74*, 913–923. [[CrossRef](#)]
131. Misra, P.; Reddy, J.K. Peroxisome Proliferator-Activated Receptor- α Activation and Excess Energy Burning in Hepatocarcinogenesis. *Biochimie* **2014**, *98*, 63–74. [[CrossRef](#)]
132. Rana, R.; Surapureddi, S.; Kam, W.; Ferguson, S.; Goldstein, J.A. Med25 Is Required for RNA Polymerase II Recruitment to Specific Promoters, Thus Regulating Xenobiotic and Lipid Metabolism in Human Liver. *Mol. Cell. Biol.* **2011**, *31*, 466–481. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
133. Spitler, K.M.; Ponce, J.M.; Oudit, G.Y.; Hall, D.D.; Grueter, C.E. Cardiac Med1 Deletion Promotes Early Lethality, Cardiac Remodeling, and Transcriptional Reprogramming. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **2017**, *312*, H768–H780. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
134. De Vera, I.M.S.; Zheng, J.; Novick, S.; Shang, J.; Hughes, T.S.; Brust, R.; Munoz-Tello, P.; Gardner, W.J., Jr.; Marciano, D.P.; Kong, X.; et al. Synergistic Regulation of Coregulator/Nuclear Receptor Interaction by Ligand and DNA. *Structure* **2017**, *25*, 1506–1518.e4. [[CrossRef](#)]
135. Lai, Y.-H.; Choudhary, K.; Cloutier, S.C.; Xing, Z.; Aviran, S.; Tran, E.J. Genome-Wide Discovery of DEAD-Box RNA Helicase Targets Reveals RNA Structural Remodeling in Transcription Termination. *Genetics* **2019**, *212*, 153–174. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
136. Song, C.; Hotz-Wagenblatt, A.; Voit, R.; Grummt, I. SIRT7 and the DEAD-Box Helicase DDX21 Cooperate to Resolve Genomic R Loops and Safeguard Genome Stability. *Genes Dev.* **2017**, *31*, 1370–1381. [[CrossRef](#)]
137. Taschuk, F.; Cherry, S. DEAD-Box Helicases: Sensors, Regulators, and Effectors for Antiviral Defense. *Viruses* **2020**, *12*, 181. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
138. Arconzo, M.; Piccinin, E.; Moschetta, A. Increased Risk of Acute Liver Failure by Pain Killer Drugs in NAFLD: Focus on Nuclear Receptors and Their Coactivators. *Dig. Liver Dis.* **2021**, *53*, 26–34. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
139. Fornes, D.; Gomez Ribot, D.; Heinecke, F.; Roberti, S.L.; Capobianco, E.; Jawerbaum, A. Maternal Diets Enriched in Olive Oil Regulate Lipid Metabolism and Levels of PPARs and Their Coactivators in the Fetal Liver in a Rat Model of Gestational Diabetes Mellitus. *J. Nutr. Biochem.* **2020**, *78*, 108334. [[CrossRef](#)]
140. Kalliora, C.; Kyriazis, I.D.; Oka, S.-I.; Lieu, M.J.; Yue, Y.; Area-Gomez, E.; Pol, C.J.; Tian, Y.; Mizushima, W.; Chin, A.; et al. Dual Peroxisome-Proliferator-Activated-Receptor- α/γ Activation Inhibits SIRT1-PGC1 α Axis and Causes Cardiac Dysfunction. *JCI Insight* **2019**, *5*, 129556. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
141. Luo, C.; Widlund, H.R.; Puigserver, P. PGC-1 Coactivators: Shepherding the Mitochondrial Biogenesis of Tumors. *Trends Cancer* **2016**, *2*, 619–631. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
142. Stallcup, M.R.; Poulard, C. Gene-Specific Actions of Transcriptional Coregulators Facilitate Physiological Plasticity: Evidence for a Physiological Coregulator Code. *Trends Biochem. Sci.* **2020**, *45*, 497–510. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
143. Emmett, M.J.; Lazar, M.A. Integrative Regulation of Physiology by Histone Deacetylase 3. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2019**, *20*, 102–115. [[CrossRef](#)]
144. Jaiswal, B.; Gupta, A. Modulation of Nuclear Receptor Function by Chromatin Modifying Factor TIP60. *Endocrinology* **2018**, *159*, 2199–2215. [[CrossRef](#)]
145. Jankowsky, E.; Guenther, U.-P. A Helicase Links Upstream ORFs and RNA Structure. *Curr. Genet.* **2019**, *65*, 453–456. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
146. Surapureddi, S.; Viswakarma, N.; Yu, S.; Guo, D.; Rao, M.S.; Reddy, J.K. PRIC320, a Transcription Coactivator, Isolated from Peroxisome Proliferator-Binding Protein Complex. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2006**, *343*, 535–543. [[CrossRef](#)]
147. Jia, Y.; Liu, N.; Viswakarma, N.; Sun, R.; Schipma, M.J.; Shang, M.; Thorp, E.B.; Kanwar, Y.S.; Thimmapaya, B.; Reddy, J.K. PIMT/NCOA6IP Deletion in the Mouse Heart Causes Delayed Cardiomyopathy Attributable to Perturbation in Energy Metabolism. *Int. J. Mol. Sci.* **2018**, *19*, 1485. [[CrossRef](#)]

148. Jeronimo, C.; Robert, F. The Mediator Complex: At the Nexus of RNA Polymerase II Transcription. *Trends Cell Biol.* **2017**, *27*, 765–783. [[CrossRef](#)]
149. Soutourina, J. Transcription Regulation by the Mediator Complex. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2018**, *19*, 262–274. [[CrossRef](#)]
150. Paiano, A.; Margiotta, A.; De Luca, M.; Bucci, C. Yeast Two-Hybrid Assay to Identify Interacting Proteins. *Curr. Protoc. Protein Sci.* **2019**, *95*, e70. [[CrossRef](#)]
151. O'Malley, B.W. Origins of the Field of Molecular Endocrinology: A Personal Perspective. *Mol. Endocrinol.* **2016**, *30*, 1015–1018. [[CrossRef](#)]
152. Kamei, Y.; Xu, L.; Heinzel, T.; Torchia, J.; Kurokawa, R.; Gloss, B.; Lin, S.C.; Heyman, R.A.; Rose, D.W.; Glass, C.K.; et al. A CBP Integrator Complex Mediates Transcriptional Activation and AP-1 Inhibition by Nuclear Receptors. *Cell* **1996**, *85*, 403–414. [[CrossRef](#)]
153. Sabari, B.R.; Dall'Agnesse, A.; Boija, A.; Klein, I.A.; Coffey, E.L.; Shrinivas, K.; Abraham, B.J.; Hannett, N.M.; Zamudio, A.V.; Manteiga, J.C.; et al. Coactivator Condensation at Super-Enhancers Links Phase Separation and Gene Control. *Science* **2018**, *361*, eard3958. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
154. Tan, H.W.S.; Anjum, B.; Shen, H.-M.; Ghosh, S.; Yen, P.M.; Sinha, R.A. Lysosomal Inhibition Attenuates Peroxisomal Gene Transcription via Suppression of PPARA and PPARGC1A Levels. *Autophagy* **2019**, *15*, 1455–1459. [[CrossRef](#)]
155. Dumesic, P.A.; Egan, D.F.; Gut, P.; Tran, M.T.; Parisi, A.; Chatterjee, N.; Jedrychowski, M.; Paschini, M.; Kazak, L.; Wilensky, S.E.; et al. An Evolutionarily Conserved UORF Regulates PGC1alpha and Oxidative Metabolism in Mice, Flies, and Bluefin Tuna. *CellMetab.* **2019**, *30*, 190–200.e6. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
156. Petr, M.; Stastny, P.; Zajac, A.; Tufano, J.J.; Maciejewska-Skrendo, A. The Role of Peroxisome Proliferator-Activated Receptors and Their Transcriptional Coactivators Gene Variations in Human Trainability: A Systematic Review. *Int. J. Mol. Sci.* **2018**, *19*, 1472. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
157. Behera, A.K.; Bhattacharya, A.; Vasudevan, M.; Kundu, T.K. P53 Mediated Regulation of Coactivator Associated Arginine Methyltransferase 1 (CARM1) Expression Is Critical for Suppression of Adipogenesis. *FEBS J.* **2018**, *285*, 1730–1744. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
158. Xu, W.; Chen, H.; Du, K.; Asahara, H.; Tini, M.; Emerson, B.M.; Montminy, M.; Evans, R.M. A Transcriptional Switch Mediated by Cofactor Methylation. *Science* **2001**, *294*, 2507–2511. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
159. Kang, Z.; Fan, R. PPAR α and NCOR/SMRT Corepressor Network in Liver Metabolic Regulation. *FASEB J.* **2020**, *34*, 8796–8809. [[CrossRef](#)]
160. Ghisletti, S.; Huang, W.; Jepsen, K.; Benner, C.; Hardiman, G.; Rosenfeld, M.G.; Glass, C.K. Cooperative NCOR/SMRT Interactions Establish a Corepressor-Based Strategy for Integration of Inflammatory and Anti-Inflammatory Signaling Pathways. *Genes Dev.* **2009**, *23*, 681–693. [[CrossRef](#)]
161. Jepsen, K.; Gleiberman, A.S.; Shi, C.; Simon, D.I.; Rosenfeld, M.G. Cooperative Regulation in Development by SMRT and FOXO1. *Genes Dev.* **2008**, *22*, 740–745. [[CrossRef](#)]
162. Kumar, S.; Cunningham, T.J.; Ducrest, G. Nuclear Receptor Corepressors Ncor1 and Ncor2 (Smrt) Are Required for Retinoic Acid-Dependent Repression of Fgf8 during Somitogenesis. *Dev. Biol.* **2016**, *418*, 204–215. [[CrossRef](#)]
163. Duong, V.; Augereau, P.; Badia, E.; Jalaguier, S.; Cavailles, V. Regulation of Hormone Signaling by Nuclear Receptor Interacting Proteins. *Adv. Exp. Med. Biol.* **2008**, *617*, 121–127. [[CrossRef](#)]
164. Ogawa, K.; Yagi, T.; Guo, T.; Takeda, K.; Ohguchi, H.; Koyama, H.; Aotani, D.; Imaeda, K.; Kataoka, H.; Tanaka, T. Pemaflibrate, a Selective PPAR α Modulator, and Fenofibrate Suppress Microglial Activation through Distinct PPAR α and SIRT1-Dependent Pathways. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2020**, *524*, 385–391. [[CrossRef](#)]
165. Purushotham, A.; Schug, T.T.; Xu, Q.; Surapureddi, S.; Guo, X.; Li, X. Hepatocyte-Specific Deletion of SIRT1 Alters Fatty Acid Metabolism and Results in Hepatic Steatosis and Inflammation. *Cell Metab.* **2009**, *9*, 327–338. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
166. Han, L.; Zhou, R.; Niu, J.; McNutt, M.A.; Wang, P.; Tong, T. SIRT1 Is Regulated by a PPAR γ -SIRT1 Negative Feedback Loop Associated with Senescence. *Nucleic Acids Res.* **2010**, *38*, 7458–7471. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
167. Naiman, S.; Huynh, F.K.; Gil, R.; Glick, Y.; Shahar, Y.; Touitou, N.; Nahum, L.; Avivi, M.Y.; Roichman, A.; Kanfi, Y.; et al. SIRT6 Promotes Hepatic Beta-Oxidation via Activation of PPARalpha. *Cell Rep.* **2019**, *29*, 4127–4143.e8. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
168. Glass, C.K.; Rosenfeld, M.G. The Coregulator Exchange in Transcriptional Functions of Nuclear Receptors. *Genes Dev.* **2000**, *14*, 121–141. [[PubMed](#)]
169. Fritah, A.; Christian, M.; Parker, M.G. The Metabolic Coregulator RIP140: An Update. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **2010**, *299*, E335–E340. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
170. Venkata, N.G.; Robinson, J.A.; Cabot, P.J.; Davis, B.; Monteith, G.R.; Roberts-Thomson, S.J. Mono(2-Ethylhexyl)Phthalate and Mono-n-Butyl Phthalate Activation of Peroxisome Proliferator Activated-Receptors Alpha and Gamma in Breast. *Toxicol. Lett.* **2006**, *163*, 224–234. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
171. Dawson, M.I.; Xia, Z. The Retinoid X Receptors and Their Ligands. *Biochim. Biophys. Acta* **2012**, *1821*, 21–56. [[CrossRef](#)]
172. Brunmeir, R.; Xu, F. Functional Regulation of PPARs through Post-Translational Modifications. *Int. J. Mol. Sci.* **2018**, *19*, 1738. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
173. Iershov, A.; Nemazany, I.; Alkhoury, C.; Girard, M.; Barth, E.; Cagnard, N.; Montagner, A.; Chretien, D.; Rugarli, E.I.; Guillou, H.; et al. The Class 3 PI3K Coordinates Autophagy and Mitochondrial Lipid Catabolism by Controlling Nuclear Receptor PPAR α . *Nat. Commun.* **2019**, *10*, 1566. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

174. Shalev, A.; Siegrist-Kaiser, C.A.; Yen, P.M.; Wahli, W.; Burger, A.G.; Chin, W.W.; Meier, C.A. The Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Alpha is a Phosphoprotein: Regulation by Insulin. *Endocrinology* **1996**, *137*, 4499–4502. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
175. Chamouton, J.; Latruffe, N. PPAR α /HNF4 α Interplay on Diversified Responsive Elements. Relevance in the Regulation of Liver Peroxisomal Fatty Acid Catabolism. *Curr. Drug Metab.* **2012**, *13*, 1436–1453. [[CrossRef](#)]
176. Scarpulla, R.C. Metabolic Control of Mitochondrial Biogenesis through the PGC-1 Family Regulatory Network. *Biochim. Biophys. Acta* **2011**, *1813*, 1269–1278. [[CrossRef](#)]
177. Hashimoto, T. Individual Peroxisomal Beta-Oxidation Enzymes. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1982**, *386*, 5–12. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
178. Reddy, J.K. Peroxisome Proliferators and Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Alpha: Biotic and Xenobiotic Sensing. *Am. J. Pathol.* **2004**, *164*, 2305–2321. [[CrossRef](#)]
179. Raas, Q.; Gondcaille, C.; Hamon, Y.; Leoni, V.; Caccia, C.; Menetrier, F.; Lizard, G.; Trompier, D.; Savary, S. CRISPR/Cas9-Mediated Knockout of Abcd1 and Abcd2 Genes in BV-2 Cells: Novel Microglial Models for X-Linked Adrenoleukodystrophy. *Biochim. Biophys. Acta Mol. Cell Biol. Lipids* **2019**, *1864*, 704–714. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
180. Dixon, E.D.; Nardo, A.D.; Claudel, T.; Trauner, M. The Role of Lipid Sensing Nuclear Receptors (PPARs and LXR) and Metabolic Lipases in Obesity, Diabetes and NAFLD. *Genes* **2021**, *12*, 645. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
181. Wang, Y.; Nakajima, T.; Gonzalez, F.J.; Tanaka, N. PPARs as Metabolic Regulators in the Liver: Lessons from Liver-Specific PPAR-Null Mice. *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, *21*, 2061. [[CrossRef](#)]
182. Haro, D.; Marrero, P.F.; Relat, J. Nutritional Regulation of Gene Expression: Carbohydrate-, Fat- and Amino Acid-Dependent Modulation of Transcriptional Activity. *Int. J. Mol. Sci.* **2019**, *20*, 1386. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
183. Vega, R.B.; Kelly, D.P. Cardiac Nuclear Receptors: Architects of Mitochondrial Structure and Function. *J. Clin. Investig.* **2017**, *127*, 1155–1164. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
184. Gao, Q.; Jia, Y.; Yang, G.; Zhang, X.; Boddu, P.C.; Petersen, B.; Narsingam, S.; Zhu, Y.-J.; Thimmapaya, B.; Kanwar, Y.S.; et al. PPAR α -Deficient Ob/Ob Obese Mice Become More Obese and Manifest Severe Hepatic Steatosis Due to Decreased Fatty Acid Oxidation. *Am. J. Pathol.* **2015**, *185*, 1396–1408. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
185. Tonsgard, J.H.; Getz, G.S. Effect of Reye's Syndrome Serum on Isolated Chinchilla Liver Mitochondria. *J. Clin. Investig.* **1985**, *76*, 816–825. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
186. Inokuchi-Shimizu, S.; Park, E.J.; Roh, Y.S.; Yang, L.; Zhang, B.; Song, J.; Liang, S.; Pimienta, M.; Taniguchi, K.; Wu, X.; et al. TAK1-Mediated Autophagy and Fatty Acid Oxidation Prevent Hepatosteatosis and Tumorigenesis. *J. Clin. Investig.* **2014**, *124*, 3566–3578. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
187. Park, H.S.; Lim, J.H.; Kim, M.Y.; Kim, Y.; Hong, Y.A.; Choi, S.R.; Chung, S.; Kim, H.W.; Choi, B.S.; Kim, Y.S.; et al. Resveratrol Increases AdipoR1 and AdipoR2 Expression in Type 2 Diabetic Nephropathy. *J. Transl. Med.* **2016**, *14*, 176. [[CrossRef](#)]
188. Wanders, R.J.A.; Ferdinandusse, S.; Brides, P.; Kemp, S. Peroxisomes, Lipid Metabolism and Lipotoxicity. *Biochim. Biophys. Acta* **2010**, *1801*, 272–280. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
189. Pontis, S.; Ribeiro, A.; Sasso, O.; Piomelli, D. Macrophage-Derived Lipid Agonists of PPAR- α as Intrinsic Controllers of Inflammation. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **2016**, *51*, 7–14. [[CrossRef](#)]
190. 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 [Corrected]. *Lab. Investig.* **2010**, *90*, 696–708. [[CrossRef](#)]
191. Qi, W.; Gutierrez, G.E.; Gao, X.; Dixon, H.; McDonough, J.A.; Marini, A.M.; Fisher, A.L. The ω -3 Fatty Acid α -Linolenic Acid Extends Caenorhabditis Elegans Lifespan via NHR-49/PPAR α and Oxidation to Oxylipins. *Aging Cell* **2017**, *16*, 1125–1135. [[CrossRef](#)]
192. Fock, E.; Lavrova, E.; Bachtееva, V.; Nikolaeva, S.; Parnova, R. Suppression of Fatty Acid β -Oxidation and Energy Deficiency as a Cause of Inhibitory Effect of E. Coli Lipopolysaccharide on Osmotic Water Transport in the Frog Urinary Bladder. *Comp. Biochem. Physiol. Part C Toxicol. Pharmacol.* **2019**, *218*, 81–87. [[CrossRef](#)]
193. Ling, Y.; Shi, Z.; Yang, X.; Cai, Z.; Wang, L.; Wu, X.; Ye, A.; Jiang, J. Hypolipidemic Effect of Pure Total Flavonoids from Peel of Citrus (PTFC) on Hamsters of Hyperlipidemia and Its Potential Mechanism. *Exp. Gerontol.* **2020**, *130*, 110786. [[CrossRef](#)]
194. Li, L.-Y.; Lv, H.-B.; Jiang, Z.-Y.; Qiao, F.; Chen, L.-Q.; Zhang, M.-L.; Du, Z.-Y. Peroxisomal Proliferator-Activated Receptor α -b Deficiency Induces the Reprogramming of Nutrient Metabolism in Zebrafish. *J. Physiol.* **2020**, *598*, 4537–4553. [[CrossRef](#)]
195. El Kebbij, Z.; Andreoletti, P.; Mountassif, D.; Kabine, M.; Schohn, H.; Dauca, M.; Latruffe, N.; El Kebbij, M.S.; Cherkaoui-Malki, M. Differential Regulation of Peroxisome Proliferator-Activated Receptor (PPAR)-Alpha 1 and Truncated PPAR Alpha 2 as an Adaptive Response to Fasting in the Control of Hepatic Peroxisomal Fatty Acid Beta-Oxidation in the Hibernating Mammal. *Endocrinology* **2008**, *150*, 1192–1201. [[CrossRef](#)]
196. Braissant, O.; Fufelle, F.; Scotto, C.; Dauca, M.; Wahli, W. Differential Expression of Peroxisome Proliferator-Activated Receptors (PPARs): Tissue Distribution of PPAR-Alpha, -Beta, and -Gamma in the Adult Rat. *Endocrinology* **1996**, *137*, 354–366. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
197. Warden, A.; Truitt, J.; Merriman, M.; Ponomareva, O.; Jameson, K.; Ferguson, L.B.; Mayfield, R.D.; Harris, R.A. Localization of PPAR Isotypes in the Adult Mouse and Human Brain. *Sci. Rep.* **2016**, *6*, 27618. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
198. Mariani, M.M.; Malm, T.; Lamb, R.; Jay, T.R.; Neilson, L.; Casali, B.; Medarametla, L.; Landreth, G.E. Neuronally-Directed Effects of RXR Activation in a Mouse Model of Alzheimer's Disease. *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 42270. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

199. Raso, G.M.; Esposito, E.; Vitiello, S.; Iacono, A.; Santoro, A.; D'Agostino, G.; Sasso, O.; Russo, R.; Piazza, P.V.; Calignano, A.; et al. Palmitoylethanolamide Stimulation Induces Allopregnanolone Synthesis in C6 Cells and Primary Astrocytes: Involvement of Peroxisome-Proliferator Activated Receptor- α . *J. Neuroendocrinol.* **2011**, *23*, 591–600. [[CrossRef](#)]
200. Roy, A.; Jana, M.; Corbett, G.T.; Ramaswamy, S.; Kordower, J.H.; Gonzalez, F.J.; Pahan, K. Regulation of Cyclic AMP Response Element Binding and Hippocampal Plasticity-Related Genes by Peroxisome Proliferator-Activated Receptor α . *Cell Rep.* **2013**, *4*, 724–737. [[CrossRef](#)]
201. Marx, N.; Duez, H.; Fruchart, J.-C.; Staels, B. Peroxisome Proliferator-Activated Receptors and Atherogenesis: Regulators of Gene Expression in Vascular Cells. *Circ. Res.* **2004**, *94*, 1168–1178. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
202. Morinishi, T.; Tokuhara, Y.; Ohsaki, H.; Ibuki, E.; Kadota, K.; Hirakawa, E. Activation and Expression of Peroxisome Proliferator- Activated Receptor Alpha Are Associated with Tumorigenesis in Colorectal Carcinoma. *PPAR Res.* **2019**, *2019*, 7486727. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
203. Kliewer, S.A.; Forman, B.M.; Blumberg, B.; Ong, E.S.; Borgmeyer, U.; Mangelsdorf, D.J.; Umehono, K.; Evans, R.M. Differential Expression and Activation of a Family of Murine Peroxisome Proliferator-Activated Receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1994**, *91*, 7355–7359. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
204. Costet, P.; Legendre, C.; Moré, J.; Edgar, A.; Galtier, P.; Pineau, T. Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Alpha-Isoform Deficiency Leads to Progressive Dyslipidemia with Sexually Dimorphic Obesity and Steatosis. *J. Biol. Chem.* **1998**, *273*, 29577–29585. [[CrossRef](#)]
205. Stec, D.E.; Gordon, D.M.; Hipp, J.A.; Hong, S.; Mitchell, Z.L.; Franco, N.R.; Robison, J.W.; Anderson, C.D.; Stec, D.F.; Hinds, T.D. Loss of Hepatic PPAR α Promotes Inflammation and Serum Hyperlipidemia in Diet-Induced Obesity. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* **2019**, *317*, R733–R745. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
206. Chen, X.; Ward, S.C.; Cederbaum, A.I.; Xiong, H.; Lu, Y. Alcoholic Fatty Liver Is Enhanced in CYP2A5 Knockout Mice: The Role of the PPAR α -FGF21 Axis. *Toxicology* **2017**, *379*, 12–21. [[CrossRef](#)]
207. Francque, S.; Verrijken, A.; Caron, S.; Prawitt, J.; Paumelle, R.; Derudas, B.; Lefebvre, P.; Taskinen, M.-R.; Van Hul, W.; Mertens, I.; et al. PPAR α Gene Expression Correlates with Severity and Histological Treatment Response in Patients with Non-Alcoholic Steatohepatitis. *J. Hepatol.* **2015**, *63*, 164–173. [[CrossRef](#)]
208. Ip, E.; Farrell, G.C.; Robertson, G.; Hall, P.; Kirsch, R.; Leclercq, I. Central Role of PPARalpha-Dependent Hepatic Lipid Turnover in Dietary Steatohepatitis in Mice. *Hepatology* **2003**, *38*, 123–132. [[CrossRef](#)]
209. Patsouris, D.; Reddy, J.K.; Müller, M.; Kersten, S. Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Alpha Mediates the Effects of High-Fat Diet on Hepatic Gene Expression. *Endocrinology* **2006**, *147*, 1508–1516. [[CrossRef](#)]
210. Stienstra, R.; Mandard, S.; Patsouris, D.; Maass, C.; Kersten, S.; Müller, M. Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Alpha Protects against Obesity-Induced Hepatic Inflammation. *Endocrinology* **2007**, *148*, 2753–2763. [[CrossRef](#)]
211. Rando, G.; Tan, C.K.; Khaled, N.; Montagner, A.; Leuenberger, N.; Bertrand-Michel, J.; Paramalingam, E.; Guillou, H.; Wahli, W. Glucocorticoid Receptor-PPAR α Axis in Fetal Mouse Liver Prepares Neonates for Milk Lipid Catabolism. *Elife* **2016**, *5*, e11853. [[CrossRef](#)]
212. Montagner, A.; Polizzi, A.; Fouché, E.; Ducheix, S.; Lippi, Y.; Lasserre, F.; Barquissau, V.; Régnier, M.; Lukowicz, C.; Benhamed, F.; et al. Liver PPAR α Is Crucial for Whole-Body Fatty Acid Homeostasis and Is Protective against NAFLD. *Gut* **2016**, *65*, 1202–1214. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
213. Polizzi, A.; Fouché, E.; Ducheix, S.; Lasserre, F.; Marmugi, A.P.; Mselli-Lakhal, L.; Loiseau, N.; Wahli, W.; Guillou, H.; Montagner, A. Hepatic Fasting-Induced PPAR α Activity Does Not Depend on Essential Fatty Acids. *Int. J. Mol. Sci.* **2016**, *17*, 1624. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
214. Régnier, M.; Polizzi, A.; Lippi, Y.; Fouché, E.; Michel, G.; Lukowicz, C.; Smati, S.; Marrot, A.; Lasserre, F.; Naylies, C.; et al. Insights into the Role of Hepatocyte PPAR α Activity in Response to Fasting. *Mol. Cell. Endocrinol.* **2018**, *471*, 75–88. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
215. Brocker, C.N.; Patel, D.P.; Velenosi, T.J.; Kim, D.; Yan, T.; Yue, J.; Li, G.; Krausz, K.W.; Gonzalez, F.J. Extrahepatic PPAR α Modulates Fatty Acid Oxidation and Attenuates Fasting-Induced Hepatosteatosis in Mice. *J. Lipid Res.* **2018**, *59*, 2140–2152. [[CrossRef](#)]
216. Jordan, S.; Tung, N.; Casanova-Acebes, M.; Chang, C.; Cantoni, C.; Zhang, D.; Wirtz, T.H.; Naik, S.; Rose, S.A.; Brocker, C.N.; et al. Dietary Intake Regulates the Circulating Inflammatory Monocyte Pool. *Cell* **2019**, *178*, 1102–1114.e17. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
217. Régnier, M.; Polizzi, A.; Smati, S.; Lukowicz, C.; Fougerat, A.; Lippi, Y.; Fouché, E.; Lasserre, F.; Naylies, C.; Bétoulières, C.; et al. Hepatocyte-Specific Deletion of Ppar α Promotes NAFLD in the Context of Obesity. *Sci. Rep.* **2020**, *10*, 6489. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
218. Batatinha, H.A.P.; Lima, E.A.; Teixeira, A.A.S.; Souza, C.O.; Biondo, L.A.; Silveira, L.S.; Lira, F.S.; Rosa Neto, J.C. Association Between Aerobic Exercise and Rosiglitazone Avoided the NAFLD and Liver Inflammation Exacerbated in PPAR- α Knockout Mice. *J. Cell. Physiol.* **2017**, *232*, 1008–1019. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
219. Brocker, C.N.; Yue, J.; Kim, D.; Qu, A.; Bonzo, J.A.; Gonzalez, F.J. Hepatocyte-Specific PPARA Expression Exclusively Promotes Agonist-Induced Cell Proliferation without Influence from Nonparenchymal Cells. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* **2017**, *312*, G283–G299. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
220. Stanley, W.C.; Recchia, F.A.; Lopaschuk, G.D. Myocardial Substrate Metabolism in the Normal and Failing Heart. *Physiol. Rev.* **2005**, *85*, 1093–1129. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
221. Kaimoto, S.; Hoshino, A.; Ariyoshi, M.; Okawa, Y.; Tateishi, S.; Ono, K.; Uchihashi, M.; Fukai, K.; Iwai-Kanai, E.; Matoba, S. Activation of PPAR- α in the Early Stage of Heart Failure Maintained Myocardial Function and Energetics in Pressure-Overload Heart Failure. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **2017**, *312*, H305–H313. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

222. Di Paola, R.; Cordaro, M.; Crupi, R.; Siracusa, R.; Campolo, M.; Bruschetta, G.; Fusco, R.; Pugliatti, P.; Esposito, E.; Cuzzocrea, S. Protective Effects of Ultramicrosized Palmitoylethanolamide (PEA-Um) in Myocardial Ischaemia and Reperfusion Injury in VIVO. *Shock* **2016**, *46*, 202–213. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
223. Standage, S.W.; Waworuntu, R.L.; Delaney, M.A.; Maskal, S.M.; Bennion, B.G.; Duffield, J.S.; Parks, W.C.; Liles, W.C.; McGuire, J.K. Nonhematopoietic Peroxisome Proliferator-Activated Receptor- α Protects Against Cardiac Injury and Enhances Survival in Experimental Polymicrobial Sepsis. *Crit. Care Med.* **2016**, *44*, e594–e603. [[CrossRef](#)]
224. Yammine, A.; Namsi, A.; Vervandier-Fasseur, D.; Mackrill, J.J.; Lizard, G.; Latruffe, N. Polyphenols of the Mediterranean Diet and Their Metabolites in the Prevention of Colorectal Cancer. *Molecules* **2021**, *26*, 3483. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
225. Castrejón-Tellez, V.; Rodríguez-Pérez, J.M.; Pérez-Torres, I.; Pérez-Hernández, N.; Cruz-Lagunas, A.; Guarner-Lans, V.; Vargas-Alarcón, G.; Rubio-Ruiz, M.E. The Effect of Resveratrol and Quercetin Treatment on PPAR Mediated Uncoupling Protein (UCP)-1, 2, and 3 Expression in Visceral White Adipose Tissue from Metabolic Syndrome Rats. *Int. J. Mol. Sci.* **2016**, *17*, 1069. [[CrossRef](#)]
226. Zhou, Y.; Lin, S.; Zhang, L.; Li, Y. Resveratrol Prevents Renal Lipotoxicity in High-Fat Diet-Treated Mouse Model through Regulating PPAR- α Pathway. *Mol. Cell. Biochem.* **2016**, *411*, 143–150. [[CrossRef](#)]
227. Barone, R.; Rizzo, R.; Tabbì, G.; Malaguarnera, M.; Frye, R.E.; Bastin, J. Nuclear Peroxisome Proliferator-Activated Receptors (PPARs) as Therapeutic Targets of Resveratrol for Autism Spectrum Disorder. *Int. J. Mol. Sci.* **2019**, *20*, 1878. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
228. Fantacuzzi, M.; De Filippis, B.; Amoroso, R.; Giampietro, L. PPAR Ligands Containing Stilbene Scaffold. *Mini Rev. Med. Chem.* **2019**, *19*, 1599–1610. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
229. Bastin, J.; Djouadi, F. Resveratrol and Myopathy. *Nutrients* **2016**, *8*, 254. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
230. Sun, X.; Yamasaki, M.; Katsube, T.; Shiwaku, K. Effects of Quercetin Derivatives from Mulberry Leaves: Improved Gene Expression Related Hepatic Lipid and Glucose Metabolism in Short-Term High-Fat Fed Mice. *Nutr. Res. Pract.* **2015**, *9*, 137–143. [[CrossRef](#)]
231. Wang, L.L.; Zhang, Z.C.; Hassan, W.; Li, Y.; Liu, J.; Shang, J. Amelioration of Free Fatty Acid-Induced Fatty Liver by Quercetin-3-O- β -D-Glucuronide through Modulation of Peroxisome Proliferator-Activated Receptor-Alpha/Sterol Regulatory Element-Binding Protein-1c Signaling. *Hepatol. Res.* **2016**, *46*, 225–238. [[CrossRef](#)]
232. Chen, D.; Daniel, K.G.; Kuhn, D.J.; Kazi, A.; Bhuiyan, M.; Li, L.; Wang, Z.; Wan, S.B.; Lam, W.H.; Chan, T.H.; et al. Green Tea and Tea Polyphenols in Cancer Prevention. *Front. Biosci.* **2004**, *9*, 2618–2631. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
233. Zhang, S.; Yang, X.; Luo, J.; Ge, X.; Sun, W.; Zhu, H.; Zhang, W.; Cao, J.; Hou, Y. PPAR α Activation Sensitizes Cancer Cells to Epigallocatechin-3-Gallate (EGCG) Treatment via Suppressing Heme Oxygenase-1. *Nutr. Cancer* **2014**, *66*, 315–324. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
234. Yang, H.; Zuo, X.Z.; Tian, C.; He, D.L.; Yi, W.J.; Chen, Z.; Zhang, P.W.; Ding, S.B.; Ying, C.J. Green Tea Polyphenols Attenuate High-Fat Diet-Induced Renal Oxidative Stress through SIRT3-Dependent Deacetylation. *Biomed. Environ. Sci.* **2015**, *28*, 455–459. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
235. Chen, J.-W.; Kong, Z.-L.; Tsai, M.-L.; Lo, C.-Y.; Ho, C.-T.; Lai, C.-S. Tetrahydrocurcumin Ameliorates Free Fatty Acid-Induced Hepatic Steatosis and Improves Insulin Resistance in HepG2 Cells. *J. Food Drug Anal.* **2018**, *26*, 1075–1085. [[CrossRef](#)]
236. Rimando, A.M.; Khan, S.I.; Mizuno, C.S.; Ren, G.; Mathews, S.T.; Kim, H.; Yokoyama, W. Evaluation of PPAR α Activation by Known Blueberry Constituents. *J. Sci. Food Agric.* **2016**, *96*, 1666–1671. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
237. Vitaglione, P.; Mazzone, G.; Lembo, V.; D'Argenio, G.; Rossi, A.; Guido, M.; Savoia, M.; Salomone, F.; Mennella, I.; De Filippis, F.; et al. Coffee Prevents Fatty Liver Disease Induced by a High-Fat Diet by Modulating Pathways of the Gut-Liver Axis. *J. Nutr. Sci.* **2019**, *8*, e15. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
238. Bigagli, E.; Toti, S.; Lodovici, M.; Giovannelli, L.; Cinci, L.; D'Ambrosio, M.; Luceri, C. Dietary Extra-Virgin Olive Oil Polyphenols Do Not Attenuate Colon Inflammation in Transgenic HLAB-27 Rats but Exert Hypocholesterolemic Effects through the Modulation of HMGR and PPAR- α Gene Expression in the Liver. *Lifestyle Genom.* **2018**, *11*, 99–108. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
239. Pirozzi, C.; Lama, A.; Simeoli, R.; Paciello, O.; Pagano, T.B.; Mollica, M.P.; Di Guida, F.; Russo, R.; Magliocca, S.; Canani, R.B.; et al. Hydroxytyrosol Prevents Metabolic Impairment Reducing Hepatic Inflammation and Restoring Duodenal Integrity in a Rat Model of NAFLD. *J. Nutr. Biochem.* **2016**, *30*, 108–115. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
240. Valenzuela, R.; Illesca, P.; Echeverría, F.; Espinosa, A.; Rincón-Cervera, M.Á.; Ortiz, M.; Hernandez-Rodas, M.C.; Valenzuela, A.; Videla, L.A. Molecular Adaptations Underlying the Beneficial Effects of Hydroxytyrosol in the Pathogenic Alterations Induced by a High-Fat Diet in Mouse Liver: PPAR- α and Nrf2 Activation, and NF-KB down-Regulation. *Food Funct.* **2017**, *8*, 1526–1537. [[CrossRef](#)]
241. 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 α , (PGC-1 α), Peroxisome Proliferator-Activated Receptor α (PPAR α) and Estrogen Related Receptor α (ERR α). *Biochim. Open* **2015**, *1*, 51–59. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
242. Chen, X.; Wang, Q.; Shao, M.; Ma, L.; Guo, D.; Wu, Y.; Gao, P.; Wang, X.; Li, W.; Li, C.; et al. Ginsenoside Rb3 Regulates Energy Metabolism and Apoptosis in Cardiomyocytes via Activating PPAR α Pathway. *Biomed. Pharmacother.* **2019**, *120*, 109487. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

243. Zhang, C.; Deng, J.; Liu, D.; Tuo, X.; Xiao, L.; Lai, B.; Yao, Q.; Liu, J.; Yang, H.; Wang, N. Nuciferine Ameliorates Hepatic Steatosis in High-Fat Diet/Streptozocin-Induced Diabetic Mice through a PPAR α /PPAR γ Coactivator-1 α Pathway. *Br. J. Pharmacol.* **2018**, *175*, 4218–4228. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
244. Yu, H.; Li, C.; Yang, J.; Zhang, T.; Zhou, Q. Berberine Is a Potent Agonist of Peroxisome Proliferator Activated Receptor Alpha. *Front. Biosci.* **2016**, *21*, 1052–1060. [[CrossRef](#)]

3. Les maladies peroxysomales

3.1. Les conséquences de la déficience en β -oxydation peroxysomale

Les lipides représentent un facteur limitant nécessaire pour le développement neuronal, la plasticité et l'intégrité des fonctions synaptiques (Adibhatla et Hatcher 2008; Tsui-Pierchala et al. 2002). Un métabolisme lipidique déficient contribue à la pathogenèse de différentes maladies neurodégénératives telle que la maladie d'Alzheimer (Q. Liu et Zhang 2014; Q. Liu et al. 2010), la maladie de Parkinson (G. Lin et al. 2018; 2019) et différentes pathologies associées au dysfonctionnement (Chrast et al. 2011; Toshniwal et Zarling 1992). Un dysfonctionnement de la voie de β -oxydation peroxysomale des lipides entraîne un déficit dans certains lipides endogènes tels que le DHA et le cholestérol ainsi qu'une accumulation toxique des acides gras à longues chaînes dans le plasma et les tissus (Stradomska 2018). Les précédentes études montrent que la présence des peroxysomes dans les oligodendrocytes est nécessaire pour la protection des axons et leur gaine de myéline (Baes et Aubourg 2009). Une voie de β -oxydation dérégulée se traduit par des maladies pathologiques rares et sévères touchant le plus souvent les enfants en bas âge. La démyélinisation dans les leucodystrophies (altération de la matière blanche) a pour conséquence une conduction nerveuse défailante, une axonopathie et une mort cellulaire des astrocytes et des oligodendrocytes. Ces altérations sont accompagnées par avec une dérégulation importante du calcium intracellulaire et une réduction du potentiel membranaire des mitochondries dans les oligodendrocytes causant une destruction et une inflammation locale du système nerveux central (Kassmann et al. 2007). Les organes les plus vulnérables à ces attaques sont le foie les reins et les glandes surrénales, où les peroxysomes sont bien présents en nombre. Les travaux montrent que chez les souris K.O. déficients en peroxysomes fonctionnels présentent une démyélinisation du système nerveux central (Kassmann et al. 2007).

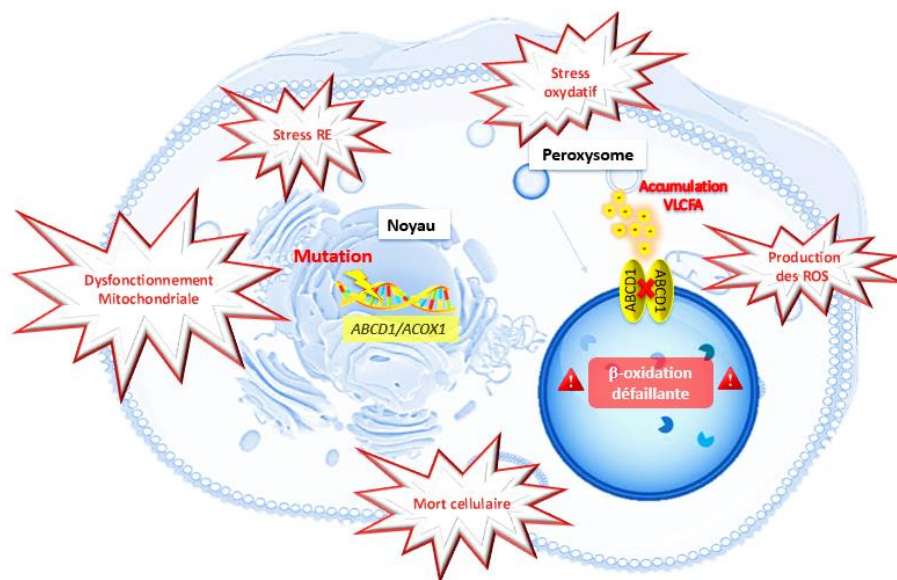


Figure 11 : Illustration schématique des mécanismes moléculaires associés à la pathogenèse X-ALD et à la déficience en ACOX1. Une mutation au niveau du gène ABCD1, code pour une protéine de transport inopérante qui bloque le transport de VLCFA au peroxysoxe. L'absence de la protéine ACOX1 enzyme clé de la dégradation des VLCFA provoque une défaillance de la β-oxydation ce qui entraîne une accumulation de ces dernières dans les cellules. Ce qui impacte d'autres fonctions biologiques et cause un dysfonctionnement mitochondrial, stress oxydatif, Stress du RE et puis mort cellulaire. ABCD1, ATP binding cassette subfamily D member 1; ACOX1, acyl CoA oxydase 1; ER, Reticulum endoplasmique; ROS, reactive oxygen species; VLCFA, very long chain fatty acid.

3.2. Les leucodystrophies

Les maladies neurodégénératives comme les leucodystrophies liées aux dysfonctionnements peroxysoyaux sont des pathologies rares caractérisées par une démence progressive et la détérioration des fonctions cognitives. Aujourd'hui, hormis la greffe allogénique de cellules souches hématopoïétiques (allo-CSH) (Cartier et al. 2009) aucune thérapie ciblée n'est disponible. Les micronutriments présents dans l'alimentation pourraient retarder l'apparition de ces maladies neurodégénératives ou diminuer leurs progressions en ciblant les causes pathologiques par leurs propriétés antioxydantes, anti-inflammatoires et anti-amyloïdogènes (Farzaei et al. 2018). Les maladies X-ALD et déficience en ACOX1 sont des maladies neurodégénératives associées aux déficiences dans la dégradation des acides gras par β-oxydation peroxysoyale, et possèdent des caractéristiques communes (Eaton et al. 1996; Poirier et al. 2006; Wanders et al. 2010). Chez l'homme, la déficience en ACOX1 (OMIM# 264470 ; appelée

également la leucodystrophie pseudo-néonatale) est une maladie autosomique récessive qui cause une perte rapide et sévère de la fonction cérébrale (Ferdinandusse et al. 2007). Cette maladie rare est associée à la déficience d'une enzyme peroxysomale de la β -oxydation l'ACOX1 (El Hajj et al. 2012). Les nouveaux nés avec une déficience en ACOX1 développent un retard de croissance et souffrent d'une détérioration du système neurologique, des convulsions, avec une perte progressive des habilités d'apprentissage, et d'expression (dyslexie, aphasie) notamment entre l'âge de 1 et 3 ans (Ferdinandusse et al. 2007). Leurs états de santé se compliquent avec le temps, et développent également des réflexes exacerbés. Cette déficience se traduit également par une surdité, une hypotonie, une apnée, une dysphagie, une dégénération de la rétine, une hépatomégalie (**Figure 12**), et une augmentation du taux d'AGTLC dans le plasma et les tissus (Fournier et al. 1994) (Suzuki et al. 2002) (**Figure 11**). La plupart des enfants ayant la déficience peroxysomale ACOX1 décèdent à un âge se situant entre 5 et 10 ans (Ferdinandusse et al. 2007).

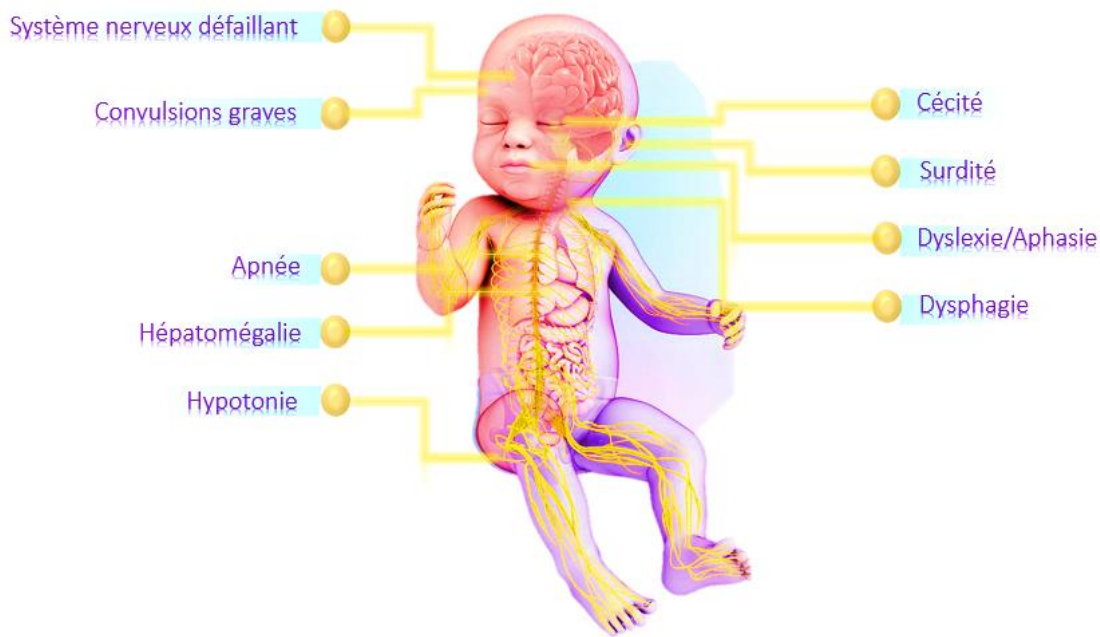


Figure 12: Les symptômes liés aux maladies de leucodystrophies. Les symptômes liés aux déficiences peroxysomales apparaissent à un âge précoce et se manifestent sous forme de troubles dans les activités sensoriels et vitales de l'organisme. Dans la figure chaque symptôme est lié à l'organe altéré de l'organisme humain.

L'x-ALD est causée par des mutations au niveau du gène *ABCD1* (**Figure 11**) localisé sur le chromosome Xq28.1 codant pour ABCD1 (ALDP) qui participe à l'entrée du AGTLC-CoA

dans le peroxyosome (Genin et al. 2011). Depuis la découverte de l'x-ALD, 3698 variants ont été rapportées (faux sens, décalage du cadre de lecture, non-sens, et large délétion...etc) et sont décrits dans la base de données <http://www.x-ald.nl> (Pereira et al. 2012).

4. La microglie

Découvertes pour la première fois en 1856 par Rudolf Virchow (Virchow 1856), les microglies, étaient définies comme une population cellulaire du cerveau différentes des cellules neuronales (Wolf et al. 2017; Hoeffel et Ginhoux 2015). Appelées microgliocytes par Rio Hortega, elles proviennent du mésoderme et plus spécifiquement à partir du pool de macrophages primitives de la vésicule vitelline qui apparaisse chez la souris au 8,5^{ème} jour de la phase embryonnaire (E) (Wolf et al. 2017; Hoeffel et Ginhoux 2015). Chez l'être humain, les cellules microgliales peuvent être détectées dans la 13^{ème} semaine de la période de gestation alors que les microglies ramifiées sont détectées dans la 21^{ème} semaine. Les cellules microgliales sont présentes dans les zones sous-granulaires et sous-ventriculaires du cerveau mature (Sato 2015; Ribeiro Xavier et al. 2015). Ces cellules représentent entre 5 à 20% des cellules gliales du SNC et forment les sentinelles du système immunitaire par leurs capacités à détecter toutes anomalies ou lésions au sein du parenchyme cérébral (Mecca et al. 2018). La microglie a une origine mésodermique contrairement aux autres cellules du système nerveux central provenant du neuroectoderme et peut être assimilée aux leucocytes (Nayak et al. 2014). Les microglies sont les médiateurs primaires du système de défense immunitaire au niveau de la SNC et un élément crucial pour la réponse inflammatoire. Les microglies se sont des cellules résidentes, immunocompétentes et hyper-dynamiques du cerveau, qui contribuent amplement au maintien de l'intégrité du réseau neuronal (neurogenèse) (Wolf et al. 2017) ainsi que la réparation des dommages causés aux cellules (Prinz et Priller 2014). Les microglies se distinguent des macrophages tissulaires en raison de leur phénotype homéostatique unique et leur stricte régulation. Elles sont responsables de l'élimination des micro-organismes, cellules mortes/cellules apoptotiques, les synapses redondantes, les agrégats de protéines et d'autres particules et d'antigènes solubles qui peuvent endommager le SNC (Colonna et Butovsky 2017). La principale cascade de signalisation par laquelle les cellules microgliales interagissent avec le réseau neuronal pour induire la mort cellulaire est médiée par TNF α (tumor necrosis factor- α). Une autre cascade de signalisation aboutie à la production du superoxyde dismutase 1 pendant

le métabolisme oxydatif. Les microglies participent au développement neuronal par la délivrance des précurseurs neuronaux impliqués dans la prolifération et la survie des neurones (Wolf et al. 2017). Les cellules microgliales reconnaissent les cellules apoptotiques, et migrent vers différentes régions du SNC soit avant soit durant le pic de l'apoptose (Wolf et al. 2017). Les microglies sont activées par différents événements pathologiques déstabilisant l'homéostasie du cerveau, comme des particules immuno-pathogènes et des neurotoxines. Elles libèrent des médiateurs pro-inflammatoires tels que le NO (oxyde nitrique) et les ROS (les espèces réactives d'oxygène) ainsi que des cytokines inflammatoires (X. Chen et al. 2012). Le processus d'activation est hautement diversifié et dépend du contexte et du type de l'élément de stress ou de la pathologie. Elles orchestrent l'immunité au niveau du système nerveux par l'interaction avec d'autres cellules immunitaires infiltrantes. Les microglies ont diverses actions en intervenant depuis le niveau du développement synaptique jusqu'aux effets cytotoxiques liés à une maladie du SNC. Des travaux *in vitro* indiquent que l'IL-6 libérée par les cellules microgliales peut entraîner l'apoptose des neuroblastes (Wolf et al. 2017). Elle sont impliquées dans la phagocytose au niveau cérébral, et le blocage de la phagocytose des microglies augmente le nombre de cellules neurales progénitrice (NPCs) apoptotiques (neural progenitor cells) (Wolf et al. 2017). Ces NPC sont cellules multipotentes qui peuvent se différencier en cellules gliales (astrocytes, oligodendrocytes) ou en neurones. Les cellules microgliales immortalisées utilisées le plus souvent dans les études mécanistiques sont une lignée de cellules murines (BV-2), générée en infectant les cultures de cellules microgliales primaires de souris avec un oncogène *v-raf/v-myc* portant un rétrovirus (J2). L'infection *in vitro* des cellules par le virus J2 génère une lignée cellulaire présentant des propriétés morphologiques phénotypiques et fonctionnelles similaires aux cellules microgliales actives (McCarthy et al. 2016).

Les cellules BV-2 microgliales sont des macrophages résidentes immunocompétentes du système nerveux central. Ces cellules originaires du mésoderme/mésenchyme migrent et forment des sentinelles dans toutes les régions du SNC, se propagent à travers le parenchyme cérébral et développe un phénotype morphologique bien spécifique ramifié de repos (**Figure 13**). Les fonctions de scan et d'inspection assurés par les microglies exigent une forte motilité cellulaire (Streit et al. 2014).

Au biais d'une pléthore de voies de signalisation que les cellules microgliales communiquent avec les neurones et d'autres cellules du système immunitaire. Les microglies sont considérées comme les plus sensibles détecteurs des pathologies cérébrales. A chaque détection d'un signe de lésion cérébral ou de dysfonctionnement du système nerveux, les cellules microgliales subissent un processus d'activation complexe de plusieurs étapes pour devenir des "cellules microgliales activées". Cette forme cellulaire a la capacité de libérer des substances à effet néfaste ou bénéfique pour les cellules environnantes. Les cellules microgliales activées peuvent migrer vers le site de la lésion, proliférer et phagocyter les cellules et les compartiments cellulaires (Streit et al. 2014). Dans les leucodystrophies neurodégénératives peroxysomales liées à la déficience en ABCD1 ou en ACOX1, l'altération des cellules microgliales joue un rôle majeur dans le développement de la pathologie et son aggravation. Grâce à la méthode d'édition génique CRISPR/Cas9, notre laboratoire a pu établir des modèles cellulaires pour étudier l'impact des déficiences peroxysomales sur les cellules microgliales BV-2 murines (Raas, Saih, et al. 2019; Raas, Gondcaille, et al. 2019).

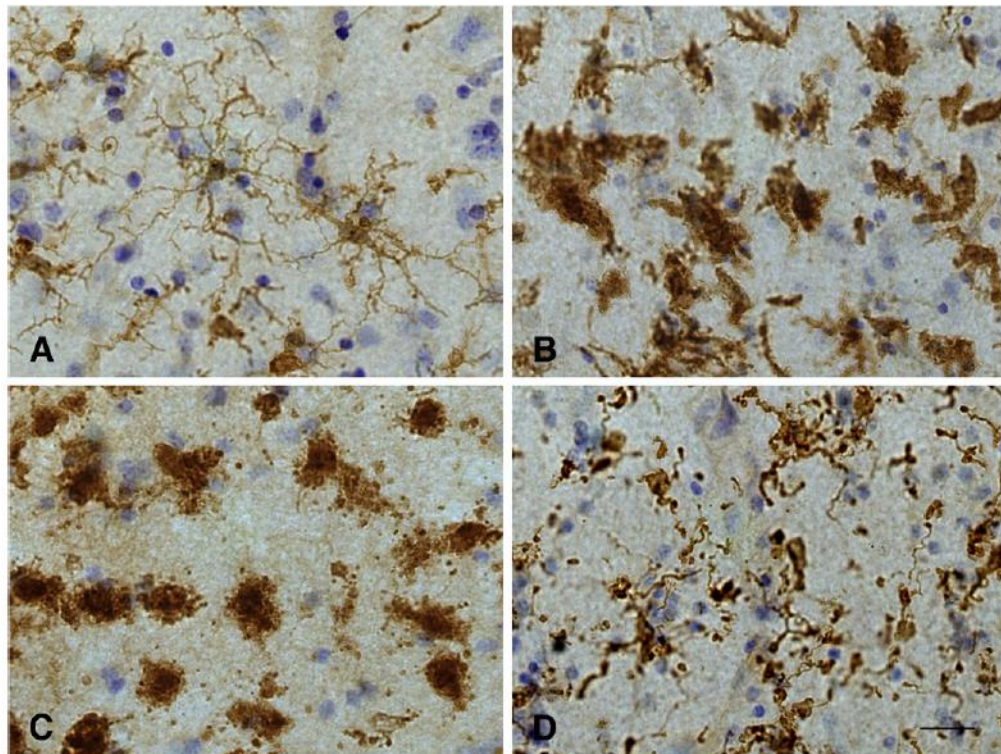


Figure 13: Les différents états cellulaires fonctionnels de la microglie peut être défini à partir du phénotype morphologique. A. Une microglie ramifiée montre des prolongations cytoplasmiques ramifiées, avec lesquelles, elle explore son microenvironnement. B, Des microglies activées avec des prolongations cytoplasmiques contractées et s'agrandit à cause de l'accumulation des organites et augmentation de l'activité métabolique. C, Microglies en mode phagocytaire apparaissent souvent sous forme de macrophages arrondie du cerveau. D, microglie dystrophique, la plupart se caractérisent par des prolongations cytoplasmiques perlées, tordus ou fragmentés. Cortex cérébral humain coloré avec l'anticorps Iba1. Barre = 20 μ m.(Streit et al. 2014)

5. Rôle de l'inflammation

L'inflammation joue un rôle clé dans le maintien de l'homéostasie par des voies de signalisation aboutissant à la destruction des agents pathogènes et à la réparation de lésions tissulaires (Medzhitov 2008; Talaat et al. 2015). L'inflammation persistante et excessive est associée à plusieurs maladies chroniques liées à des dérégulations du système immunitaire telles que l'arthrite, l'asthme, l'athérosclérose, les maladies auto-immunes, le diabète, le cancer, le vieillissement (senescence), les maladies neurodégénératives et les inflammations intestinales (McInnes et Schett 2007; Shin et al. 2014). Malgré les efforts déployés pour développer des traitements anti-inflammatoires efficaces et avec moins d'effets secondaires, l'utilisation des substances antiinflammatoires disponibles sur le marché comme les stéroïdes et les anti-inflammatoires non-stéroïdiens (NSAIDs) est limitée par l'existence des effets secondaires ou le manque de sélectivité. La molécule d'oxyde nitrique NO est importante dans les événements d'immun-modulation permettant la suppression des agents pathogènes par la génération des espèces réactives de nitrogènes toxiques (RNS) comme la peroxyde nitrite (Wink et al. 2011). De plus, le NO participe activement à l'amplification de l'inflammation via l'expression des gènes pro-inflammatoires comme les cytokines (H. Lee et al. 2015) et module la physiologie cellulaire par les modifications post-traductionnelles des protéines cellulaires (Fortin et al. 2010). Le NO joue le rôle de molécule de signalisation cellulaire et intervient dans différents processus de régulation de voies métaboliques et du métabolisme énergétique tel que le métabolisme de lipides et de glucides ainsi que dans les conditions d'inflammation (Anavi et Tirosh 2020). Des études(Shinozaki et al. 2011; Farghali et al. 2008) prouvent l'implication de l'iNOS dans les processus métabolique dans les cellules immunitaires et non immunitaires (Anavi et Tirosh 2020). Le NO est synthétisé à partir de la L-arginine sous l'action de l'oxyde nitrique synthase (NOS), cette dernière forme une famille d'enzymes et comprend trois isoformes : l'eNOS (NOS

endothéliale), la nNOS (NOS neuronal) et l'iNOS (NOS inductible). Le NO produit par l'iNOS est associé au développement et la pathogenèse de différentes maladies, comme l'insulinorésistance, l'obésité et les maladies du système cardiovasculaire. La synthèse du NO est initiée en réponse à des stimuli de stress oxydant ou d'infection, et est produit excessivement pendant l'inflammation (Tsai et al. 2014). Les maladies comme le cancer, l'arthrite, le choc septique et l'accident ischémique cérébrale, sont souvent associées à la génération excessive de NO et l'augmentation d'expression de la protéine iNOS (Fortin et al. 2010; Garcia-Bonilla et al. 2014). Différentes voies de signalisation comme celles de NF- κ B (Nuclear factor- κ B) et de MAPK (mitogen-activated protein kinase) sont impliquées dans la régulation d'iNOS (J. Kim et al. 2010; Pautz et al. 2010). Ces voies de signalisation sont interconnectées avec d'autres activités biologiques de la cellule (Perkins 2007; Roux et Blenis 2004) ce qui complique le processus de développement des médicaments anti-inflammatoires sélectifs.

5.1. Les médiateurs d'inflammation

L'inflammation est un processus complexe mais nécessaire pour la réponse biologique d'un organisme aux stimuli physiques et chimiques. Elle est généralement décrite comme un système composé de deux phases chevauchantes aiguë et chronique (Gabay et Kushner 1999). Dans la phase aiguë, les lymphocytes et les granulocytes primaires migrent tout au long d'un gradient chimiotactique jusqu'au site de l'inflammation grâce aux cytokines, et aux protéines de la phase aiguë. Le but étant d'éliminer l'élément déclencheur de l'inflammation ou les cellules endommagées et d'initier le processus de réparation (Coussens et Werb 2002). Cela dépend du degré d'inflammation, parfois la phase aiguë est suffisamment efficace pour soulager et remédier la lésion. L'inflammation persistante chronique est causée par une exposition prolongée à un stimulus inflammatoire ou une réaction exacerbée envers des constituants de l'organisme, comme dans le cas des maladies auto-immunes. Elle peut entraîner une phase chronique, où les cellules immunitaires actives se différencient en phénotype mononucléaire, générant ainsi des lésions tissulaires causant ainsi une fibrose (Germolec et al. 2018).

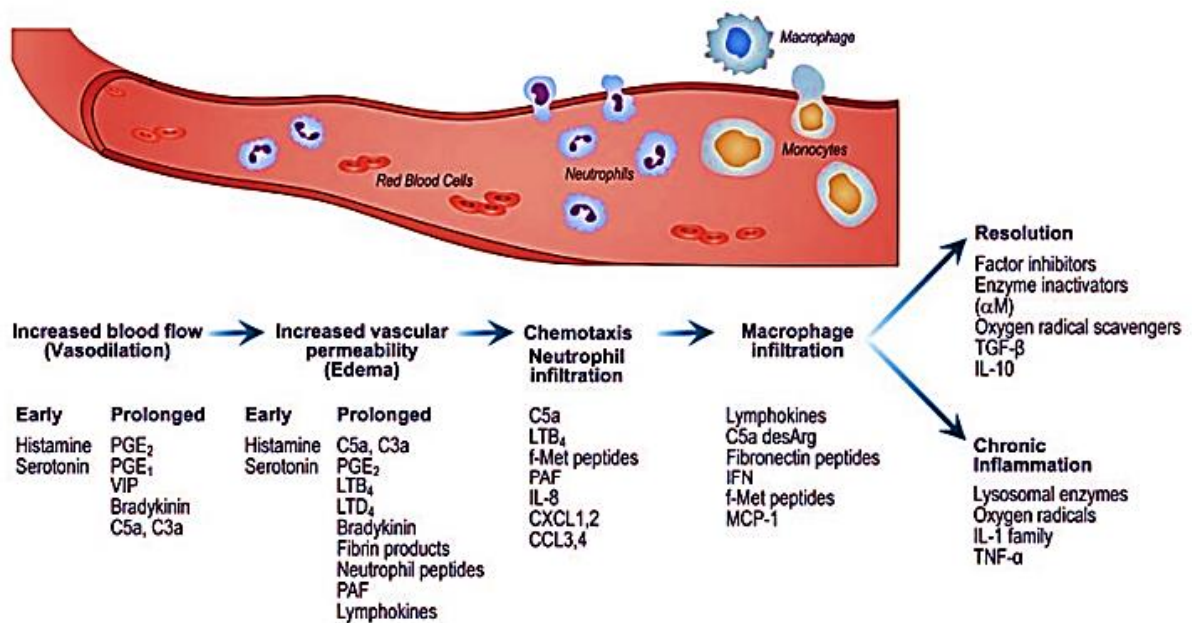


Figure 14: Les médiateurs du processus d'inflammation. Cette figure résume le rôle de différents médiateurs dans le processus de l'inflammation de la phase aiguë à la phase chronique. Abréviations : PGE prostaglandin E, VIP vasoactive intestinal polypeptide, LTB leukotriene B, LTD leukotriene D, PAF platelet-activating factor, IL interleukin, CXCL chemokine (C-X-C motif) ligand, CCL CC chemokine ligand, IFN interferon, MCP monocyte chemoattractant protein, TGF transforming growth factor, TNF tumor necrosis factor (d'après Germolec et al. 2018).

Le mécanisme de l'inflammation représente une chaîne de réponses organisées et dynamiques incluant des événements cellulaires et vasculaires avec des sécrétions humorales spécifiques (**Figure 14**). Ces voies impliquent un changement physique de localisation des globules blancs (monocytes, basophiles, éosinophiles et neutrophiles), plasma et liquides au site d'inflammation (Abdulkhaleq et al. 2018). Un groupe de médiateurs sont sécrétés ainsi que d'autres molécules de signalisation (p. ex. histamine, prostaglandines, leucotriènes, radicaux libres dérivés d'oxygène et d'azote et sérotonine) qui sont libérées par des cellules de défense immunitaires (Anwikar et Bhitre 2010).

5.1.1. Les médiateurs solubles de la réponse inflammatoire

Les cytokines jouent le rôle de messagers moléculaires afin de coordonner et orchestrer l'interaction et le contrôle entre différents types cellulaires contribuant à l'amplification et la régulation des réponses immunitaires et inflammatoires. Une seule cytokine peut affecter tout un réseau cellulaire et cibler plusieurs voies moléculaires à la fois et peut avoir un effet autocrine ou paracrine tout dépend de la cible (Turner et al. 2014). Dans le cas d'une réponse immunitaire innée, les cytokines sont principalement sécrétées par les cellules phagocytaires et les cellules NK, mais dans le cas de la réponse immunitaire adaptative, elles sont produites par les cellules présentatrices de l'antigène (APCs) et les lymphocytes. Mais il y a toujours une interconnexion entre les deux systèmes immunitaire adaptatif et inné, et les cytokines contribuent majoritairement à cette intercommunication (Chaplin 2010). La balance entre une réponse immunitaire efficace et une lésion tissulaire dépend de la régulation minutieuse du réseau de cytokines. Les cytokines ont une demie vie courte et la majorité de ces médiateurs solubles sont éliminées rapidement pour désactiver leurs effets inflammatoires. Les cytokines et les chimiokines, contribuent à l'inflammation par différents mécanismes comme la facilitation de la chimiotaxie des leucocytes vers le site d'inflammation, la modulation de la fonction des cellules immunitaires, et la stimulation de la prolifération et la différenciation des cellules immunitaires. Les cytokines les mieux connues dans la stimulation et la persistance des réponses inflammatoires sont : l'IL-6, l'IL-1, l'IL-2, le TNF- α , l'IFN- γ (interféron gamma), et le TGF- β (transforming growth factor beta) (Turner et al. 2014; Akdis et al. 2016). Les cytokines sécrétées IL-1 β , IL-8, TNF- α (tumor necrosis factor alpha), IL-6, et IL-12 sont les plus remarquablement impliquées dans les réactions inflammatoires (Rubin et Reisner 2014). La toxicité inflammatoire chez l'espèce animal est le plus souvent attribuée à la sécrétion d'IL1 β , d'IL-6, et de TNF- α causée par l'exposition au LPS des éléments pathogènes (Shivachandra et al. 2011).

5.1.1.1. IL-6

IL-6 est exprimé par différentes cellules telles que les phagocytes mononucléaires, les lymphocytes T, les lymphocytes B, et les fibroblastes. Les cellules non immunitaires peuvent aussi sécréter IL-6, comme les hépatocytes pendant la phase aigüe de la réponse inflammatoire. La cytokine IL-6 était identifiée auparavant comme un facteur de différenciation cellulaire des lymphocytes B, due à son rôle critique dans la maturation des lymphocytes B responsables de la production des anticorps. L'IL-6 est aussi important pour l'activation et la différenciation des

lymphocytes T. En plus, elle joue le rôle de médiateur des étapes initiales de la réponse inflammatoire aiguë, et son taux reste élevé pendant la phase chronique de l'inflammation (Turner et al. 2014; Akdis et al. 2016; Norris et al. 2014). L'IL-6 est un membre de la famille des cytokines IL-6, qui comprend le Facteur inhibiteur de la leucémie (LIF), Le facteur neurotrophique ciliaire (CNTF), et l'oncostatine M (OSM). Elle est une cytokine pléiotrope multifonctionnelle impliquée dans la régulation des réponses immunitaires aiguës, hématopoïèses et inflammation. Elle est produite par les cellules endothéliales, les fibroblastes, les monocytes et les macrophages en réponse à différents stimuli (IL-1, IL-17, et TNF- α) pendant une inflammation systémique. Au cas d'une réponse immunitaire innée, IL-6 orchestre la migration cellulaire des leucocytes et leurs activations, induit la production des protéines de la phase aiguë par les hépatocytes, favorise la prolifération des lymphocytes T et la différenciation et la survie des lymphocytes ainsi que la production des anticorps IgG, IgA, et IgM (Hirano et al. 1985).

5.1.1.2. IL-1

La famille des cytokines IL-1 contient 11 différents membres qui ont tous des effets pro-inflammatoire direct et indirect, permettant ainsi la stimulation de la production d'autres cytokines, la sécrétion de prostaglandines et la génération des cellules à effet cytotoxiques. IL-1 était décrit comme une protéine inductrice de la fièvre et était nommée pyrogène leucocytaire humain. Elle comprend deux protéines majeures l'IL-1 α et l'IL-1 β (C A Dinarello et al. 1977). L'IL-1 contribue avec les facteurs de stimulation des colonies (des glycoprotéines sécrétées qui se lient aux protéines réceptrices à la surface des cellules souches hémopoïétiques) à augmenter la production des cellules d'inflammation dans la moelle osseuse. La famille des IL-1 peut être exprimée par différentes cellules, monocytes et macrophages. IL-1 β est l'une des cytokines les plus importantes avec un rôle prépondérant comme membre pro-inflammatoire de la famille IL-1. Elle permet la régulation de différentes réponses inflammatoires, elle régule en amont l'expression de gène et la sécrétion de l'iNOS et de la cyclooxygénase de type 2 (COX-2). De plus, la cytokine IL-1 β induit l'expression des molécules d'adhésion qui augmentent le recrutement des cellules inflammatoires (Turner et al. 2014; Charles A. Dinarello 2009)

5.1.1.3. TNF- α

Le TNF- α est principalement présent dans les réponses immunitaires innées et permet de stimuler le processus inflammatoire par l'induction de la production des cytokines, ce qui mène à l'induction de l'expression des molécules d'adhésion cellulaires et stimule la croissance et la prolifération cellulaire. C'est une cytokine inflammatoire produite par les macrophages/monocytes pendant la phase aigüe d'inflammation et est responsable d'un large éventail d'événements de signalisation dans les cellules, conduisant à la nécrose ou à l'apoptose (Idriss et Naismith 2000). Le TNF- α a été démontré dans différentes études comme médiateur de la régulation en aval de l'expression des molécules complexes majeurs d'histocompatibilité de Classe I et II (MHC) de certains types cellulaires, ce qui cause l'activation des cellules et puis la production des cytokines. Le TNF- α est une cytokine pléiotropique impliquée dans le système de défense de l'hôte, l'inflammation et l'apoptose. Elle joue un double rôle dans la régulation des réponses immunitaires. Dans les deux cas elle a une fonction de médiateur pro-inflammatoire qui permet l'initiation d'une forte réponse inflammatoire. Elle peut être également un médiateur immunosuppresseur permettant l'inhibition du développement des maladies auto-immunes et de cancers (Balkwill 2006). Indubitablement, TNF- α joue un rôle vital pour la cellule en maintenant de l'homéostasie et limitant la durée du processus inflammatoire. Non seulement, elle joue un rôle important dans la défense contre les agents pathogènes de type viral, bactérie, champignon ou parasite et particulièrement dans les infections par les bactéries intracellulaires comme *Mycobacterium tuberculosis* et *Listeria monocytogenes* (Akdis et al. 2016). Une élévation systémique du taux de TNF- α peut générer un choc septique, et une augmentation locale de sa concentration cause les cinq signes d'inflammation fondamentales : chaleur, gonflement, rougeur, douleur, et perte de fonction. Le TNF- α est impliqué dans les allergies particulièrement l'asthme (S. D. Brown et al. 2015) et la dermatite atopique (Zimmermann et al. 2011).

5.1.1.4. IL-4

L'IL-4 est produite par les lymphocytes TH2, les ILCs type 2 (Innate lymphoid cells), basophiles, les mastocytes et les éosinophiles. L'IL-4 régule le système immunitaire dans les

conditions d'allergie, d'asthme allergique, de rhinite allergique, de diabète sucré, d'infection parasitaire ou de leucémie lymphocytaire chronique (Howard et al. 1982). Elle permet la maturation des cellules TH2 et inhibe le développement des cellules immunitaires type A comme les TH1 et les macrophages M1. En plus, elle permet d'augmenter l'expression de CMH de classe 2 sur la surface cellulaire des lymphocytes B. L'IL-4 prolonge la durée de vie des lymphocytes B et T en culture, et joue le rôle de médiateur d'adhésion tissulaire et d'inflammation. (Akdis et al. 2016).

5.1.1.5. IL-10

L'IL-10 est une interleukine anti-inflammatoire (Saraiva et O'Garra 2010) produite par les monocytes, lymphocytes T (souvent lymphocyte Treg type 1), lymphocytes B (lymphocytes Breg), une petite fraction des cellules NK, les macrophages, et les cellules dendritiques. Sans oublier, les mastocytes qui peuvent aussi produire IL-10 pour limiter le taux d'infiltration des leucocytes, l'inflammation, et les lésions dermiques produites après une exposition chronique aux rayons UVB. Elle inhibe l'expression de différentes cytokines pro-inflammatoires, chimiokines et les récepteurs de chimiokines. En essai clinique, l'IL-10 peut favoriser la tolérance aux allergènes (Akdis et Akdis 2009; Meiler et al. 2008; Palomares et al. 2014). L'IL-10 favorise à son tour, la survie, la prolifération et la différenciation des lymphocytes B et suscite la production des anticorps IgG. (Stanic et al. 2015; Roediger et al. 2015; Akdis et Akdis 2009).

5.1.1.6. IL-8

L'interleukine-8 (IL-8) appartient à une petite famille de cytokines produite par différents types de cellules : phagocytaires : les monocytes, les macrophages, les neutrophiles, les lymphocytes, et les cellules épithéliales et endothéliales, après stimulation par d'autres cytokines pro-inflammatoires comme l'IL-1 α , l'IL-1 β , l'IL-17, le TNF- α , ou les TLRs (récepteurs Toll-Like) (Coelho et al. 2005). Elle active les neutrophiles induisant ainsi la chimiotaxie, l'exocytose et l'explosion oxydative. *In vivo*, l'IL-8 provoque une accumulation massive de neutrophiles dans le site d'injection. L'IL-8 et d'autres cytokines sont produites dans différents tissus suite à une infection, une inflammation, une ischémie, ou un trauma et sont considérées comme la cause

principale de l'accumulation locale des neutrophiles (Baggiolini et Clark-Lewis 1992). L'IL-8 a été identifiée comme un facteur chimiotactique spécifique des neutrophiles, puis classée comme membre de la famille des chimiokines CXC. La fonction principale de l'IL-8 est l'activation et le recrutement des neutrophiles pour rejoindre le site d'infection ou d'inflammation. Elle peut aussi attirer les cellules NK, les lymphocytes T, les basophiles, et les éosinophiles (S. M. Burke et al. 2008). Une augmentation de la concentration de IL-8 est détectée dans les sites d'inflammation des patients atteints de psoriasis, d'arthrite rhumatoïde ou ayant une infection par le virus respiratoire syncytial, l'asthme ou maladies pulmonaires obstructives chroniques.(Beigelman et al. 2015).

6. Rôle du stress oxydant

Les espèces réactives d'oxygène sont produites constamment par les organismes aérobiques sous forme de dérivés du métabolisme d'oxygène et cela inclut les radicaux libres comme les anions superoxyde ($O_2^{\cdot-}$), les radicaux hydroxyles (OH^{\cdot}) et les molécules non-radicalaires comme le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2). Les sources endogènes des espèces réactives d'oxygène peuvent être originaires de réactions enzymatiques comme non enzymatiques. Les ROS proviennent de la chaîne respiratoire mitochondriale, les réactions enzymatiques catalysées par différentes enzymes (5,10-méthylentetrahydrofolate réductase oxydase, xanthine oxydase, peroxydases), la phagocytose, la synthèse de la prostaglandine ou du système cytochrome P450 (Halliwell 2007) (Dröge 2002). Les espèces réactives de l'oxygène peuvent être produites par une source exogène incluant les radiations ionisantes, les rayons UV et les produits chimiques oxydants. A une petite dose, les espèces réactives d'oxygène servent de second messager dans le processus de signalisation cellulaire. Les ROS sont nécessaires pour le processus de maturation des structures cellulaires et peuvent jouer le rôle d'une arme de défense biologique, ce qui renforce la prolifération cellulaire et les voies de survie. Comme exemple de mécanisme de défense contre les agents pathogènes, les phagocytes (neutrophiles, macrophages, monocytes) secrètent des radicaux libres pour détruire les microbes envahisseurs causant des maladies (Halliwell 2007). A doses élevées et suite à une exposition à très long terme aux espèces réactives d'oxygène, les ROS peuvent provoquer des altérations cellulaires macromoléculaires de l'ADN, des protéines, et des lipides, ce qui peut causer une nécrose, l'apoptose et puis la mort cellulaire. Le stress oxydatif est un déséquilibre entre la production des espèces réactives d'oxygène et la capacité antioxydante de la

cellule à détoxifier et à éliminer les radicaux libres, lié à la génération excessive des ROS et/ou le dysfonctionnement du système anti-oxydant (Ienco et al. 2011). Les altérations biochimiques des composés macromoléculaires peut générer des pathologies comme des maladies neurodégénératives (X. Chen et al. 2012). Ces dernières sont caractérisées par la perte progressive des cellules dans des régions vulnérables du système neuronal. Le plus souvent associées aux agrégats de protéines du cytosquelette formant des inclusions dans les neurones et/ou les cellules gliales (Fulda et al. 2010). Les radicaux libres, avec un seul électron libre, sont considérés hautement réactifs (Jakubczyk et al. 2020). Les radicaux libres les plus connus sont : l'hydroxyle ($\text{OH}\cdot$), le superoxyde ($\text{O}_2\cdot^-$), l'oxyde nitrique ($\text{NO}\cdot$), le dioxyde d'azote ($\text{NO}_2\cdot$) et les groupements peroxyde ($\text{ROO}\cdot$) et peroxyde de lipide ($\text{LOO}\cdot$). On trouve aussi les molécules comme le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), l'ozone (O_3), l'oxygène singulet ($^1\text{O}_2$), l'acide hypochloreux (HClO), l'acide nitreux (HNO_2), le peroxydinitrite (ONOO^-) et le trioxyde de diazote (N_2O_3) (Genestra 2007). Les radicaux libres endogènes sont générés dans les cas de cellules immunitaires activées, l'inflammation, le stress mental, l'exercice excessif, l'ischémie, l'infection, le cancer, et le vieillissement (senescence). Les ROS exogènes proviennent de l'air et de la pollution des eaux, les cigarettes, l'alcool, des métaux de transition lourds (Cd, Hg, Pb, Fe, As), de la prise de certains médicaments (cyclosporine, tacrolimus, gentamycine, bléomycine), de solvants industriels, de la cuisine (la viande fumée, huile consommé, matière grasse) et des radiations (Young et Woodside 2001; Valko et al. 2005; Valko et al. 2006; Mashima et al. 2001). La perte de l'équilibre redox déclenche une réponse inflammatoire pathogène néfaste (Benz et Yau 2008).

III. Matériels et méthodes

1. Modèles expérimentaux

1.1. Modèle animal

Le modèle animal utilisé dans ces expérimentations sont des souris mâles, adultes, et sains pesant 28 à 40g, de souche C57BL/6 J élevés à l'institut Pasteur de Casablanca.

1.2. Modèle Cellulaire

Les cellules microgliales (BV2), provenant de souris femelles C57BL/6J, ont servi de modèle cellulaire pour nos expérimentations *in vitro* et ont été achetées chez la société Italienne Banca-Biologica e Cell Factory (catalog no. ATL03001).

Les cellules déficientes *Acox1*^{-/-} (Raas, Saih, Gondcaille, Tromprier, Hamon, Leoni, Caccia, Nasser, Jadot, Ménétrier, et al. 2019), *Abcd1*^{-/-} (Raas, Gondcaille, et al. 2019), *Abcd2*^{-/-} (Raas, Gondcaille, et al. 2019) et les doubles déficientes *Abcd1*^{-/-}/*Abcd2*^{-/-} (Raas, Gondcaille, et al. 2019) ont été générées par la technique de biologie moléculaire CRISPR/cas9 au laboratoire hôte BioperoxIL, Université de Bourgogne à Dijon, (Raas, Gondcaille, et al. 2019).

2. Conditions expérimentales

2.1. Entretien des souris

C'est à l'animalerie de la Faculté de sciences et techniques de Settat et dans un environnement optimal pour le maintien des souris à une température de 22 ± 2 °C dans des cages en polycarbonate (Makrolon®), avec un cycle circadien de 12 h lumière/12 h obscurité. Les souris ont reçu un régime commercial standard de granulés et de l'eau potable à volonté. Tous les animaux ont été traités conformément au Guide pour le soin et l'utilisation des animaux selon les recommandations du comité d'éthique du National Institutes of Health des États-Unis (2012)(National Research Council (US) Committee for the Update of the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals 2011).

2.2. Culture cellulaire

Les cellules BV2 microgliales ont été cultivées dans un milieu synthétique DMEM à 4.5g/L glucose sans pyruvate et avec de la glutamine, 3.7g/L NaHCO₃ (P04-04500, PAN Biotech), contenant 1% d'antibiotique (Pénicilline-Streptomycine) (11548876, Fisher scientific) et 10% du sérum de veau fœtal/SVF (15377636, Fisher scientific) décomplémenté à une température de 56°C

pendant 30min dans un bain marie. Les cultures cellulaires ont été maintenues dans des incubateurs à 37°C dans une atmosphère humifiée à 5% de CO₂ (Sanyo MCO-5AC Incusafe Compact CO₂ Incubator). L'entretien des cellules a été réalisé dans des conditions stériles sous une hotte à flux laminaire (014727, Faster BHA 48). Le passage de cellules et le changement de milieu de culture ont été faits quand les cultures atteignent 70% de confluence, par l'utilisation du Dulbecco's Phosphate buffer saline/ DPBS sans Ca²⁺ et Mg²⁺ (P04-36500-PAN Biotech) pour le rinçage des cellules et 0,05 % de trypsine (10x 0.5 % EDTA, 0.2% dans PBS sans Ca²⁺ et Mg²⁺) (P10-024100, PAN Biotech) pour détacher les cellules adhérentes.

3. Les conditions de Traitement

3.1.Traitement de souris

3.1.1. Préparation de l'alimentation

Pendant toute la période de traitement les souris ont reçu une quantité de granulés contenant une huile naturelle : l'huile de graine de cactus (CSO), l'huile d'olive (OO) ou l'huile de colza (CO). Les huiles de traitement sont premièrement dissoutes dans de l'acétone, pour un ratio huile/acétone de 1:4 (V:V). Puis, cette solution huile/acétone a été bien mélangée avec les granulés pendant 15 min, permettant ainsi la diffusion de l'huile à l'intérieur de l'aliment. Ensuite, les granulés sont séchés à l'air, à température ambiante. Après l'évaporation de l'acétone durant 24h, l'alimentation a été conservée dans des sacs en plastiques à température ambiante, dans un milieu sec et à l'abri de la lumière.

3.1.2. Conception de l'étude expérimentale

Selon leurs poids, 59 souris mâles pesant 25 à 44 g ont été reparties en 10 groupes, chaque groupe représente un lot de traitement. Dix groupes de 5 à 6 souris ont été hébergés dans des cages en polycarbonate à l'animalerie de la faculté des sciences et techniques de Settat et recevaient un régime commercial standard composé de granulés et de l'eau potable à volonté. Après 3 semaines de phase d'adaptation, les souris ont reçu un régime (70g/lot/jour) enrichi avec 6 % de l'huile de graine de cactus, 6 % de l'huile d'olive, ou à 6 % en huile de colza (6g de l'huile qui correspond à 6,53ml / 100g de nourriture). Pendant cette période de traitement de 28 jours, les animaux ont été observés et suivis quotidiennement pour évaluer l'effet du traitement sur leur poids et leur comportement. Quatre heures avant la fin de la phase de traitement, les souris ont reçu une injection dans la veine caudale d'une solution de Lipopolysaccharides d'*Escherichia coli* O55:B5

(L2880-10MG, sigma aldrich) fraîchement préparée (solution 1mg/ml dans de l'eau physiologique saline) avec une dose de 100µg/ 20g de poids de souris ou eau physiologique saline seule pour le contrôle négatif. (**Tableau 11**)

Tableau 11: Conception de l'étude expérimentale sur les souris

LOTS	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Contrôle	+	+								
Huile de Graine de Cactus			+	+						
Huile d'Olive					+	+				
Huile de Colza							+	+		
Huile d'Argan									+	+
LPS		+		+		+		+		+
Eau physiologique saline	+		+		+		+		+	

Quatre heures après l'injection du LPS, les souris ont été sacrifiées et, le sang a été prélevé par ponction cardiaque, à l'aide d'une seringue montée d'une aiguille, et collecté dans des tubes héparinés, puis centrifugé à 8000g pendant 15 min pour récolter le plasma. Ensuite, les organes (Cerveau, cœur, foie et reins) ont été prélevés et congelés rapidement dans de la carboglace et stockés à -80 °C.

3.2.Traitement des cellules

Les deux lignées cellulaires sauvages (*Wt*) et mutantes (*Acox1^{-/-}*) ont étéensemencées respectivement à raison de 3,5.10⁵ C/boîte de pétri et 5.10⁵ C/boîte de pétri. Ensuite, les cellules ont été incubées pendant 24h à 37°C et à 5 % CO2 pour qu'elles puissent adhérer à la surface de la boîte. Les composés synthétiques (Isorhamnetine (17794, Sigma), Isorhamnetine 3-rutinoside (83337, PhytoLab), Quercétine dihydrate (Q0125,Sigma), 4-hydroxy-3-methoxycinnanaldehyde (382051, Sigma), Syringaldehyde (S7602, Sigma) et Vanilline -ReagentPlus (V1104, Sigma)),ont été premièrement solubilisés dans du Diméthylsulfoxyde/DMSO (508002, CARLO ERBA) pure pour avoir trois solutions mères ayant une concentration respectivement de 200mM, 100mM et

30mM. Ces solutions mères ont été par la suite diluées 500 fois avec du milieu de culture complet pour obtenir des solutions de concentrations finales de 200µM et 60µM. Le LPS O55:B5 (L2880-10MG, Sigma Aldrich) (1mg/ml) a été mélangé avec du milieu complet pour préparer une solution de (1µg/ml).

Après 24h d'incubation, les cellules ont été traitées avec les composés par l'ajout des solutions deux fois concentrées préalablement préparées soit de 200µM ou 60µM, permettant d'obtenir une concentration finale à 100µM ou 30µM. Après 3 heures de traitement, le milieu de culture a été remplacé par du milieu de culture complet frais, ou un volume du milieu de culture avec du LPS (1µg/ml). À la suite du traitement avec ou sans LPS pendant 24h, les boîtes de culture ont été récupérées, les milieux de cultures ont été transvasés dans des tubes. Alors que, les cellules ont été rincées avec du DPBS, et centrifugées 300g pendant 5min à 4°C (Megafuge 16R centrifuge, Thermo Scientific). Les culots de cellules obtenus sont ensuite soit lysés dans du tampon de lyse RLT (74106, Rneasy minikit (250), Qiagen) et 1% 2-Mercaptoethanol (60-24-2, Sigma Aldrich) pour extraction d'ARN soit dans du tampon de lyse RIPA (Tris-HCl 25mM pH 7,4, NaCl 150mM, NP40 1%, DOC 0,5%, SDS 0,1%, Inhibiteur de protéases (04693 116 001, complete tablets EASY pack Roche)) pour extraction de protéines cellulaires. Pour celles destinées à l'extraction de protéines, le tampon RIPA est laissé agir sur les cellules pendant 30min à 4°C, Après la centrifugation des lysats cellulaires 14000RPM pendant 25min à 4°C (5417R, Eppendorf Centrifuge), le surnageant est récupéré et conservé à -80°C jusqu'à l'utilisation.

4. Extraction d'ARN

4.1.Extraction d'ARN à partir des tissus

4.1.1. A partir du foie

Un morceau de foie d'environ 30mg est prélevé et homogénéisé avec le tampon de lyse RLT (74106, Rneasy minikit (250), Qiagen) contenant 1% du 2-Mercaptoethanol (Sigma Aldrich). Cet homogénat est passé ensuite 5 fois dans une aiguille (Aiguilles TERUMO Agani - 26G½ (0,45x12mm)) montée sur une seringue, puis centrifugé à 20 800 g pendant 3 min à 4°C (5417R, Eppendorf Centrifuge). Le surnageant est prélevé, puis transvasé dans un nouveau tube Eppendorf. Un volume d'éthanol 70% est ajouté et bien mélangé avec l'homogénat tissulaire à l'aide d'une pipette. Après, 700µl du lysat cellulaire est transvasé y compris le précipité qui s'est formé, dans une colonne de filtration RNeasy placée dans un tube collecteur de 2ml (fourni). Ensuite, centrifugé à 8000g pendant 15sec, l'éluât est jeté, 700µl du tampon RW1 est additionné au tube

collecteur pour lavage de la colonne, suivi d'une centrifugation de 15s à 8000g. La colonne est ensuite transférée dans un autre tube collecteur. Cinq cent µl du tampon RPE sont ajoutés à la colonne, le tout est centrifugé à 8000 g pendant 15sec, suivi d'une deuxième centrifugation pendant 2min à 8000 g (selon le manuel du kit (74106, Rneasy minikit (250), Qiagen). L'ARN est élué à partir de la colonne Rneasy minikit par un volume de 30 à 50µl d'eau ultrapure (RNase-free), puis la solution d'ARN est conservée à -80°C jusqu'à utilisation.

Dans le kit on trouve :

RLT Buffer= RNA lysis buffer: Tampon de lyse, contient la guanidine, un fort dénaturant

RW1 Buffer= RNA wash buffer : Tampon pour le lavage de l'ARN

RPE Buffer= Second RNA wash buffer with Ethanol : 2ème tampon de lavage de l'ARN, mélangé avec de l'éthanol

4.1.2. A partir de cerveaux de souris

Un morceau de 100mg de cerveau de souris est prélevé puis homogénéisé avec 1ml du réactif de lyse QIAzol (Qiagen) destiné à l'extraction de l'ARN à partir de tissus gras. L'homogénat est incubé par la suite à température ambiante pendant 5min, et après l'ajout de 200µl de chloroforme et une agitation de 15sec, l'homogénat est incubé à température ambiante pendant 5min, puis centrifugé à 14000rpm pendant 15min à 4°C (5417R, Eppendorf Centrifuge). Ensuite, le surnageant prélevé est mélangé volume à volume avec de l'éthanol 70%. Après, un volume de 700µl de ce lysat est transféré sur une colonne RNeasy Mini avec un tube collecteur de 2ml. La suite du protocole utilisé est conforme au manuel du kit (74106, Rneasy minikit (250), Qiagen). L'ARN du cerveau est élué à partir de la colonne Rneasy minikit avec un volume de 30 à 50µl d'eau ultrapure (RNase-free), puis conservée à -80°C jusqu'à utilisation.

4.2. Extraction d'ARN à partir des cellules

Le lysat cellulaire préparé dans un tampon de lyse RLT (74106, Rneasy minikit (250), Qiagen) et 1% du 2-Mercaptoethanol (60-24-2, Sigma Aldrich) obtenu après traitement est placé

dans un tube collecteur de Rneasy minikit (Qiagen) servant à éliminer l'ADN génomique. Après centrifugation à 8000g pendant 15sec, l'éluât est bien mélangé avec un volume égal d'éthanol à 70%, puis placé dans un autre tube collecteur destiné à l'extraction des ARN totaux. La suite du protocole utilisé est conforme au manuel du kit (74106, Rneasy minikit (250), Qiagen). L'ARN des cellules est élué à partir de la colonne Rneasy minikit avec un volume de 30 à 50µl d'eau ultrapure (RNase-free), puis conservée à -80°C jusqu'à utilisation.

5. Dosage d'ARNs par spectrophotométrie UV

A l'aide d'un lecteur de plaque TECAN (Infinite M200 Pro) et en plaçant un petit volume de 2µl de l'échantillon sur une plaque NanoQuant de Tecan, qui comporte 16 (2 x 8) positions d'échantillon chacune est composé d'une optique à quartz spécialement conçue, permettant la détermination de la pureté et la concentration des ARNs extraits à partir des homogénats tissulaires ou cellulaires, soit par l'utilisation de TrayCell (Hellma, Paris, France). Deux mesures d'absorbance sont faites pour chaque échantillon, une est effectuée à une longueur d'onde de 260 nm et la seconde mesure à 280 nm, et l'évaluation de la pureté de la préparation, à savoir la présence de protéines résiduelles, ou de l'ADN génomique dans la solution d'ARN se fait par le calcul du rapport 260/280.

6. Quantification des transcrits par RT-qPCR

6.1.Obtention de l'ADNc

L'ARN extrait et purifié à partir des tissus de souris ou des cellules BV2 microgliales ont suivi le même processus expérimental permettant la synthèse du brin d'ADN complémentaire à partir d'une matrice d'ARN en utilisant le kit iScript cDNA Synthesis (1708891, Biorad) qui contient une ADN polymérase ARN-dépendante ou transcriptase inverse. D'abord l'ARN est dilué avec de l'eau ultrapure à une concentration finale de 100ng/µl. Puis, un volume de 10µl est prélevé et mélangé avec le mélange réactionnel fourni dans le kit contenant le réactif *5 x iScript reaction mix*, de l'eau dépourvue de nucléase et de l'iScript reverse transcriptase (RT) pour un volume final de 20µl par tube (**Tableau 12**)

Tableau 12: Mélange réactionnel pour la transcription inverse

Réactif	Volume/Réaction (µl)
5xiScript reaction mix	4
L'iScript reverse transcriptase (RT)	1
Nuclease free water	5
Matrice d'ARN (100ng)	10
Volume total	20µL

Les échantillons sont ensuite placés dans un thermocycleur (Z316091, Eppendorf® Mastercycler) programmé comme montré sur le **Tableau 13**

Tableau 13: Programme de la transcription inverse dans le thermocycleur

Etape	Température (°C)	Temps (min)
Amorçage	25°C	5min
Transcription inverse (RT)	46°C	20min
Inactivation de la RT	95°C	1min
Etape optionnelle	4°C	-

Ensuite, les échantillons sont récupérés du thermocycleur et conservés à -20°C pour une utilisation ultérieure.

6.2.Préparation des échantillons pour la qPCR

Une dilution de 1/10^{ème} est effectuée par l'ajout de 180µl d'eau ultrapure à 20µl de l'échantillon d'ADN complémentaire. Un volume de 40µl est prélevé de chaque échantillon et rassemblés dans un seul tube. Le mélange d'ADNc subit une dilution en cascade avec un facteur de 2 (1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32) afin d'obtenir une gamme étalon standard avec 5 points. Les 160µl restantes dans chaque tube vont servir à la qPCR (Polymerase chain reaction) pour l'amplification de l'ADN complémentaire contenu dans l'échantillon, qui permettra la quantification des transcrits. La gamme et les échantillons de qPCR est conservé à -20°C.

6.3.Réaction de qPCR

La réaction de qPCR (quantitative polymerase chain reaction) permet l'amplification de l'ADN en présence des oligonucléotides, des amorces (**Tableau 15**) et de la Taq polymérase. Le kit Takyon ROX SYBR 2X MasterMix dTTP blue (UF-RSMT-B0701, Eurogentec) contient un agent intercalant fluorescent « Sybr green ». La mesure de l'intensité de fluorescence émise à chaque cycle est proportionnelle à la quantité des amplicons produits. La quantification de l'ADN amplifié traduit le taux d'expression de l'ARN messager de chaque échantillon. Un volume de 4µl d'ADN complémentaire a été déposé dans une plaque de 96 puits (Eurogentec), ensuite mélangé avec 16µl du mélange réactionnel du kit Takyon ROX SYBR 2X MasterMix dTTP blue (UF-RSMT-B0701, Eurogentec). Après avoir couvert la plaque par un film plastique collant (Eurogentec), elle est centrifugée à 300g pendant 3min (Megafuge16R centrifuge, Thermo Scientific), ensuite placée dans l'appareil StepOnePlus real-time PCR system (Applied Biosystems). L'exécution d'un programme d'amplification d'ADN bien établi, composé d'un ensemble de cycle thermiques. La 36B4, un gène codant pour la phosphoprotéine ribosomale acide Po nous a servi comme gène de référence afin de standardiser les résultats obtenus par la qPCR dans les différents échantillons **Tableau 14**

Tableau 14: Mélange réactionnel de la qPCR

Mélange réactionnel	Volume/réaction (µl)	Concentration finale
Takyon MasterMix	10	1X
Amorce sens	0,06	100nM
Amorce anti sens	0,06	100nM
Eau ultrapure	5,88	Volume est 20µl moins le volume des autres composés
Matrice ADNc	4	
Volume totale	20	

Tableau 15: Séquences d'amorces utilisées pour la qPCR

Amorces	Sens 5'→3'	Antisens 5'→3'	Fournisseur
<i>m36b4</i>	CGA-CCT-GGA-AGT- CCA-ACT-AC	ATC-TGC-TGC-ATC- TGC-TTG	Eurogentec
<i>mSod1</i>	AAC-CAG-TTG-TGT- TGT-CAG-GAC	CCA-CCA-TGT-TTC- TTA-GAG-TGA-GG	Eurogentec
<i>mSod2</i>	CAG-ACC-TGC-CTT- ACG-ACT-ATG-G	CTC-GGT-GGC-GTT- GAG-ATT-GTT	Eurogentec
<i>mHsd17b4</i>	GTC-ACG-GAT-GAC- GGA-GAC-TG	GCA-AAG-CCA-AAG- CAC-CAG-AG	Eurogentec
<i>mIl-1β</i>	GAG-ATT-GAG-CTG- TCT-GCT-CA	AAG-GAG-AAC-CAA- GCA-ACG-AC	Eurogentec
<i>mIl-6</i>	GTT-CTC-TGG-GAA- ATC-GTG-GA	TGT-ACT-CCA-GGT- AGC-TAT-GG	Eurogentec
<i>mIl-10</i>	GCT-GGA-CAA-CAT- ACT-GCT-AAC-C	CCC-AAG-TAA-CCC- TTA-AAG-TCC-TG	Eurogentec
<i>mPex11β</i>	GCT-CAA-GGG-AAA- GAT-GGG-GAA-A	TCC-AGG-GCA-TCT- GTT-GAG-TTC	Eurogentec
<i>mAcox1</i>	TCG-AAG-CCA-GCG- TTA-CGA-G	GGT-CTG-CGA-TGC- CAA-ATT-CC	Eurogentec
<i>mCat</i>	AGC-GAC-CAG-ATG- AAG-CAG-TG	TCC-GCT-CTC-TGT- CAA-AGT-GTG	Eurogentec
<i>mPpara</i>	TAT-TCG-GCT-GAA- GCT-GGT-GTA-C	CTG-GCA-TTT-GTT- CCG-GTT-CT	Eurogentec
<i>mPparγ</i>	CAC-AAT-GCC-ATC- AGG-TTT-GG	GCT-GGT-CGA-TAT- CAC-TGG-AGA-TC	Eurogentec
<i>mPparβ</i>	TTG-AGC-CCA-AGT- TCG-AGT-TTG	CGG-TCT-CCA-CAC- AGA-ATG-ATG	Eurogentec
<i>mPgc-1α</i>	AGA-CGG-ATT-GCC- CTC-ATT-TGA	TGT-AGC-TGA-GCT- GAG-TGT-TGG	Eurogentec

<i>mPgc-1β</i>	TTG-TAG-AGT-GCC- AGG-TGC-TG	GAT-GAG-GGA-AGG- GAC-TCC-TC	Eurogentec
<i>mEhhdah</i>	ATG-GCT-GAG-TAT- CTG-AGG-CTG	GGT-CCA-AAC-TAG- CTT-TCT-GGA-G	Eurogentec
<i>mMyd88</i>	GAC-CGT-GAG-GAT- ATA-CTG-AAG-GA	GGC-CAC-CTG-TAA- AGG-CTT-CTC	Eurogentec
<i>mLtb4R</i>	GAG-CGC-AGA-TCA- GAG-TCC-T	CCC-AAA-AGG-TTC- GTA-CTA-AGG-C	Eurogentec
<i>mTollip</i>	ATT-ATG-GCA-TGA- CTC-GTA-TGG-AC	GGT-TCT-TGG-CCC- CAT-TGT-GT	Eurogentec
<i>mTnfa</i>	GAC-GTG-GAA-GTG- GCA-GAA-GAG	TGC-CAC-AAG-CGA- GAA-TGA-GA	Eurogentec
<i>mTab1</i>	TGG-ATG-GGT-TAC- AGG-TTA-CAC-A	CCA-GTT-GCG-AAA- GCC-GAA-A	Eurogentec
<i>mIl-1rn</i>	GCT-CAT-TGC-TGG- GTA-CTT-ACA-A	CCA-GAC-TTG-GCA- CAA-GAC-AGG	Eurogentec
<i>mCasp1</i>	CTT-GGA-GAC-ATC- CTG-TCA-GGG	AGT-CAC-AAG-ACC- AGG-CAT-ATT-CT	Eurogentec
<i>mTak1</i>	ATG-GCG-CAA-AAC- AGT-CCA-CA	TGT-AAC-ATG-CAC- TGG-GAT-ACC-A	Eurogentec
<i>mIl-4</i>	CCA-TAT-CCA-CGG- ATG-CGA-CAA	CCT-CGT-TCA-AAA- TGC-CGA-TGA-T	Eurogentec
<i>mIl-8</i>	AGA-GTA-TTC-AAA- TGT-GGG-AAC-CG	GAC-CCA-TAC-CAT- CTG-TTG-TGA-G	Eurogentec
<i>mAbcd3</i>	GG-TCG-CAG-CAG- CAA-AGA-TTT-C	GT-GTG-AGC-CTG- ACT-CGG-AAG	Eurogentec
<i>miNos</i>	CCT-AGT-CAA-CTG- CAA-GAG-AA	TTT-CAG-GTC-ACT- TTG-GTA-GG	Eurogentec
<i>mIfny</i>			Eurogentec

Le programme de qPCR est constitué de 3 étapes : Dénaturation, Hybridation et élongation. A la première phase, la température est programmée à 95°C pendant 3min permettant l'activation de la Taq polymérase, puis 40 cycles d'amplification d'ADN se déclenchent successivement, chaque cycle est constitué de deux étapes : la première permet la dénaturation de l'ADN à 95°C pendant 10 secondes, et la deuxième dure 1min servant à l'hybridation et l'élongation dans une température de 60°C (**Tableau 16**). Quand la fluorescence de l'amplicon l'ADN dépasse significativement le seuil de fluorescence programmé on obtient la valeur de cycle PCR seuil "Ct" (Cycle Threshold ou cycle seuil). La valeur de Ct est à la base des calculs des $\Delta\Delta Ct$ de gène cible entre deux traitements différents, avec :

$$Ct \text{ gène cible} - Ct \text{ gène de référence} = \Delta Ct$$

$$\Delta Ct \text{ échantillon} - \Delta Ct \text{ (Contrôle)} = \Delta\Delta Ct$$

La température de fusion correspond au point thermique où 50% de l'ADN est dénaturé. La courbe de fusion est établie à partir du changement de l'intensité de fluorescence détectée par l'appareil à la suite de l'augmentation de la température, par palier de 0,3°C toutes les 10 secondes jusqu'à 95°C, ce qui diminue progressivement la fluorescence. Un pic d'intensité doit être observé sur la courbe de fusion indiquant l'amplification spécifique d'un gène donné. Une courbe bimodale désigne la présence de contaminants dans les échantillons ou d'une amplification non spécifique.

Tableau 16: Programme de qPCR

Programme qPCR	Température °C	Temps
Etape optionnelle préventive	50°C	2min
Activation du Takyon	95°C	10min
40 cycles		
Dénaturation	95°C	10 sec
Hybridation/polymérisation	60°C-72°C	45-60sec

7. Préparation des homogénats

7.1.Homogénats tissulaires

Un morceau de foie ou de cerveau de souris de 30 à 100mg est découpé, puis homogénéisé dans du tampon de lyse RIPA (Tris-HCl 25mM pH 7,4, NaCl 150mM, NP40 1%, DOC 0,5%, SDS 0,1%, Inhibiteur de protéases (04693 116 001, complete tablets EASY pack Roche)), le volume ajouté doit correspondre à 4 fois le poids du fragment (W/4V) (exemple : poids du fragment est de 0,1g on va rajouter 0,4ml du tampon). La lyse se fait au biais de l'homogénéiseur avec adaptateur pour pilon (947820B, Dominic Dutscher). L'homogénat est par la suite incubé 30min dans la glace, puis centrifugé à 14000 rpm pendant 20min à 4°C (5417R, Eppendorf Centrifuge). Le surnageant est récupéré puis stocké à -80°C.

7.2.Homogénats cellulaires

L'homogénat cellulaire est réalisé dans le tampon de lyse RIPA (Tris-HCl 25mM pH 7,4, NaCl 150mM, NP40 1%, DOC 0,5%, SDS 0,1%, Inhibiteur de protéases (04693 116 001, complete tablets EASY pack Roche)) et incubé pendant 30min à 4°C. L'homogénat est centrifugé à 20800 g pendant 25min à 4°C (5417R, Eppendorf Centrifuge), permettant ainsi la séparation de l'extrait protéique contenu dans le surnageant des débris cellulaires présents dans le culot. L'extrait protéique récupéré est conservé à -80°C jusqu'à l'utilisation.

8. Dosage des protéines

La quantité de protéine dans les échantillons a été déterminée par la méthode de Bradford (Bradford, 1976), ou par l'acide bicinchoninique (BCA) (Walker 1994). Les deux méthodes sont basées sur un dosage colorimétrique. L'intensité de l'absorbance à 595 nm est directement proportionnelle à la concentration protéique de l'échantillon. Le dosage par la méthode de Bradford est effectué en utilisant 1µl de l'extrait protéique, 798µl de l'eau distillée et 200 µl du réactif de Bradford (Quick Start™ Bradford 1x Dye Reagent #5000205 (BioRad Protein Assay)). Une gamme étalon de 0 à 80 µg de protéines est préparée avec une solution de sérum albumine bovine (BSA) (0,1mg/ml) (Sigma-Aldrich). Après 10 minutes d'incubation à température ambiante et à l'obscurité, on mesure l'absorbance à 595 nm. Le contrôle blanc contient 800µl d'eau distillée et 200µl du réactif de Bradford.

La méthode au BCA, comporte deux étapes, la première réaction connue sous le nom de réaction de biuret, la chélation du cuivre Cu^{2+} et sa réduction en Cu^{1+} par les protéines dans un environnement alcalin pour former un complexe bleu clair, et l'acide bicinchoninique (BCA) réagit avec l'ion cuivreux réduit. Le produit de la réaction est d'une couleur pourpre intense résultant de la chélation de deux molécules de BCA et d'un ion cuivreux. Le dosage est effectué en utilisant 1 μl de l'extrait protéique, 24 μl de l'eau distillée et 200 μl du réactif de BCA (10678484, Kit de dosage protéique Pierce™ BCA Fisher Scientific). Une gamme étalon de 0 à 25 μg de protéines est préparée avec une solution de sérum albumine bovine (BSA) (1mg/ml) (Sigma-Aldrich). Après 30 minutes d'incubation à 37°C et à l'obscurité, on mesure l'absorbance à 575 nm. Le contrôle blanc contient 25 μl d'eau distillée et 200 μl du réactif de BCA.

9. Analyse de l'expression de protéines par Western Blotting

Le Western Blot ou immunoblotting est une technique qualitative et semi-quantitative de biologie moléculaire qui permet d'identifier et puis d'estimer le taux d'expression de protéines spécifiques dans un échantillon biologique. Elle commence par la séparation des protéines sur un gel d'électrophorèse en polyacrylamide sous l'effet d'un champ électrique, suivie d'un transfert sur une membrane de PVDF, des hybridations avec des anticorps primaires et puis secondaires, permettent d'identifier la protéine cible. Le taux d'expression est évaluée grâce aux techniques de fluorescence ou la chimiluminescence.

9.1.Préparation des échantillons

9.1.1. A partir du culot cellulaire

Trente microgrammes de protéines sont repris dans un tampon de charge dénaturant (Laemmli 4X) composé de (Tris HCl 0,25M pH 6,8, glycérol 40%, 2-mercaptoéthanol 1,4 M, dodécylsulfate de sodium (SDS) à 4%, bleu de Bromophénol). Ensuite, les échantillons sont chauffés à 96°C pendant 5min, puis centrifugés 1min à une vitesse maximale de 20 000 g (5417R, Eppendorf Centrifuge).

9.1.2. A partir de milieu de culture

Un extrait de protéines a été également préparé à partir du surnageant de la culture cellulaire. Après 4 heures de privation de sérum, les surnageants de la culture cellulaire ont été récoltés et incubés avec une solution de désoxycholate de sodium à 2% pendant 30 min à 4°C, puis

les protéines précipitées par l'acide trichloracétique à 100% à 4°C pendant une nuit. Ensuite, les échantillons ont été centrifugés à 20 000g pendant 15 min à 4°C (5417R, Eppendorf Centrifuge). De l'acétone refroidie à -20°C a été enfin ajoutée aux culots. Après centrifugation à 20 000g pendant 15 min à 4°C (5417R, Eppendorf Centrifuge), les surnageants ont été éliminés et les culots ont été dissous dans un tampon de charge Laemmli 4X: Tris HCl 250mM, glycérol 40%, β -mercaptoéthanol 20%, SDS 10%, pH 6,8 et quelques cristaux de bleu de bromophénol, puis chauffés à 96°C durant 5min.

9.2.Séparation des protéines sur un gel d'électrophorèse dénaturant SDS-PAGE (électrophorèse en gel de polyacrylamide contenant du dodécylsulfate de sodium)

Dans un système d'électrophorèse Mini trans-blot Cell (BioRad) comprenant des plaques en verre avec un séparateur de 1,5 mm d'épaisseur, est coulé un gel de séparation de 10% à 12% d'acrylamide/bisacrylamide (40%) (rapport : 37,5/1, EU0078-C, Euromedex) (Tris HCl 375 mM, pH8,8 SDS 0,1%, acrylamide/bisacrylamide 10 à 12%, (tétraméthyléthylènediamine) TEMED 0,1%, Ammonium peroxodisulfate APS 0,05%). Sur le gel de séparation est coulé un second gel de concentration de 4% (Tris HCl 125 mM, pH6,8 SDS 0,1%, acrylamide/bisacrylamide 4%, TEMED 0,1%, APS 0,05%). Après polymérisation, les plaques sont plongées dans un tampon de migration composé de Tris base 25mM, Glycine 190mM et dodécylsulfate de sodium SDS 0,1%, pH 8,3. Ensuite, les échantillons sont déposés dans les puits du gel de concentration de 4%, ainsi que et le marqueur de taille precision plus protein dual color standard (1610374, Biorad), puis les échantillons sont séparés sous l'effet d'un champ électrique de 160V/3A pendant 1h 45min.

9.3.Électro transfert des protéines et Immunodécoration

A la fin de leur migration, les protéines sont transférées à partir du gel de polyacrylamide sur une membrane PVDF (10617354, Fisher Scientific) préalablement activée au méthanol pure (309004-CER, Carlo Erba) pendant 1min à température ambiante. Le transfert est réalisé dans un tampon de transfert 10X composé de 60,60g/L Tris base-30,9g/L acide borique) dilué au 1/10^{ème} sous un champ électrique de 250V/0,3A pendant une heure. Le blot obtenu est ensuite saturé avec une solution de lait 5% (PBS1X Tween-20 0.1%, lait écrémé 5%) pendant 1 heure sous faible

agitation (Stuart SSL4 Rocker, See-saw) à température ambiante. Puis, la membrane est incubée à 4°C toute la nuit sous agitation (Stuart SSL4 Rocker, See-saw) avec une solution d'anticorps primaire (**Tableau 17**) de la protéine cible diluée dans du lait écrémé 1% PBS1X Tween-20 0.1%. Ensuite, la membrane est lavée 3 fois avec du tampon PBST0,1% pendant 30 min à température ambiante, et incubée dans une solution d'anticorps secondaires (**Tableau 18**) (lait écrémé 1%, PBS1X Tween-20 0.1%), contenant des anticorps couplés à la (HRP) peroxydase de raifort/ ou couplés à une sonde fluorescente (Cyanine3), dirigés spécifiquement contre l'anticorps primaire. La membrane est réutilisable il suffit de la déshydrider avec du méthanol (technique) pendant 1min et la laver avec du PBS1X Tween-20 0,1% pendant 5 min pour une autre incubation avec un autre anticorps primaire.

Tableau 17: Les anticorps primaires utilisés pour a réalisation de la technique d'immunoblotting

Anticorps I ^{aire}	Produit chez	Poids moléculaire	Dilution	Référence
ACOX1	Lapin	75-55-25kDa	1/200	Produit maison
CATALASE	Lapin	66kDa	1/2000	ab76024, Abcam
CATALASE	Chèvre	64kDa	1/400	ab50434, Abcam
PEX11B	Lapin	27kDa	1/500	Ab181066, Abcam
CATHB	Souris	43-37kDa	1/500	IM27L, Sigma Aldrich
CATHK	Souris	46-26kDa	1/1000	SC-48353, Cliniscience
TUBULINE	Souris	55 kDa	1/3000	T5168, Sigma Aldrich
B-ACTINE	Souris	45kDa	1/5000	A544, Sigma Aldrich
LAMP2	Rat	112kDa	1/250	SC-20004 AC, Cliniscience
IL1B	Souris	31kDa	1/1000	GTX 74034, Euromedex
NLRP3	Souris	118kDa	1/1000	AG-20B-0014-C100, Coger
HSD17B4	Lapin	80kDa	1/200	HPA021311, Sigma Aldrich

Tableau 18: Les anticorps secondaires utilisés pour reconnaître les anticorps primaires

Anticorps II ^{aire}	Dilution	Référence
Anti-souris (HRP)	1/10000	Goat Anti-Mouse IgG Antibody, HRP conjugate, AP308P, Sigma Aldrich

Anti-rat (HRP)	1/10000	Goat Anti-Rat IgG Antibody, HRP conjugate, AP136P, Sigma Aldrich,
Anti-lapin (HRP)	1/10000	Anti-rabbit IgG, HRP-linked Antibody (7074S, Cell Signaling)
Anti-souris (Cyanine3)	1/10000	Goat Anti-Mouse IgG Antibody, Cyanine3, M30010 , Fisher Scientific (GAM)
Anti-chèvre (Cyanine3)	1/10000	(DAG) AP180C, Sigma Aldrich
Anti-rat (Cyanine3)	1/800	Cy TM 3 AffiniPure Goat Anti-Rat IgG (H+L), 112-165-003 , Jacksonimmuno

9.4.Détection par chimioluminescence

Par Chimioluminescence, après incubation avec l'anticorps secondaire, la membrane est lavée 3 fois avec du tampon PBST0,1% pendant 30 min sous une forte agitation à température ambiante (Stuart SSL4 Rocker, See-saw). L'immunoréactivité a été révélée par SuperSignalTM West Femto Maximum Sensitivity Substrate (ECL) (Thermofisher scientific) ou ECL (SC-2048, Cliniscience). Cette solution chimio luminescente est versée sur la membrane et laissée agir pendant 1min. La détection et la capture de chimiluminescence ainsi que le traitement et l'analyse d'image ont été obtenus à l'aide de BioRad-Chemidoc XRS system, le temps d'exposition varie selon l'intensité du signal émise par les bandes. Pour la quantification relative des signaux, les intensités des bandes ont été analysées par le logiciel Image Lab (Bio Rad).

Alors que pour la méthode basée sur l'immunofluorescence, après incubation avec l'anticorps secondaire, la membrane est lavée 3 fois avec du tampon PBST0,1% pendant 30 min sous une forte agitation à température ambiante, puis séchée dans un incubateur à 37°C pendant 1H. Le scan de la membrane, analyse et traitement d'image sont faits par Licor odyssey system et la quantification des intensités des bandes a été réalisée par le logiciel Image studio Lite version 5.2.

10. Mesure de cytotoxicité cellulaire

Le test colorimétrique de Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide (MTT) (3-(4,5-diméthyltrazol-2-yl)-2,5-diphényltétrazolium bromure) a été effectué afin d'évaluer le degré de cytotoxicité des composés sur les deux lignées cellulaires microgliales BV2 *Wt* et *Acox1*^{-/-} après traitement (Denizot et Lang 1986). Ce test permet d'évaluer l'activité métabolique des enzymes d'oxydo-réduction NAD(P)H-dépendent, reflétant ainsi le nombre des cellules viables.

2x10⁵ cellules/puits ont étéensemencées dans des plaques 96 puits (353072, Falcon). Les cellules sont traitées pendant 24H ou 48H avec chaque composé à différentes concentrations, puis incubées 3H à 37°C avec la solution du MTT 0,05mg/ml (M2128-1G, Sigma Aldrich) préparé dans du DMEM complet. Ensuite, la plaque a été centrifugée 300g pendant 3min (Megafuge16R centrifuge, Thermo Scientific). Le surnageant est enlevé, puis remplacé par une solution de DMSO 100% pour dissoudre le complexe formé appelé « Formazan ». L'absorbance a été mesurée à 570 nm par un lecteur des microplaques SUNRISE, XFLUOR4 Version : V 4.51.

11. Dosages enzymatiques

Le dosage de l'activité des différentes enzymes marqueurs des principaux compartiments subcellulaires a été réalisé par les méthodes décrites dans la littérature comme suit : la cytochrome C oxydase, enzyme marqueur des mitochondries, (Appelmans et al. 1955) ; pour les lysosomes, la β -galactosidase (Vaes 1966) ; la cathepsine C (M. Jadot et al. 1984) ; la cathepsine B (Hamer et al. 2009); pour le réticulum endoplasmique, l' α -glucosidase alcaline (Lecocq et al. 2003); pour les peroxyosomes, la catalase (Baudhuin et al. 1964) et pour le cytosol, la dipeptidyl peptidase III (Parsons et Pennington 1976).

11.1. Dosage de l'activité acyl-CoA oxydase 1 (ACOX1)

La mesure de l'activité enzymatique de l'ACOX1 est très délicate et nécessite une méticulosité méthodique, est faite préférentiellement sur des échantillons frais d'homogénat tissulaire. L'ACOX1 catalyse l' α,β -déshydrogénation des thioesters d'acyl-CoA (Palmitoyl-CoA), produisant les thioesters trans-2-énoyl-CoA correspondants et du FADH₂ dans la demi-réaction réductrice. La réoxydation du FAD réduit nécessite de l'oxygène moléculaire et produit du peroxyde d'hydrogène (Oaxaca-Castillo et al. 2007). La molécule d'H₂O₂ générée est utilisée comme substrat par la peroxydase (HRP : Horse Raddish Peroxidase) qui catalyse la réaction entre

deux molécules de l'acide homovanillique (HVA) et une molécule d' H_2O_2 , aboutissant à la formation d'un composé fluorescent qui excité à 310 nm est capable d'émettre une fluorescence à 420nm, permettant ainsi le dosage indirect de l'activité ACOX1 (Brocard et al. 1993). La quantité du composé fluorescent qu'on quantifie par fluorescence est proportionnelle à la quantité d' H_2O_2 libérée par la réaction de ACOX1. Le milieu réactionnel est composé de tampon Tris HCl 1M pH 7,8, acide homovanillique 27 mM, peroxydase de radis noir (Horse Raddish Peroxidase, HRP) 1 mg/ml, et Triton X-100 10%, nécessaire à la préparation de la gamme étalon d' H_2O_2 de 0 à 5 μM , ainsi que pour le dosage d'ACOX1 dans les échantillons, pour un volume final de 200 μl par puits. Pour cela on prépare en préalable une gamme étalon d' H_2O_2 avec du HRP et HVA.

11.1.1. Gamme étalon d' H_2O_2

La gamme étalon d' H_2O_2 de 0 à 5 μM a été préparée en utilisant le 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%. L'addition des solutions d' H_2O_2 (sigma-Aldrich) de concentrations connues permet le déclenchement de la réaction, suivie par une mesure de fluorescence à 420 nm. La droite d'étalonnage obtenue représente la fluorescence en fonction de la concentration en H_2O_2 .

11.1.2. Dosage d'ACOX1 dans les échantillons tissulaires

En présence du substrat « palmitoyl-CoA (PCoA) » (Sigma-Aldrich) à 50 μM (préparé dans une solution de BSA 1 mg/ml) dans le milieu réactionnel, l'addition de 10 μl de l'extrait protéique déclenche la réaction enzymatique d'ACOX1 dans les homogénats de foie ou de cerveau de souris. La cinétique d'apparition de la fluorescence est mesurée à 420 nm toutes 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. Pour chaque réaction, un test blanc ainsi qu'un témoin positif contenant de l'acyl-CoA oxydase d'Arthrobacter (A2167, Sigma-Aldrich) sont réalisés en parallèle dans les mêmes conditions. 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 μM d' H_2O_2 consommé par minute par milligramme de protéine (David Oaxaca-Castillo et al. 2007).

Préparation du substrat

-PcoA- BSA (Substrat) 0.5mM

Solution	Volume/puit (µl)	Volume/80puits (µl)	Volume/100puits (µl)
PcoA à 5mM	2	160	200
BSA 1mg/ml	4	320	400
H2O milliQ	14	1120	1400
Volume final	20	1600	2000

Préparation du mix réactionnel

Mix réactionnel	Volume/puit (µl)	Volume/80 puits (µl)	Volume/100puits (µl)
Tris HCl 1M (pH=7,4)	11	880	1100
HRP (peroxydase) mg/ml	2,5	200	250
HVA (acide homovalinique) 27mM	6	480	600
TritonX100 (10%)	0,4	32	40
H2O milliQ (qsp 190µl)	150,10	12008	15010
Volume final (après l'ajout du substrat au TECAN)	190	15200	19000

20µl du substrat (0,5mM/puits) c.à.d 1600µl du substrat /80puits

En pratique :

Dans la plaque 96 puits (M33089, Thermofisher Scientific) On dépose premièrement 10µl de l'homogénat de foie ou de cerveau dans 170µl de la mixture réactionnelle, et à la dernière minute 20µl du substrat pour un volume final de 200 µl.

Préparation de test Blancs :

Test blanc négatif : 10µl eau milliQ+ 170µl mix

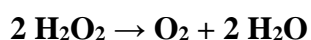
Test blanc positif : 10µl eau milliQ+ 170µl mix+20µl substrat PcoA+BSA

Calcul de l'activité ACOX1

$$\text{Activité spécifique} = \frac{\text{Val. Fluo (Echantillon)} - \text{Val. Fluo (Blanc positif)} \times \text{Dil}}{a \times \text{Quantité prot} \left(\frac{\text{mg}}{\text{ml}} \right)}$$

11.2. Dosage de la catalase : enzyme peroxysomale

La catalase catalyse la dismutation du substrat H₂O₂ (peroxyde d'hydrogène) en eau et en dioxygène, mesurée en suivant la diminution de l'absorbance à 240 nm par spectrophotométrie.



11.2.1. Méthode de dosage sur les homogénats de foie et de cerveau

Une solution fraîche d'H₂O₂ 400 mM d'un coefficient d'extinction molaire de 43,6 M⁻¹.cm⁻¹ (X. Ni et al. 2001) est préparée à partir d'une solution commerciale 30% (V/V) (sigma-Aldrich). La diminution de l'absorbance, liée à la dégradation d'H₂O₂ par la catalase dans le milieu, est suivie dans un volume final de 200µl/puits d'une plaque de 96-puits (type Greiner 655801-special UV transparent plastic plate) contenant 190µl du mélange réactionnel (Tris-HCl 1 M, pH 7, H₂O₂ 20 mM) et 10µl de l'extrait protéique (dilué si nécessaire). La cinétique de dégradation d'H₂O₂ est mesurée en suivant l'absorbance à 240 nm durant 2 minutes à une température de 25 °C (40 cycles avec un intervalle de 3 secondes chacun) grâce au 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 µM d'H₂O₂ consommé par minute par milligramme de protéine.

11.2.2. Méthode de dosage sur les fractions cellulaires

La réaction est suivie dans une cuve (1 ml, à usage unique) dans un spectrophotomètre. Le mélange réactionnel est composé de tampon Imidazole, préparé à la manière suivante : peser 55 mg BSA, ajouter 5,5 ml tampon imidazole 0,2M pH7, 120 µl triton x-100 à 20% et compléter à 55 ml avec de l'eau milliQ. Une fois bien agité, on ajoute 8 µl de H₂O₂ à 30%. Pour tester mélange

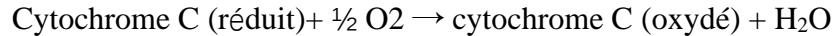
réactionnel contenant le substrat H_2O_2 , l'absorbance est mesurée ($Abs > 0,700$) dans la cuve (le contrôle blanc est réalisé avec de l'eau) en ajoutant 300 μl de $TiSO_4$ (dissoudre 1,7g d'oxysulfate de titane dans 500 ml de H_2SO_4 à 2N, bouillir 10 min en couvrant l'erlen avec un berlin, laisser reposer jusqu'au lendemain, diluer 1,5x avec H_2SO_4 2N et filtrer sur 2 couches de papier Watteman). Pour ajuster la valeur d'absorbance à environ 0,700, on ajoute du mélange réactionnel ou quelques gouttes de H_2O_2 à 30%. Le contrôle blanc est réalisé avec 10 μl d'eau et 500 μl de mélange réactionnel sans H_2O_2 . Pour le dosage de la catalase dans l'échantillon, 10 μl de l'extrait protéique sont ajoutées à 500 μl du mélange, puis la cuve est incubée au bain marie à 37°C pendant 1H à 2H temps maximal. La réaction est arrêtée par l'ajout de 300 μl de $TiSO_4$. La Lecture de la DO se fait à 420 nm (plus la coloration est claire plus l'activité est forte).

11.3. Dosage de la DPP3 alcaline (Dipeptidyl-peptidase 3) : enzyme cytosolique

La **Dipeptidyl-peptidase 3** (DPPIII) est une métallopeptidase, enzyme marqueur du cytosol. L'enzyme présente une activité maximale à pH compris entre 7,5 et 9,5, est capable d'hydrolyser les dipeptides tels que le H-Arg-Arg-7-amido-4-méthylcoumarin hydrochloride (Parsons et Pennington 1976). 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 milieu réactionnel pour un seul échantillon est composé 65,3 μl d'eau distillé, 33,3 μl Tris HCl 0,5M pH8, et 1,33 μl du substrat (C5429, Sigma Aldrich) 25mM. Dans chaque tube 10 ou 5 μl de l'extrait protéique est ajouté au 90 μl du mélange réactionnel. L'ensemble des échantillons sont déposés au bain marie à 37°C, et incubés pendant 1 heure. La réaction est arrêtée par l'ajout de 1ml du tampon de fixation glycine (50 mM EDTA, 5 mM NaOH et Triton X-100 0,05% à pH 10,5). La lecture de fluorescence se fait au biais d'un fluorimètre à une λ d'excitation à 360nm- λ d'émission à 460nm.

11.4. Dosage de cytochrome C oxydase : enzyme mitochondriale

Le complexe IV ou cytochrome C oxydase est une enzyme mitochondriale qui catalyse la réaction suivante :



Le dosage est fait sur des fractions subcellulaires, permettant d'estimer l'enrichissement des fractions subcellulaires en mitochondries. Sous sa forme réduite, le cytochrome C absorbe la lumière à 550 nm. Suivre la diminution de son absorbance permet de mesurer l'activité du complexe Cytochrome C oxydase (Appelmans, Wattiaux, et de Duve 1955).

11.4.1. Préparation du Cytochrome c réduit 220 µM

Une solution mère de Cytochrome C (Sigma Aldrich) 2,7mg/ml est préparée dans 1ml d'eau distillée. Ensuite réduite, par l'ajout d'une solution de dithiothréitol (DTT) 0,5 mM. Après une incubation de 15 minutes à température ambiante et à l'abri de la lumière, la couleur du mélange passe de rouge-orangé foncé à une couleur rouge-rosé pâle. Le rapport des absorbances à 550 et à 565 nm (A550/A565) permet de montrer le taux de réduction de la Cytochrome C. Si le rapport est entre 10 et 20, la réduction du cytochromeC est bien établie, alors que si le rapport est inférieur à 10, ceci signifie que le cytochrome C n'est pas suffisamment réduit et la préparation devrait être refaite.

11.4.2. Le dosage d'activité

L'activité du cytochrome C oxydase a été mesurée à température ambiante en utilisant du cytochrome C à 22 µM 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. Un volume de 50µl de chaque fraction est mélangé avec 1 ml du mélange réactionnel (cytochrome réduit à 90%) dans une cuve de spectrophotomètre, puis un suivi de cinétique est établi durant 2min à une longueur d'onde de 550 nm.

11.5. Dosage de la β-galactosidase : enzyme lysosomale

La β-galactosidase hydrolyse en milieu acide pH5 le méthyl-umbelliferyl β-galactopyranoside (MUG) en le transformant à un produit fluorescent appelé méthyl-umbelliférone (Vaes 1966). Le composé fluorescent est excité à 372 nm et sa fluorescence est émise à 450 nm. La réaction est arrêtée par l'ajout d'un tampon glycine composé de 50 mM EDTA,

5 mM NaOH et Triton X-100 0,05% à pH 10,5. 180µl du milieu réactionnel composé de tampon citrate 50 mM, pH 4,5, de Triton X-100 0,05% et du substrat MUG (M1633, Sigma) dilué à 5 mM (solution mère de 40mM préparée dans le DMSO soit 6,77mg/ 0,5ml de DMSO) est mélangé avec 10µl d'extrait protéique (dilution 1 et dilution 2) des différentes fractions subcellulaires, et incubés à 37°C dans un bain marie pendant 1 heure à 3 heures. La réaction est arrêtée par l'ajout de 1,2 ml de tampon glycine. La fluorescence est lue à une λ d'excitation à 360nm- λ d'émission à 460nm par un fluorimètre.

Calcul :

$$\frac{\text{Unités}}{\mu\text{g protéines}} = \frac{\text{Fluorescence} \times \text{Dil}1 \times \text{Dil}2 \times \text{Volume totale}}{\text{Temps} \times \text{Qt de protéine}}$$

11.6. Dosage de l' α -glucosidase alcaline : enzyme du réticulum endoplasmique

La mesure de l'activité α -glucosidase alcaline marqueur du réticulum endoplasmique, se fait par l'ajout de 10µl de l'extrait protéique issu d'une fraction subcellulaire à 90µl du mélange réactionnel composé de 600µl Tampon glycine 0,5M pH9, 6µl Triton x100 20%, 300µl de substrat 10mM 4-méthylumbelliféryl- α -D-glucuronide (3,38mg/ml et 2,1ml d'eau distillée). Ensuite, les échantillons sont incubés à 37°C dans un bain marie pendant 1H30. L'ajout de 1,2ml de tampon de fixation permet l'arrêt de la réaction, et puis la lecture de fluorescence se fait par un fluorimètre une λ d'excitation à 360nm- λ d'émission à 460nm (Lecocq et al. 2003).

11.7. Dosage de la Cathepsine C : enzyme lysosomale

L'activité dipeptidyl peptidase I ou Cathepsine-C, est dosée par l'utilisation du substrat H-Gly-Arg-7-amido-4-méthylcoumarine hydrochloride salt (H-Gly-Arg-AMC) (TR-H253145, CymitQuimica). Dans une cuve réduite, 480µl du mix réactionnel est déposé contenant 180µl d'eau distillée, 50µl du tampon activateur (mercaptoéthylamine préparée dans un tampon acétate à 0,2 M, pH 5 et triton X-100 2%) et 250µl du substrat (H-Gly-Arg-AMC 50 mM préparé dans du tampon acétate 1 M pH 5). L'hydrolyse de ce substrat par la Cathepsine-C se passe pendant 1H30

d'incubation au bain marie à 37°C, et produit un composé dipeptidique H-Gly-Arg fluorescent 7-amido-4-méthylcoumarine fluorescent, sa fluorescence est lue une λ d'excitation à 360nm- λ d'émission à 460nm par un fluorimètre. L'arrêt de la réaction est réalisé par l'ajout de 1,2ml du tampon de fixation « tampon de glycine (50 mM EDTA, 5 mM NaOH et Triton X-100 0,05% à pH 10,5).

11.8. Dosage de la Cathepsine B : Enzyme lysosomale

Afin de doser l'activité de la cathepsine B, le Z-Arg-Arg-AMC (0,4mM) (C5429, Sigma Aldrich) est utilisé comme substrat. 25 μ l d'échantillon est ajouté à 350 μ l du milieu réactionnel (avec ou son inhibiteur). L'inhibiteur contient : 212 μ l H₂O, 125 μ l du tampon activateur (Tampon phosphate Na⁺/K⁺0,4M pH6,0, KH₂PO₄ 352mM, Na₂HPO₄ 48mM), 12 μ l Triton X-100 2% et 5 μ l de CA-074 10mM (Bachem N-1475, l'inhibiteur irréversible servant à valider la spécificité enzymatique de la cathepsine B). Le milieu sans inhibiteur contient : 212 μ l H₂O, 125 μ l du tampon activateur (Tampon phosphate Na⁺/K⁺0,4M pH6,0, KH₂PO₄ 352mM, Na₂HPO₄ 48mM), 12 μ l Triton X-100 2%. Les échantillons sont incubés 10min à 37°C dans un bain marie. Ensuite, 125 μ l de substrat Z-Arg-Arg-AMC (0,4mM) (C5429, Sigma Aldrich) est ajouté suivie d'une incubation de 10min à 37°C. Deux cuves étalons sont préparées, une qui servent de contrôle positif et contient 350 μ l du milieu réactionnel, 125 μ l H₂O et 7-Amino-méthyl-4-coumarin (AMC) (A9891, Sigma Aldrich) dilué 100 ou 200x, et l'autre cuve du contrôle négatif contient 350 μ l du mélange réactionnel et 150 μ l d'eau. Afin d'arrêter la réaction 1,2ml de tampon glycine 50Mm/EDTA, 5mM Triton X100 0,05% pH10,5. 1,2ml du fixateur est ajouté dans chaque échantillon. La fluorescence est lue à une λ d'excitation à 360nm- λ d'émission à 460nm. La différence obtenue plus ou moins inhibiteur correspond effectivement à l'activité enzymatique de la cathepsine B.

11.9. Dosage de la Procathepsine B

Dans chaque cuve est déposé 10 μ l de lysat cellulaire et 30 μ l H₂O, puis sont mis à 37°C dans un bain marie avec 30 μ l de la pepsine 250 μ g/ml de tampon citrate 0,1M pH 3,5(mélanger l'acide citrique et le citrate de sodium jusqu'à l'obtention d'un pH 3,5), puis incubés 30min à 37°C. Suivie d'une autre incubation de 10min avec 230 μ l du mélange activateur (avec ou sans inhibiteur

0,13µl CA-074) composé de 250µl tampon activateur (Tampon acétate de sodium 0,4M pH6,8 , acétate Na⁺ 340 mM, acide acétique 60 mM, EDTA 4mM, aminoéthane-thiol 4 mM (Janssen Chimica, 15.377.51)), 1,25µl TritonX100 10%. Une addition de 200µl du substrat Z-Arg-Arg-AMC (0,4mM) (C5429, Sigma Aldrich) dilué 40 fois dans de l'eau distillée permet le déclenchement de la réaction, puis le tout est incubé pendant 1h à 37°C. Après, 1,2ml de tampon de fixation est ajouté pour arrêter l'activité enzymatique. Les échantillons sont déposés dans la glace. La lecture de fluorescence se fait par un fluorimètre à une λ d'excitation à 360nm- λ d'émission à 460nm après élimination de la condensation. Pour les tests étalons, la cuve est préparée de la même manière sauf au lieu de 40µl de lysat cellulaire, on met 10µl de H₂O pour le contrôle négatif ou 7-Amino-méthyl-4-coumarin (AMC) (A9891, Sigma Aldrich) dilué 100, 200 fois et 30µl d'eau pour le contrôle positif.

12. Dosage de nitrite

Le prétraitement des cellules BV2 avec les composés à tester est réalisé pendant 3H et puis suivi d'un traitement avec ou sans LPS (1µg/ml) pendant 24h. Le surnageant de la culture cellulaire était prélevé et nous a servi d'échantillon pour doser le NO₂ produit. Dans une plaque de 96 puits de type Greiner, il a été déposé un volume égal (v:v) du surnageant recueilli et d'un mélange comprenant une solution A (0,1% N-1-Naphtyléthylène-diamine dihydrochloride (Sigma)) et d'une solution B (1% sulfanilamide (Sigma), 5%acide phosphorique(sigma)). Une gamme étalon a été préparée (0, 5, 10, 20, 50µM) avec des concentrations différentes de nitrite de sodium (Sigma) à partir d'une solution mère de 10mM. Le temps d'incubation est de 15min à température ambiante à l'abri de la lumière. L'absorbance est lue à 550nm contre 690nm.

13. Méthode de fractionnement subcellulaire

Le fractionnement subcellulaire est une méthode physicochimique développée par de Duve et ses collaborateurs (de Duve et al. 1955) qui permet grâce à différentes vitesses de centrifugation de séparer plus ou moins efficacement les organites subcellulaires de taille et de densités différentes en les soumettant à un champ centrifuge. Il existe principalement deux types de centrifugation : la centrifugation différentielle qui se base sur la différence de taille entre les organites tandis que la centrifugation isopycnique se base sur la différence de densité. Dans

l'objectif d'obtenir les fractions subcellulaires enrichies d'organites de même taille ou de même densité, les cellules sont d'abord homogénéisées et l'homogénat est soumis à différentes étapes de centrifugation, toutes les étapes se déroulent dans une solution isotonique glacée (à 4°C) de sucrose de 0,25M pour éviter la lyse des organites.

Il faut noter que l'interprétation des profils de distribution des organites prend en compte le pourcentage de récupération, ce dernier représente le ratio de la somme des activités mesurées dans les fractions N, M, L, P et S après centrifugation différentielle divisée par l'activité totale trouvée dans l'homogénat. La distribution est considérée comme étant fiable quand le pourcentage de récupération figure dans l'intervalle : entre 75% et 125%, sinon les résultats obtenus sont estimés moins représentatifs de la répartition réelle des organites.

13.1. Fractionnement par centrifugation différentielle

L'homogénat (H) obtenu à partir des cellules BV2 donne, après différentes étapes de centrifugation différentielle, cinq fractions désignées comme suit : N (fraction nucléaire), M (fraction mitochondriale lourde), L (fraction mitochondriale légère), P (fraction microsomale) et S (surnageant final ou fraction cytosolique) (de Duve et al. 1955).

Lorsque la confluence des cellules est atteinte (à 80%), les cellules BV2 sont décollées des boîtes de pétri par grattage, puis récoltées dans une solution de saccharose 0,25M. La suspension cellulaire récoltée est homogénéisée dans un Dounce par 12 passages successifs. Puis, l'homogénat (H) est centrifugé dans des tubes de 15 ml (Ref 430791, Corning® 15 ml clear polypropylene (PP) centrifuge tubes) à basse vitesse dans le rotor SX4400 durant 8,3 min à 1000 rpm (6 000g) dans la centrifugeuse international Allegra X30. Après centrifugation, le surnageant est récolté et le culot de la fraction N est conservé. Ce culot contient les noyaux, fragments de la membrane plasmatique et quelques cellules intactes. Le surnageant postnucléaire repris dans les tubes de 10ml (Ref 326819 -Open-Top Thickwall Polycarbonate Tub- Beckman Coulter) est centrifugé dans le rotor 70,1 Ti à 8000 rpm, 7,3 min (30 360g) dans l'ultracentrifugeuse Beckman Coulter L7-35 pour l'obtention de la fraction mitochondriale lourde M contenant la majeure partie des mitochondries, et une partie des lysosomes et des peroxysomes. Par la suite, le surnageant repris dans les tubes de 10ml (Ref 326819 -Open-Top Thickwall Polycarbonate Tub- Beckman Coulter) est centrifugé dans le rotor 70,1 Ti pendant 6,5 min à 25 000 rpm (43 050 g) dans l'ultracentrifugeuse Beckman

Coulter L7-35 pour obtenir la fraction mitochondriale légère L. Cette fraction contient un grand nombre de mitochondries, mais également enrichie en lysosomes et en peroxysomes. Le surnageant post-fraction L repris dans les tubes 10ml (Ref 326819 -Open-Top Thickwall Polycarbonate Tub- Beckman Coulter) est centrifugé dans le rotor 70,1Ti durant 45min à 40.000 rpm (110 208 g) dans l'ultracentrifugeuse Beckman Coulter L7-35 pour obtenir le culot de la fraction microsomale P et le surnageant de la fraction soluble S. Le culot P contient les microsomes formés par l'homogénéisation du réticulum endoplasmique, la membrane plasmatique et l'appareil de Golgi. (**Figure 15**)

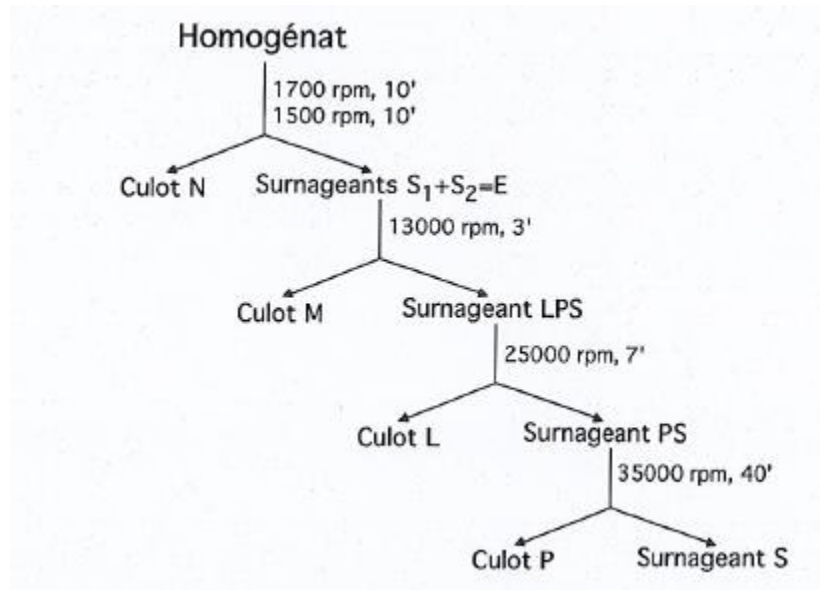


Figure 15: Schéma de fractionnement subcellulaire par centrifugation différentielle (C. de Duve). Fraction N ou nucléaire, fraction M ou mitochondriale lourde, fraction L ou mitochondriale légère, fraction P ou microsomale, fraction S pour non sédimentable.

Les résultats du fractionnement sont présentés sous forme d'histogrammes avec en abscisse le % de protéines et en ordonnée, l'activité spécifique relative de l'enzyme d'intérêt. L'activité spécifique est rapportée à la quantité de protéines, et dite relative parce qu'elle est rapportée à l'activité spécifique trouvée dans l'homogénat de départ. La surface de chaque rectangle de l'histogramme correspond au % d'activité de l'enzyme mesurée dans cette fraction par rapport à l'activité mesurée dans l'homogénat.

$$\text{Activité spécifique relative} = \frac{\% \text{ d'activité par rapport à } H}{\% \text{ de protéines par rapport à } H}$$

13.2. Fractionnement par centrifugation isopycnique

La centrifugation isopycnique permet de séparer des particules en fonction de leur densité. Le plus souvent, les particules sont déposées au sommet d'un gradient de densité de saccharose ou de Nycodenz puis sont soumises à une vitesse centrifuge pendant plusieurs heures. Elles migrent dans le gradient jusqu'à ce qu'elles rencontrent une densité du milieu égale à leur propre densité. C'est la densité d'équilibration. Les centrifugations isopycniques se déroulent dans des rotors à godets basculants. (**Figure 16**)

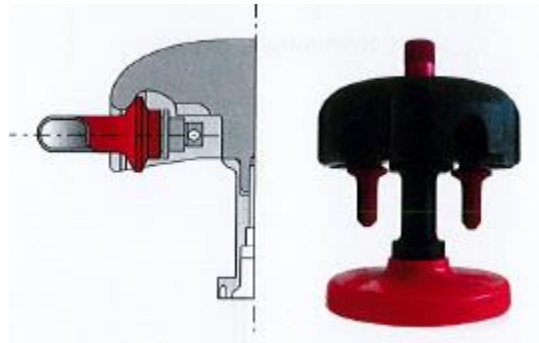


Figure 16: Rotor à godets basculants. Les tubes sont déposés dans des godets, accrochés au rotor par l'intermédiaire d'un bouchon muni de crochets que l'on fixe sur une barre fixe. Sous l'effet de la force centrifugeuse, les tubes se réorientent et passent en position horizontale

En pratique, on prépare le gradient de densité en mélangeant progressivement une solution lourde et une solution légère. On dépose les granules au sommet du gradient et on centrifuge dans un rotor à godets basculants. On coupe le tube du gradient à une douzaine de fractions et on mesure l'activité des enzymes marqueurs. Graphiquement, les résultats sont représentés de deux façons différentes : le % d'activité en fonction du numéro de la fraction ou la fréquence en fonction de la densité de chaque fraction. La fréquence représente le % d'activité divisé par l'incrément de densité. Si le gradient est vraiment linéaire et que la hauteur des coupes est constante, la fréquence reflète le % d'activité. Lorsqu'on veut comparer les distributions au sein d'un même gradient ou de deux gradients de densité différentes, on utilise la densité médiane d'équilibration, c-à-d. La densité du milieu où on trouve 50% d'activité enzymatique.

13.2.1. Fractionnement sur gradient de Nycodenz

La purification des fractions par ultracentrifugation a été réalisée selon la méthode décrite par (Beaufay et al. 1964) comme suit : Un volume de 500µl des fraction M+L+P ou M+L

(rassemblées) a été déposé au-dessus d'un gradient continu de Nycodenz de densité allant de 1,09 à 1,24 g/cm³ coulé dans un tube de 5ml (103242, 5 ml, Open-Top Thinwall Polypropylene (Tube- Beckman Coulter) puis centrifugée dans un rotor SW55Ti (342194, Beckman Coulter) pendant 150 min à 25 000 rpm (116,140 g) dans l'ultracentrifugeuse Beckman Coulter LE-80 K. Onze fractions ont été recueillies après centrifugation à l'aide d'un slicer de tube et la densité de chaque fraction a été mesurée grâce à un réfractomètre.

13.2.2. Fractionnement sur gradient de Saccharose

Selon la méthode décrite par (Beaufay et al. 1964) comme suit : Un volume de 500µl des fractions M+L+P ou M+L (rassemblées) a été déposé au-sommet d'un gradient de saccharose de densité allant de 1,09 à 1,26g/cm³ coulé dans un tube de 5ml (Ref 103242, 5 ml, Open-Top Thinwall Polypropylene (Tube- Beckman Coulter) puis centrifugée dans un rotor SW55Ti (342194, Beckman Coulter) pendant 150min à 25 000 rpm (116,140 g) dans l'ultracentrifugeuse Beckman Coulter LE-80 K. Le tube a été sectionné en onze fractions et puis la densité de chaque fraction a été mesurée grâce à un réfractomètre.

13.2.3. Fractionnement sur gradient Percoll

Un volume de 500µL des fractions M+L+P est chargé au-dessus de 4,5 mL d'une solution de PercollTM à 18 % (18 % v/v PercollTM (Pharmacia), 0,25 M de saccharose, 2 mM d'EDTA et 10 mM de Tris-HCl, pH 7,4) et centrifugé à 25000 rpm dans un rotor SW55Ti (Beckman Coulter) pendant 45 min à 4°C. Sept fractions ont été collectées à partir du haut du gradient PercollTM et la distribution des organites a été déterminée par des dosages enzymatiques et un transfert Western (comme décrit ci-dessus).

14. Phagocytose de bactéries

14.1. Conditions de culture bactérienne de *STm* (*Salmonella Typhimurium*) sauvages et mutantes :

Les cellules bactériennes *STm* sauvages et mutantes ont été maintenues cultivées à 37°C dans des plaques de gélose LB -agar solides (Difco LB Broth Lennox Ref BD, #240230 : 20 g/L, Bacto Agar Ref BD, #214010 : 16 g/L) alors que les souches mutantes qui abritent un plasmide exprimant de manière constitutive la protéine à fluorescence verte (GFP) ont été inoculées dans les plaques de gélose contenant du LB- agar avec 100 µg/ml d'ampicilline. La GFP fluorescence a été utilisée pour visualiser les bactéries phagocytées par les cellules microgliales BV2 à l'aide du microscope à fluorescence.

La suspension bactérienne de *STm* destinée à l'infection des cellules BV2 microgliales a été préparée comme suit : à partir d'une plaque de gélose de bactéries *STm* sauvages ou mutantes une seule colonie a été prélevée par une anse et transférée dans un flacon de 50ml stérile contenant un bouillon de (LB, Lennox) (Difco LB Broth Lennox Ref BD, #240230) stérile (Autoclave System DB-23: 15 min à 121°C) et puis incubé dans un agitateur (New Brunswick Scientific, Excella E24 incubator shaker series) à 180 rpm dans une chambre à 37°C toute la nuit.

14.2. Test de (UFC) Unité formant une colonie

Dans un premier temps, les cellules BV2 (*Wt* et déficientes *Acox1^{-/-}* et *Abcd1d2^{-/-}*) ont étéensemencées à une densité de 50.000 cellules/puits avec du Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM High Glucose, 4.5 g/L Glucose contenant du L-Glutamine et du Sodium Pyruvate, Lonza) contenant 10% du sérum bovin foetal décomplémenté dans des plaques de 24 puits (plate 24-well glass-Bottom tissue culture plates -Greiner, no. 662892). Ensuite, les cellules BV2 ont été traitées ou non pendant 24H par du LPS 1µg/ml (O55 : B5 de Sigma-Aldrich) (Stock 1 mg/ml PBS filtré sur Acrodisc 0,2 µm, PALL Acrodisc syringe filters 25 mm de diamètre) et incubées à 37°C, 5%CO₂. Après 24H, les cellules ont été infectées par les bactéries *Salmonella Typhimurium* (MOI =100 :1) c.à.d. 100 bactéries par cellule et incubées pendant 25min à 37°C (Selkrig et al. 2020). Afin d'avoir un contrôle négatif, une plaque de cellules BV-2 a été prétraitée avant l'infection et durant l'infection bactérienne par 4 µM de la cytochalasine D (5 mg/ml de DMSO (DMSO, Sigma) ou bien prête à l'emploi (Sigma, C2618) à diluer 1250fois dans du DMEM), incubée 20 minutes à 37°C dans l'incubateur à CO₂, puis gardées 15 minutes sur glace. Après l'incubation des cellules BV2 avec les bactéries *STm*, nous avons procédé à un lavage et une incubation avec de la gentamycine 100 µg/ml (Sigma no. G1914) pendant 1h dans l'incubateur à CO₂ à 37°C afin

d'éliminer les bactéries dans le milieu extracellulaire. Avant la récolte, les cellules BV2 ont été incubées une dernière fois avec la gentamycine 16 µg/ml pendant une heure dans l'incubateur à 37°C. Par la suite, le milieu a été éliminé et les cellules lavées avec du tampon PBS1X stérile. Dans chaque puits nous avons déposé 500µl de PBS/Tritonx100 0,1% pour lyser les cellules, après incubation durant 10min à T° ambiante, les lysats récupérés ont étéensemencés sur des plaques LB/agar, et incubés une nuit à 37°C (Incubateur Heraeus). Le nombre de colonies obtenu par plaque est compté et représente un indicateur de la quantité de cellules bactériennes viables internalisées par les cellules BV2. Le comptage de nombre de colonies ne se fait que sur les plaques, contenant entre 30 et 300 colonies. L'Unité Formant Colonie (U.F.C.), est plus précise que l'unité bactéries/ml, car on compte le nombre d'unités qui forment des colonies, quelque fois, plusieurs bactéries côte à côte pouvant donner une même colonie. Il est donc plus exact de parler du nombre d'unités formant colonies que de nombre de bactéries.

14.3. Immunofluorescence -marquage de noyaux des cellules BV2 au DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) :

Les cellules BV2 (*Wt* et déficientes *Acox1*^{-/-} et *Abcd1d2*^{-/-}) ont été cultivées à une densité de 200.000 cellules/puits avec du DMEM contenant 10% du sérum bovin fœtal décomplémenté dans des plaques de 6 puits (Greiner CELLSTAR® multiwell culture plate, no 657160) au fond de chaque puits a été déposée préalablement une lamelle ronde en verre stérile (Thermo Scientific™ Cover Slips, Circles). Après 24H d'incubation à 37°C, 5%CO₂, les cellules BV2 ont été infectées par les bactéries *Salmonella Typhymurium* mutantes (*STm-GFP*) (MOI =100 :1) pendant 25min à 37°C (Selkrig et al. 2020). À la suite de l'incubation, nous avons procédé à un lavage et une incubation de cellules BV2 avec de la gentamycine 100 µg/ml (Sigma no. G1914) pendant 1h dans l'incubateur à CO₂ à 37°C afin d'éliminer les bactéries extracellulaires. Avant de faire le marquage cellulaire, les cellules BV2 ont été incubées une dernière fois avec la gentamycine 16 µg/ml, 1h dans l'incubateur à 37°C et par la suite ont été lavées trois fois avec du PBS froid stérile 1X. Le marquage au DAPI des noyaux cellulaires a été réalisé en se basant sur la technique décrite par (Chazotte 2011). Après lavage au PBS 1X, les lamelles ont été par la suite inversées sur les lames de microscope et collées sur celles-ci avec du Mowiol (Mowiol® 4-88-sigma aldrich). La visualisation de bactéries, exprimant la GFP (en vert), phagocytées par les

cellules microgliales, dont les noyaux ont été marqués au DAPI (en bleu), a été faite sous microscope à fluorescence avec un objectif X20.

IV. Résultats et Discussion

A. Caractérisation du modèle cellulaire microglial

Les cellules microgliales assurent diverses fonctions au niveau du système nerveux central comme la phagocytose et la présentation des antigènes, ce qui contribue aux phases initiales de la réponse immunitaire innée. Leurs capacités à répondre aux différents stimuli (lésion, infection ou stress), et d'interagir avec d'autres types cellulaires (neurones et cellules gliales) par la sécrétion de médiateurs inflammatoires rendent ces cellules une véritable sentinelle versatile du système nerveux central. Dans les cas de leucodystrophies peroxysomales, comme la déficience en ABCD1 ou en ACOX1, l'altération des cellules microgliales jouerait un rôle majeur dans la pathogenèse, et précéderait la dégradation de la myéline (Bergner et al. 2019; X. Gong et al. 2017). Un ancien article publié par Blasi et al., recommande l'utilisation des cellules microgliales BV2 comme modèle *in vitro* pour étudier les mécanismes moléculaires contrôlant l'induction et/ou l'expression des activités biologiques de la microglie. Vu que ces cellules immortalisées conservent la plupart des caractéristiques sécrétrices et effectrices des cellules immunitaires (Blasi et al. 1990). Par la méthodologie d'édition génique CRISPR/Cas9, notre laboratoire a pu établir de nouveaux modèles cellulaires pour étudier l'impact des déficiences peroxysomales sur les cellules microgliales BV-2 murines, pour comprendre le rôle de la microglie et aider à identifier de nouvelles cibles thérapeutiques et puis mettre en place des tests de criblage de molécules thérapeutiques (Raas, Gondcaille, et al. 2019; Raas, Saih, et al. 2019). Ces modèles cellulaires ne sont pas similaires aux microglies primaires, mais les cellules BV-2 conservent la signature transcriptomique ressemblant à celle des cellules primaires, ainsi que de nombreuses caractéristiques microgliales telles que la phagocytose et la capacité à répondre à la stimulation inflammatoire d'une manière assez similaire à celle des cellules primaires (Henn et al. 2009; A. Das et al. 2015). La caractérisation préliminaire de ces modèles cellulaires a montré plusieurs caractéristiques comparable à celles trouvées dans les maladies peroxysomales comme l'accumulation de VLCFA et la présence des inclusions et gouttelettes lipidiques (Raas, Gondcaille, et al. 2019; Raas, Saih, et al. 2019). Jusqu'à présent aucune étude ne s'est intéressée à la caractérisation des cellules BV2 microgliales par

fractionnement subcellulaire pour cartographier l'organisation biochimique compartimentale spécifique à ces cellules du système nerveux centrale.

Pour caractériser ces lignées, nous avons utilisé diverses approches méthodologiques telles que le fractionnement subcellulaire pour (i) explorer les modifications susceptibles d'altérer la taille et /ou la densité des principaux organites subcellulaires dans les lignées microgliales déficientes (ACOX1-KO ou ABCD1/D2-KO) et (ii) d'évaluer les conséquences du déficit de la β -oxydation peroxysomale sur les activités principales des cellules microgliales : la phagocytose et l'activité lysosomale. en s'appuyant sur des observations récentes faites dans notre laboratoire (Raas, et al. 2019), à partir de données transcriptomiques de séquençage à haut débit par RNA-seq, indiquant une surexpression de plusieurs gènes codant pour des protéines lysosomales : *CtsB*, *Lamp-2*, *CtsK*, *CtsD* et *lysozymes*. Des méthodes de biochimie, de biologie cellulaire et moléculaire (qPCR, western blotting, et dosage enzymatique) ont été employées afin d'explorer les mécanismes moléculaires mises en jeu et aboutissant à l'inflammation et au dysfonctionnement lysosomal.

a. Conséquences de l'absence des activités d'ACOX1 ou d'ABCD1 et ABCD2 sur les profils de distribution intracellulaire des organites des cellules BV-2

1. *Fractionnement cellulaire*

Afin d'évaluer les conséquences de l'absence de l'expression d'ACOX1 ou d'ABCD1 et ABCD2 (indiqué par la suite ACOX1-KO et ABCD1/D2-KO, respectivement) dans les cellules BV-2 microgliales, nous avons réalisé des fractionnements subcellulaires basées sur la méthode de sédimentation différentielle des organites cellulaires et les mesures des activités de leurs enzymes marqueurs pour comparer la distribution des lysosomes, des mitochondries et des peroxysomes dans les trois lignées cellulaires : BV-2 sauvage (WT), BV-2 déficientes en *Acox1* (ACOX1-KO) et BV-2 double déficientes en *Abcd1* et *Abcd2* (ABCD1/D2-KO).

1.1.Fractionnement subcellulaire par centrifugation différentielle

1.1.1. *Dosage des activités*

La fonction protéique au sein d'une cellule dépend principalement de sa localisation subcellulaire. La connaissance de l'emplacement intracellulaire peut fournir des informations importantes sur la distribution des protéines, le trafic intracellulaire (Hamer et Jadot 2005), ainsi que la taille et la densité de leurs organites respectifs pour l'étude des voies métaboliques et voies de signalisation cellulaires responsables de la physiopathogénèse. Les protéines sont fréquemment associées à un organite alors qu'une fraction importante peut résider ailleurs. Les premières étapes de fractionnement sont basées sur la méthode classique de centrifugation différentielle développée par de Duve et al. (de Duve 1971; de Duve et al. 1955) . Un homogénat de cellulaire (H) est séparé en cinq fractions notées N (fraction nucléaire), M (fraction mitochondriale lourde), L (fraction mitochondriale légère), P (fraction microsomale) et la fraction S (surnageant final) (de Duve et al. 1955). La prise en compte de la distribution intracellulaire totale améliore la qualité des distributions d'organites dans la cellule, et permet d'identifier les changements de tailles d'organites causés par les perturbations associées par exemple aux mutations géniques. Il est évident qu'au cours du fractionnement subcellulaire, la distribution des organites soit appauvrie ou enrichie dans les différentes fractions sans que ces organites ne soient jamais purifiés jusqu'à homogénéité dans chaque fraction (Michel Jadot et al. 2017). En effet, jusqu'à présent c'est la première étude basée sur le fractionnement subcellulaire réalisée sur des cellules BV2 microgliales.

Les résultats obtenus à partir de dix expériences indépendantes, montrent qu'il n'existe pas de différences significatives au niveau des profils de distribution des organites en comparant les cellules microgliales BV-2 WT et les cellules déficientes ACOX1-KO et ABCD1/D2-KO. Les activités enzymatiques des 2 hydrolases lysosomales solubles (β -galactosidase et cathepsine C) ont été mesurées dans les cinq fractions de BV-2 WT et BV-2 mutantes (**Figure 17**). Comme le montre la **figure 17**, les deux enzymes marqueurs de lysosomes sont majoritairement enrichies dans la fraction L (fraction mitochondriale légère) et retrouvées en moindre proportions dans la fraction M (fraction mitochondriale lourde). La distribution des activités de ces deux enzymes lysosomales est similaire dans les trois lignées cellulaires microgliales.

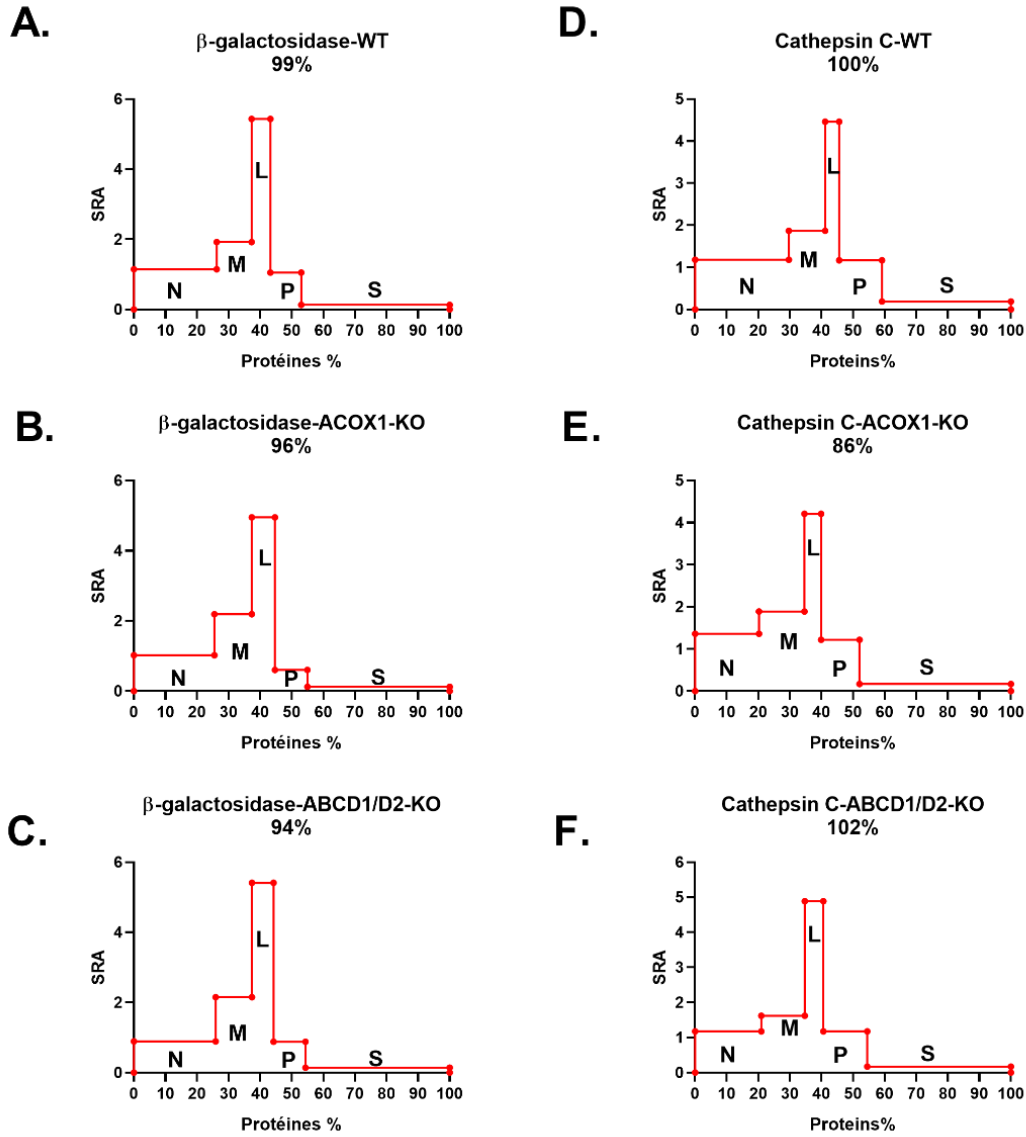


Figure 17: La distribution intracellulaire des deux enzymes marqueurs des lysosomes β -galactosidase (A, B, C) et Cathepsine C (D, E, F), dans les cinq fractions subcellulaires (N, M, L, P et S) obtenues par centrifugation différentielle des homogénats de cellules BV-2 (WT (A, D), ACOX1-KO (B, E) et ABCD1/D2-KO (C, F)). Les repères des graphiques représentent en ordonnée : l'activité spécifique relative (SRA) et en abscisse : le pourcentage cumulé de protéines dans chaque fraction (cumulé de gauche vers la droite). L'aire de chaque rectangle est proportionnelle au pourcentage de l'activité mesurée dans chaque fraction. Au sommet de chaque graphique est indiqué le pourcentage de récupération représentant le taux d'activité mesuré dans les fractions (N, M, L, P et S) rapportée à l'activité totale dans l'homogénat (H) après centrifugation différentielle

De plus, l'analyse de la distribution des microsomes (réticulum endoplasmique) par le dosage d'activité de l' α -glucosidase alcaline (**figure 18**) dans l'ensemble des fractions cellulaires ne montre aucune différence significative en comparant les cellules sauvages WT et les cellules mutantes ACOX1-KO et ABCD1/D2-KO. L'activité α -glucosidase alcaline est associée aux microsomes, issus du réticulum endoplasmique, distribués majoritairement dans la fraction P des cellules BV2 microgliales, et une autre partie de microsomes est répartie successivement dans les fractions M et P.

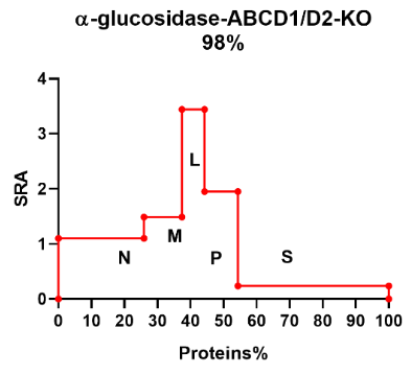
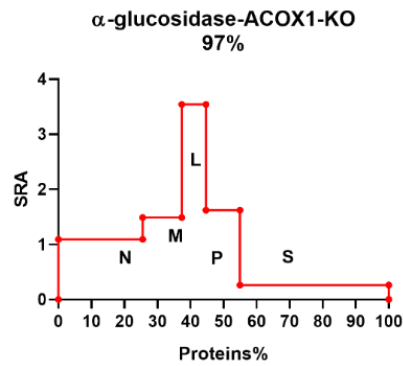
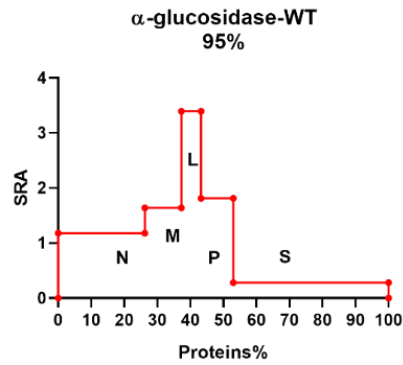


Figure 18: Les Profils de distribution intracellulaire de l'enzyme marqueur du réticulum endoplasmique (α -glucosidase), dans les cinq fractions cellulaires (N, M, L, P et S) obtenues par centrifugation différentielle des homogénats de cellules BV-2 (WT (A), ACOX1-KO (B) et ABCD1/D2-KO (C)). Les repères des graphiques représentent en ordonnée : l'activité spécifique relative (SRA) et en abscisse : le pourcentage cumulé de protéines dans chaque fraction (cumulé de gauche vers la droite). L'aire de chaque rectangle est proportionnelle au pourcentage de l'activité mesurée dans la fraction. Au sommet de chaque graphique est indiqué le pourcentage de récupération représentant le taux d'activité mesuré dans les fractions (N, M, L, P et S) rapportée à l'activité totale dans l'homogénat après centrifugation différentielle.

La (**figure 19**) illustre la distribution de l'activité cytochrome C oxydase, enzyme marqueur des mitochondries, alors que la (**figure 20**) montre la répartition de l'activité DPP3 marqueur du compartiment cytosolique dans les cinq fractions subcellulaires des cellules BV2 microgliales. En scrutant les 2 figures 19 et 20, nous remarquons que l'ensemble des profils de distribution protéique des deux enzymes marqueurs sont presque similaires, et ne révèlent aucun changement dans la taille de mitochondrie ou dans la répartition du cytosol en comparant les cellules sauvages avec les cellules mutantes. En effet, le pourcentage de l'activité cytochrome C oxydase est détectée majoritairement dans la fraction M (mitochondries lourdes) et la fraction L, alors que l'activité de la DPP3 est plus abondante dans la fraction S non-sédimentable. De plus, le facteur d'enrichissement des fractions subcellulaire montre clairement l'absence totale de l'activité cytochrome C oxydase dans les fractions P et S, alors qu'une faible activité de DPP3 peut être retrouvée dans la fraction M.

Dans l'ensemble, les analyses statistiques réalisées, indiquent l'absence de différence statistiquement significative entre les différentes lignées BV-2 au niveau des profils de distribution des pourcentages d'activités des enzymes marqueurs de différents compartiments cellulaires (Mitochondries, Lysosomes, Réticulum endoplasmique (microsomes), et Cytosol). Ajouter à cela, le coefficient de sédimentation des organites dépend de leurs tailles et d'après les résultats obtenus nous pouvons conclure que l'absence de l'expression des gènes *Abcd1/d2* ou *Acox1* dans les cellules microgliales BV-2 ne modifie pas significativement la taille des mitochondries, de lysosomes et des microsomes (réticulum endoplasmique).

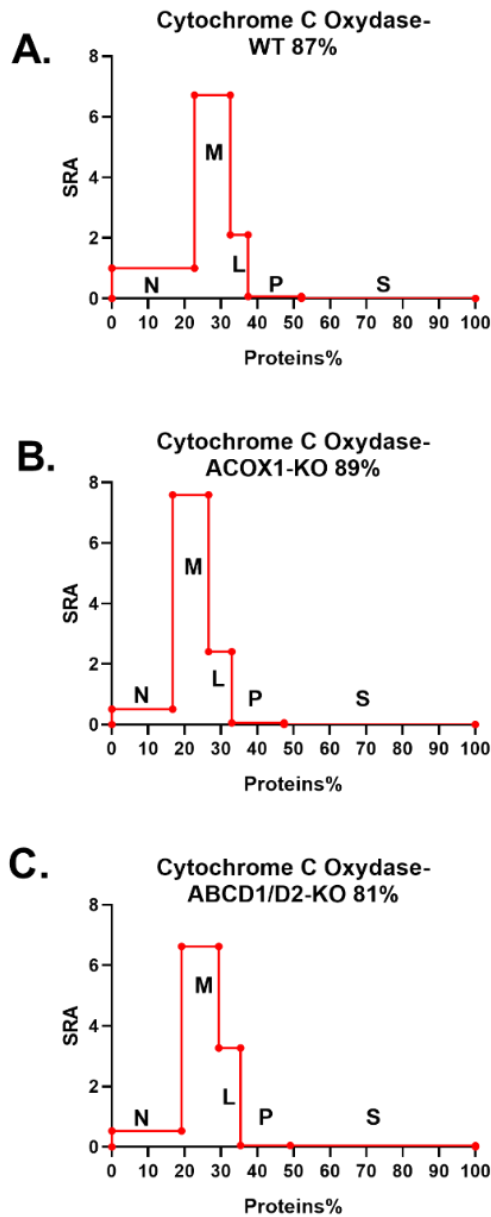


Figure 19: Les Profils de distribution intracellulaire de l'enzyme marqueur de la mitochondrie (Cytochrome C) dans les fractions cellulaires (N, M, L, P et S) obtenues par centrifugation différentielle des homogénats de cellules BV-2 (WT (A), ACOX1-KO (B) et ABCD1/D2-KO (C)). Les repères des graphiques représentent en ordonnée : l'activité spécifique relative (SRA) et en abscisse : le pourcentage cumulé de protéines dans chaque fraction (cumulé de gauche vers la droite). L'aire de chaque rectangle est proportionnelle au pourcentage de l'activité mesurée dans la fraction. Au sommet de chaque graphique est indiqué le pourcentage de récupération représentant le taux d'activité mesuré dans les fractions (N, M, L, P et S) rapportée à l'activité totale dans l'homogénat après centrifugation différentielle.

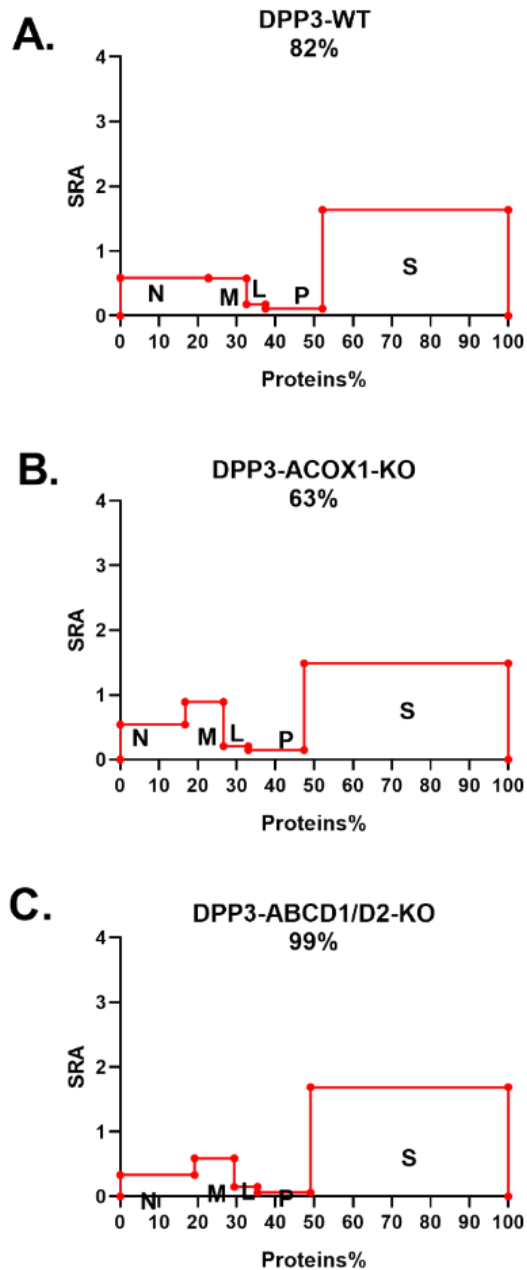


Figure 20 : Les Profils de distribution intracellulaire des enzymes marqueurs de cytosol (DPP3) dans les fractions cellulaires (N, M, L, P et S) obtenues par centrifugation différentielle des homogénats de cellules BV-2 (WT (A), ACOX1-KO (B) et ABCD1/D2-KO (C)). Les repères des graphiques représentent en ordonnée : l'activité spécifique relative (SRA) et en abscisse : le pourcentage cumulé de protéines dans chaque fraction (cumulé de gauche vers la droite). L'aire de chaque rectangle est proportionnelle au pourcentage de l'activité mesurée dans la fraction. Au sommet de chaque graphique est indiqué le pourcentage de récupération représentant le taux d'activité mesuré dans les fractions (N, M, L, P et S) rapportée à l'activité totale dans l'homogénat après centrifugation différentielle.

Pour établir la distribution subcellulaire des peroxysomes à partir d'homogénats des lignées cellulaires sauvages et mutantes, nous avons mesuré dans un premier temps l'activité enzymatique de la catalase dans les différentes fractions subcellulaires obtenues (**figure 21**).

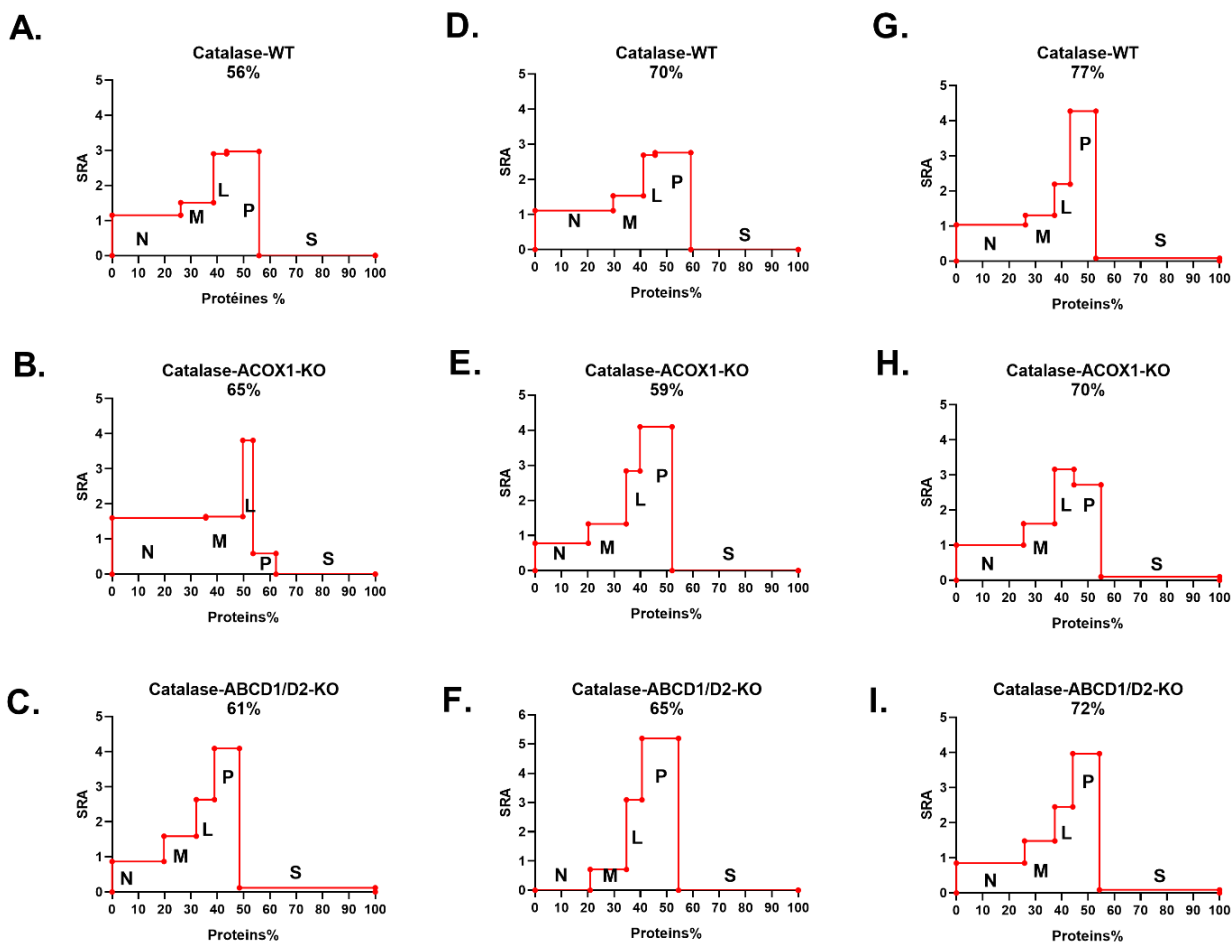


Figure 21: Les Profils de distribution intracellulaire de l'enzyme peroxysomale (Catalase) dans les fractions cellulaires (N, M, L, P et S) obtenues par centrifugation différentielle des homogénats de cellules BV-2 (WT (A. D. G), ACOX1-KO (B. E. H) et ABCD1/D2-KO (C. F. I)). Les repères des graphiques représentent en ordonnée : l'activité spécifique relative (SRA) et en abscisse : le pourcentage cumulé de protéines dans chaque fraction (cumulé de gauche vers la droite). L'aire de chaque rectangle est proportionnelle au pourcentage de l'activité mesurée dans la fraction. Au sommet de chaque graphique est indiqué le pourcentage de récupération représentant le taux d'activité mesurée dans les fractions (N, M, L, P et S) rapportée à l'activité totale dans l'homogénat après centrifugation différentielle

Nous avons réalisé le dosage de la catalase sur les fractions obtenues après centrifugation différentielle d'au moins trois expériences indépendantes de fractionnement subcellulaire (**figure 21**). Tous les résultats ont montré que les peroxyosomes sont répartis entre les deux fractions L et P chez toutes les lignées cellulaires BV2 sauvages et mutantes. Mais, le faible pourcentage de récupération (50-70%) indiquées au sommet de chaque figure dans les différents dosages réalisés sur les cinq fractions ne permettait pas de suivre la répartition de cette activité dans toutes les fractions. Afin de suivre cette distribution de la catalase comme enzyme marqueur de peroxyosome, nous avons donc utilisé la méthode de western blot. L'expérience a été répétée indépendamment quatre fois. Nos résultats montrent, à partir de l'analyse densitométrique, que les fortes intensités du signal catalase sont repérées dans deux fractions L (fraction lysosomale) et P (la fraction microsomale-pré-lysosomale) (**figure22**).

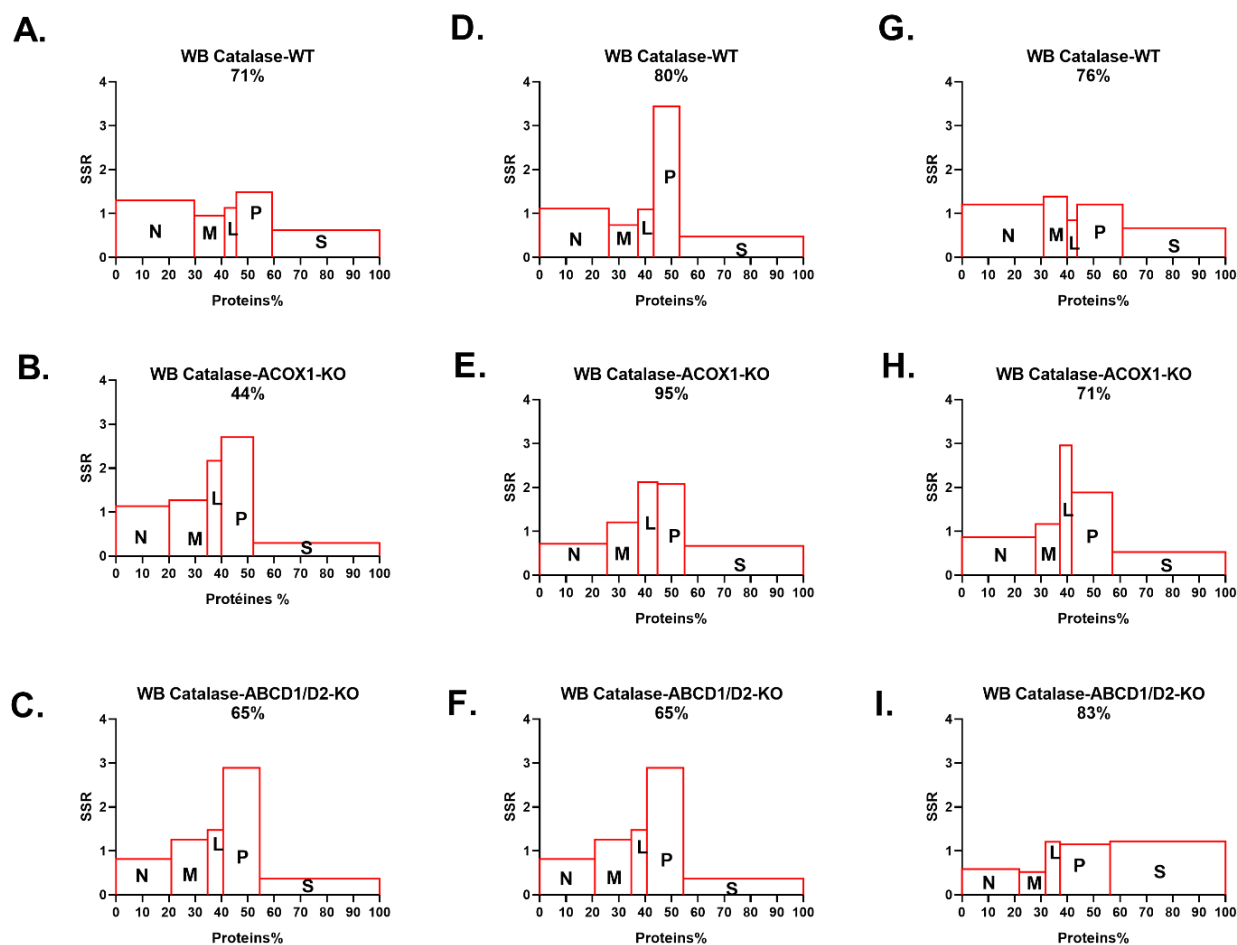


Figure 22: : Les profils de distribution intracellulaire de l'enzyme marqueur de peroxysomes, la catalase (bande 64kDa) obtenu par western blotting dans les homogénats de fractions cellulaires (N, M, L, P et S) des cellules BV-2 ((WT (A. D. G), ACOX1-KO (B. E. H) et ABCD1/D2-KO (C. F. I) après centrifugation différentielle. Des quantités égales de protéines ont été chargées pour chaque fraction sur un gel d'électrophorèse PAGE-SDS, ensuite la catalase a été détectée par immunoblotting sur une membrane PVDF après transfert à l'aide des anticorps primaires et secondaires conjugués à des sondes fluorescentes. Les résultats montrent la distribution des intensités du signal de la catalase, quantifiées par densitométrie, dans chaque fraction rapportée à celui de l'extrait. En ordonnée, RSS : signal spécifique relatif et en abscisse : pourcentage cumulé de protéines dans chaque fraction subcellulaire (cumulé de gauche vers la droite). Au sommet de chaque graphique est indiqué le pourcentage de récupération représentant l'intensité du signal quantifiée dans les fractions (N, M, L, P et S) rapportée à l'intensité totale dans l'homogénat après centrifugation différentielle

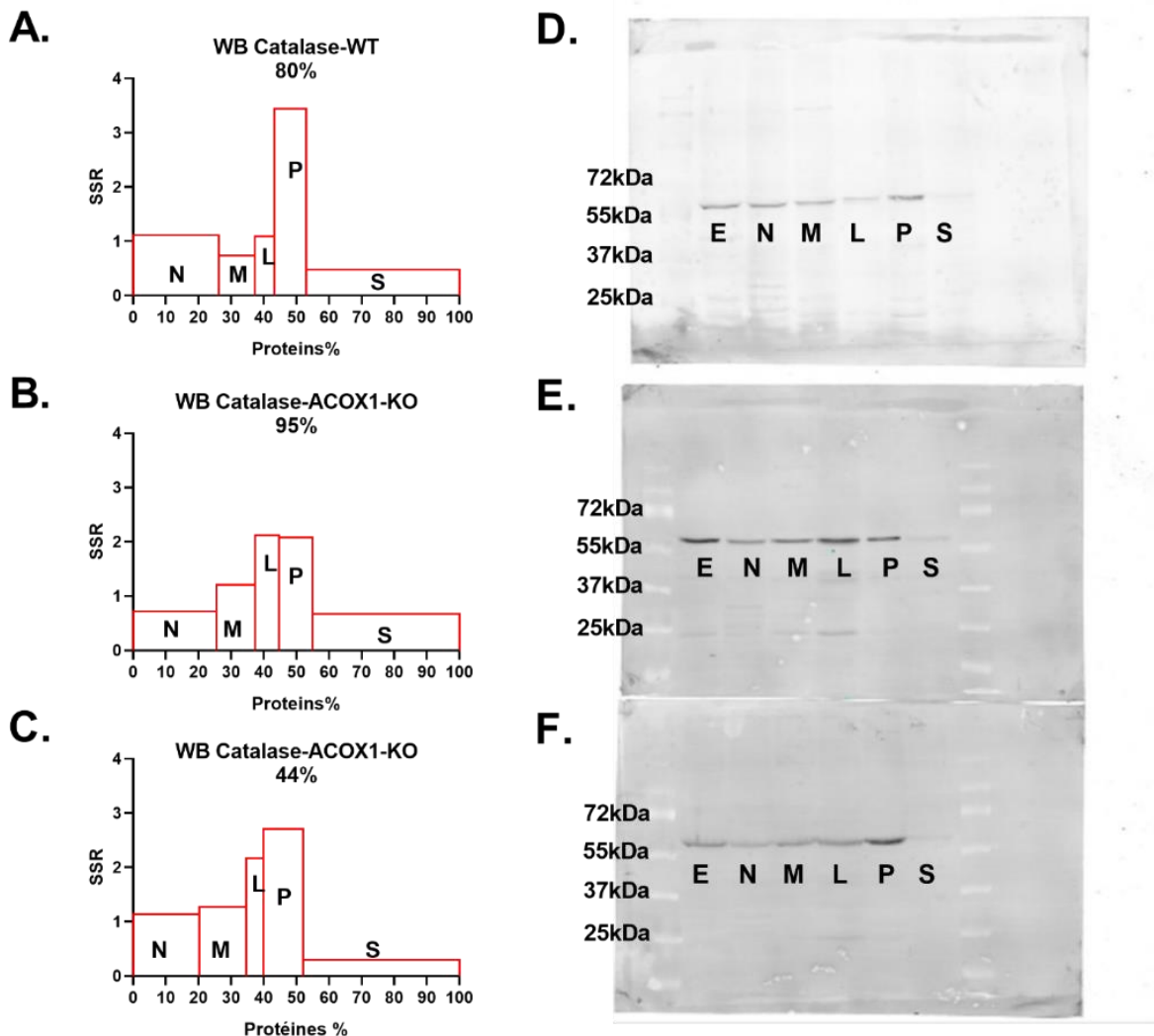


Figure 23: Les profils de distribution intracellulaire de l'enzyme marqueur de peroxysomes, la catalase, dans les fractions cellulaires (E, N, M, L, P et S) des cellules BV-2 (WT (A, D), ACOX1-KO (B, E)) et ABCD1/D2-KO (C, F)) après centrifugation différentielle. Des quantités égales de protéines ont été

chargées pour chaque fraction sur un gel d'électrophorèse PAGE-SDS, ensuite la catalase a été détectée par immunoblotting sur une membrane PVDF après transfert électrophorétique à l'aide des anticorps primaires et secondaires conjugués à des sondes fluorescentes. La distribution des intensités du signal de la catalase, quantifié par densitométrie, dans chaque fraction rapportée à celui de l'extrait. En ordonnée, RSS : signal spécifique relatif et en abscisse : pourcentage cumulé de protéines dans chaque fraction subcellulaire (cumulé de gauche vers la droite). Au sommet de chaque graphique est indiqué le pourcentage de récupération représentant l'intensité du signal quantifiée dans les fractions (N, M, L, P et S) rapportée à l'intensité totale dans l'homogénat (E+N) après centrifugation différentielle.

De nouveau, les résultats d'immunoblotting réalisé sur les cinq fractions des trois lignées cellulaires pour la détection de la catalase, présentés dans la **figure 23**, montrent que les fractions L et P sont les plus enrichies de peroxysomes en comparaison avec les autres fractions subcellulaires. Cependant, les profils de distribution affichent des changements dans le signal spécifique relatif des deux lignées mutantes par rapport aux cellules sauvages WT. Sur trois expériences indépendantes de fractionnement subcellulaires (**Tableau 19**). La lignée mutante ACOX1-KO présente une légère différence de distribution de la catalase peroxysomale. Les peroxysomes sont abondants dans les deux fractions L et P par comparaison avec les autres lignées cellulaires. En réalisant le test statistique ANOVA2, la fraction L montre une différence significative entre la moyenne RSS des cellules ACOX1-KO et les cellules WT.

Tableau 19 : Valeurs RSS de distribution de la protéine peroxysomale catalase de 3 expériences indépendantes, obtenues par la technique de Western Blot dans les différentes fractions subcellulaires N, M, L, P, S, des 3 lignées cellulaires (WT, ACOX1-KO et ABCD1/D2-KO) après centrifugation différentielle (Frct4 : Fractionnement N°4, Frct8 : Fractionnement N°8, Frct9 : Fractionnement N°9

		Frct4	Frct 8	Frct 9	Moyenne	ET
WT	N	1,30	0,55	1,21	1,02	0,41
	M	0,95	0,58	1,39	0,97	0,41
	L	1,13	1,58	0,85	1,19	0,37
	P	1,49	3,79	1,21	2,17	1,42
	S	0,62	0,36	0,67	0,55	0,16
ACOX1-KO	N	1,14	0,75	0,87	0,92	0,20
	M	1,27	0,52	1,17	0,99	0,41
	L	2,17	3,57	2,96	2,90	0,70
	P	2,71	2,62	1,89	2,41	0,45
	S	0,30	0,39	0,53	0,40	0,12
ABCD1/D2-KO	N	0,82	0,66	0,59	0,69	0,12
	M	1,26	0,34	0,52	0,71	0,49
	L	1,48	3,27	1,21	1,99	1,12
	P	2,89	3,33	1,15	2,46	1,15
	S	0,37	0,25	1,22	0,61	0,53

i. L'impact sur la taille des organites

Dans le but d'étudier les modifications intracellulaires susceptibles d'altérer la taille des organites subcellulaire, et vérifier les données rapportées par plusieurs auteurs sur le changement morphologique des organites cellulaires des cellules mutantes. Raas et al., ont rapporté une augmentation dans le nombre de peroxysomes et de mitochondries avec un rétrécissement de la taille de ces dernières dans les cellules microgliales déficientes en *Acox1* (Raas, Saih, et al. 2019). Par ailleurs, Kerckaert et al., avaient signalé une augmentation de taille et de nombre de peroxysomes dans les hépatocytes humaines déficientes (Kerckaert et al. 1995). De plus, une étude conduite par Fan et al., a démontré que la prolifération et la taille des peroxysomes varient avec l'âge chez les souris *Acox1*^{-/-} (Fan et al. 1998).

Nous avons donc réalisé dix expériences indépendantes de fractionnement subcellulaire complet par centrifugation différentielle. Nous avons analysé la répartition intracellulaire de différentes enzymes marqueurs de différents organites dans les cinq fractions (i.e., nucléaire (N), mitochondriale lourde (M), mitochondriale légère (L), microsomale (P), et cytosolique (S)). Ensuite, nous avons comparé le profil de distribution des cellules déficientes avec les cellules sauvages. L'analyse des enzymes marqueurs par des tests *in vitro* colorimétriques ou fluorométriques a révélé que les mitochondries, et le cytosol ont des distributions bien distinctes, tandis que les lysosomes, le réticulum endoplasmique et les peroxysomes se trouvent dans des zones de sédimentation très proches, voire chevauchantes. Ces organites se retrouvent plus répartis entre les trois fractions M, L et P.

Plusieurs auteurs ont signalé la forte contamination de la fraction nucléaire par d'autres organites cytoplasmiques (de Duve et al. 1955). Cette observation est en totale concordance avec les données représentées ici dans notre manuscrit, et qui montrent que tous les enzymes marqueurs sont détectés plus ou moins dans la fraction nucléaire N. Les mitochondries sont de lourdes particules cytoplasmiques dont l'enzyme marqueur est la cytochrome C oxydase. La fraction M (ou fraction mitochondriale lourde) est la plus enrichie de mitochondries, le même résultat est rapporté par Jadot et al. après fractionnement par centrifugation différentielle du foie de rat dans un milieu constitué de 0,25M de sucrose (Michel Jadot et al. 2017). Malgré les changements morphologiques que subissent les cellules microgliales pendant leur activation à cause des

déficiences peroxysomales, mais rien n'indique jusqu'à présent que leurs mitochondries soient altérées. En l'occurrence, la distribution de l'activité cytochrome oxydase dans les fractions subcellulaires après centrifugation d'homogénats issus des cellules déficientes en ACOX1 et ABCD1/D2 est restée inchangée en comparaison avec celle des cellules sauvages.

En ce qui concerne la structure subcellulaire lysosomale, nos résultats ont montré que les deux enzymes marqueurs de lysosome (β -galactosidase et cathepsine C) sont présentes abondamment dans la fraction L des cellules microgliales des trois lignées cellulaires BV2 microgliales sauvages et mutantes. Ces observations sont en accord avec la distribution de l'enzyme marqueur de lysosomes la β -galactosidase (détectée par dosage enzymatique sur les cinq fractions d'ostéoclastes dérivées de macrophages RAW264.7) indique que l'enzyme est enrichie abondamment dans la fraction L et un peu moins dans la fraction M (Puissant et Boonen 2016). Également, pour le profil de distribution de lysosomes dans le foie de souris et de rat publié par Jensen et al. (Jensen et al. 2007), la β -galactosidase est détectée dans la fraction L et seule une petite portion de son activité se situe dans la fraction M. Ces résultats indiquent que les déficiences peroxysomales ne modifient pas le coefficient moyen de sédimentation des lysosomes dans un milieu iso-osmotique de saccharose et ne provoque donc probablement pas de gonflement de ces organites comme on le voit dans le passage de l'apoptose à la nécrose lors de la mort cellulaire (Ono et al. 2003). La distribution de l'hydrolase lysosomale cathepsine C des fibroblastes WI-38 humaines après une centrifugation différentielle montre que l'activité de la protéine de référence est plus importante dans la fraction L que dans les autres fractions subcellulaires (Hamer et Jadot 2005). Ceci est parfaitement comparable à nos résultats de fractionnement par centrifugation différentielle appliqués aux cellules microgliales. L'activité de l'enzyme marqueur du réticulum endoplasmique est l' α -glucosidase alcaline, est retrouvée abondamment dans la fraction L (mitochondriale légère) des cellules BV2 microgliales sauvages et mutantes. En revanche, l' α -glucosidase alcaline de foie de souris est enrichie dans la fraction P (microsomale) et un peu moins dans la fraction L (Boonen et al. 2014).

Cependant, compte tenu du faible pourcentage de récupération obtenu dans le dosage de l'activité catalase peroxysomale dans les fractions subcellulaires après centrifugation différentielle, nous avons donc examiné la localisation de la protéine peroxysomale par Western blot. Il faut noter que, les variations importantes des profils de distributions et les faibles pourcentages de

récupération pourraient être liés soit aux modifications subies par les systèmes enzymatiques ou aux artefacts associés aux tests enzymatiques. Dans les cellules BV2 microgliales, les peroxysomes sont retrouvés majoritairement dans la fraction P. Un fort signal catalase a été détecté dans la fraction L enrichie en lysosomes, avec le signal le plus fort dans la fraction P (microsomale). Alors que les résultats publiés sur le foie de rat, les peroxysomes sont plutôt retrouvés dans la fraction L (Della Valle et al. 2011). Ces résultats peuvent indiquer que la taille des peroxysomes dans les hépatocytes est plus importante que celle des peroxysomes des cellules microgliales BV-2. L'interprétation des résultats de expériences de fractionnement tissulaire est difficile, dû à l'hétérogénéité cellulaire du matériel de départ. Dans le foie, les types de cellules accessoires ne représentent qu'une petite proportion de la masse totale de l'organe, mais ils pourraient néanmoins être une source additionnelle de changement des propriétés de centrifugation des organites (Baudhuin et al. 1956). Les déficiences en ACOX1 ou en ABCD1/D2 n'affecteraient pas les profils de distribution de peroxysomes en comparant les cellules sauvages aux cellules mutantes. Le travail publié de Puissant et Boonen (Puissant et Boonen 2016) montre que la fraction P des ostéoclastes est plus enrichie en compartiments biosynthétiques tels que le réticulum endoplasmique, les endosomes et l'appareil de golgi, en comparaison avec les fractions M et L, révélé par le profil de distribution de l'enzyme marqueur du réticulum endoplasmique l' α -glucosidase alcaline. Tandis que nos résultats sur les cellules microgliales montrent que l'activité de l'enzyme marqueur du réticulum endoplasmique est plus importante dans la fraction L. Quant au compartiment cytosolique détecté par l'activité de l'enzyme marqueur DPP3, il se situe dans la dernière fraction S non sédimentable des cellules BV2 microgliales des trois lignées cellulaires sauvages et mutantes. Ajouter à cela, de faibles proportions d'activité DPP3 sont détectables dans les deux fractions N (nucléaire) et M (mitochondriale lourde) avec un fort coefficient de sédimentation. L'analyse globale des résultats obtenus par centrifugation différentielle montre clairement que la taille des compartiments subcellulaires dans les cellules BV2 microgliales ne serait pas altérée en l'absence de l'expression de gènes peroxysomiaux ACOX1 et ABCD1/D2.

1.2. Fractionnement dans un gradient de densité

Pour affirmer ou infirmer l'hypothèse de changements de la taille et/ou de la densité des organites des cellules microgliales mutantes, nous avons décidé de réaliser des analyses par centrifugation dans trois gradients de densité différents : Nycodenz, Percoll ou Saccharose.

1.2.1. Gradient de densité de Nycodenz

Afin d'analyser les différences intrinsèques pouvant affecter la densité des organites, nous avons utilisé un gradient de densité continu de Nycodenz (**Figure 24**). Après fractionnement par centrifugation différentielle, un mélange de fractions M+L+P contenant majoritairement les peroxysomes et les lysosomes a été déposé au-dessus du gradient continu de Nycodenz de densité allant de 1,06 à 1,26 g/ml. Après ultracentrifugation du gradient, 11 fractions ont été collectées séparément. Le dosage *in vitro* des enzymes marqueurs sur les différentes fractions a montré que les trois lignées cellulaires sauvages et mutantes présentent presque le même profil de distribution d'organite sur le gradient de densité de Nycodenz. Les lysosomes des trois lignées cellulaires représentés par l'enzyme marqueur β -galactosidase sédimentent dans la zone de densité 1,14 et 1,15 g/ml (**Figure 24, A**). Tandis que les endosomes et les compartiments de biosynthèse appelés aussi pré-lysosomales y compris le réticulum endoplasmique représenté par l' α -glucosidase alcaline se situent pas loin des lysosomes, dans une région un peu plus dense avec une médiane de 1,17 à 1,18 g/ml (**Figure 24, B**). Le dosage de la cytochrome oxydase marqueur enzymatique des mitochondries a permis de repérer la localisation des mitochondries qui se trouvent abondamment dans la zone de densité de 1,15 g/ml chez toutes les lignées cellulaires (**Figure 24, C**). Alors que la zone de densité médiane enrichie en peroxysomes était de 1,19 g/ml, établie grâce à l'activité de catalase dosée sur les différentes fractions subcellulaires (**Figure 24, D**). Dans le gradient de Nycodenz, la distribution de l'ensemble des enzymes marqueurs de lysosomes et de mitochondries des trois lignées cellulaires, se concentrent au milieu du gradient dans une région de densité médiane de 1,15 g/ml, alors que les compartiments pré-lysosomal et peroxysomal sont détectés dans les fractions de plus grande densité du gradient.

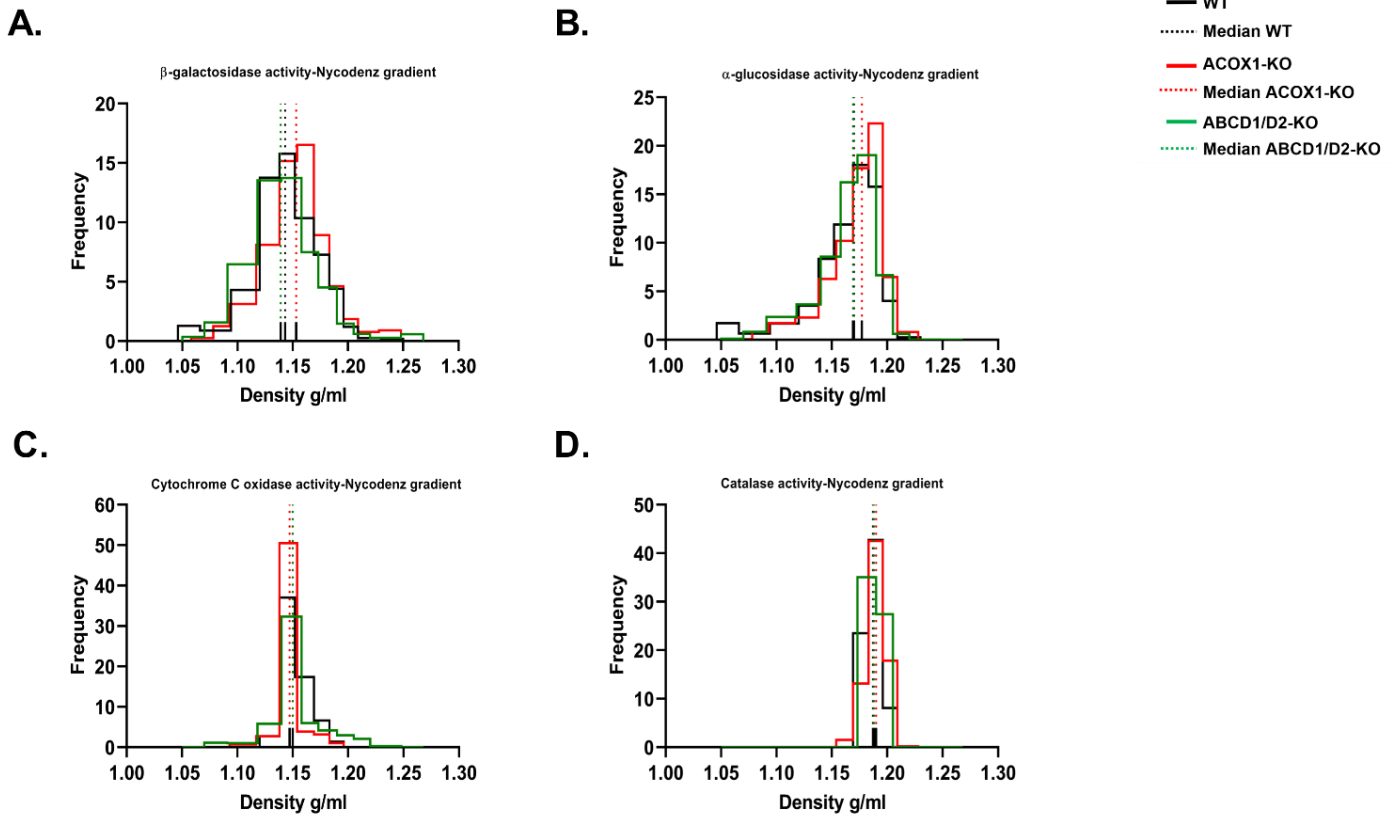


Figure 24: La distribution intracellulaire des enzymes marqueurs de lysosomes (β -galactosidase), réticulum endoplasmique (α -glucosidase alcaline), mitochondrie (cytochrome C oxydase) et peroxysome (Catalase) après ultracentrifugation isopycnique (gradient continu de Nycodenz de 1,06 à 1,26 g/ml). Un mélange de fractions M+L+P obtenu par centrifugation différentielle des cellules BV-2 (WT, ACOX1-KO et ABCD1/D2-KO) a été fractionné par ultracentrifugation isopycnique en utilisant un gradient de Nycodenz ; En Ordonnée : La fréquence, représente le quotient du pourcentage d'activité divisé par l'incrément de densité entre deux fractions, et en abscisse : La densité de la fraction en g/ml, et puis la densité médiane indiquée dans le graphique désigne la densité à laquelle se retrouve 50% des organites à l'équilibre.

Le faible pourcentage de récupération obtenu à partir de la plupart des résultats de dosage de catalase effectué sur les 11 fractions subcellulaires, récupérées après centrifugation isopycnique dans un gradient de Nycodenz, peut mésestimer la distribution réelle des peroxysomes dans les cellules microgliales. Donc, il est difficile d'avoir une conclusion définitive à partir de la répartition de l'enzyme de la catalase montrée dans la **figure 24, D**. L'étape suivante, était de réaliser une semi-quantification protéique par western blot sur les différentes fractions, dans le but

de confirmer la représentation graphique de distribution de la catalase contenue dans le système peroxysomal.

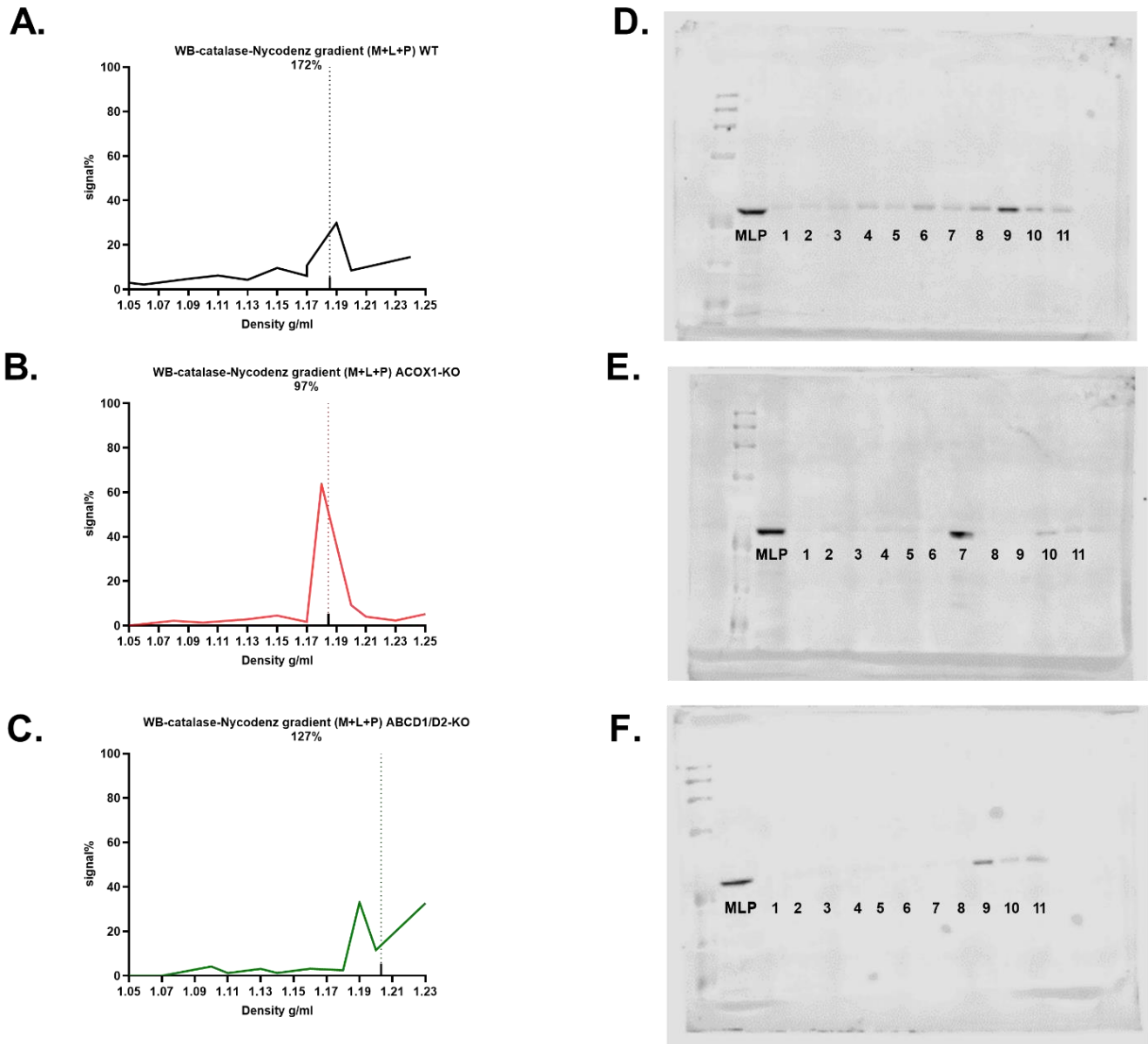


Figure 25: Analyse de la distribution intracellulaire de la catalase, l'enzyme marqueur du peroxysome après ultracentrifugation isopycnique (gradient de Nycodenz de 1,06 à 1,26 g/ml). Un mélange de fractions M+L+P obtenu par centrifugation différentielle des cellules BV-2 (WT (A, D), ACOX1-KO (B, E) et ABCD1/D2-KO (C, F)) a été fractionné par ultracentrifugation isopycnique en utilisant un gradient de Nycodenz. Les tubes du gradient ont été coupés de haut en bas en fractions qui ont été ensuite analysées par western blot pour détecter la catalase. L'intensité du signal obtenue pour chaque fraction a été évaluée par densitométrie et les résultats ont été rapportés sur le graphique pour les trois lignées cellulaires. L'ordonnée du graphe correspond à la fréquence ($Q/SQ.r$, où Q représente l'intensité trouvée

pour la fraction, et SQ, le total des intensités récupérées dans toutes les fractions, et r, l'incrément de densité entre deux fractions), et en abscisse : La densité de la fraction en g/ml, la densité médiane indiquée dans le graphique désigne la densité dans laquelle on retrouve 50% des organites à l'équilibre.

L'analyse du signal obtenu par western blot de la catalase dans chaque fraction révèle une faible différence de la médiane de densité pour les cellules BV-2 déficientes ABCD1/D2-KO par rapport aux cellules sauvages (**figure 25**). Nous remarquons que la médiane de densité est décalée vers la zone à forte densité du gradient Nycodenz de 1,21 g/ml. Alors que, la médiane de densité des peroxysomes pour les cellules déficientes en ACOX1 est de 1,18 g/ml, similaire à celle des cellules sauvages.

A partir de trois expériences indépendantes de fractionnement dans un gradient de Nycodenz, et après l'analyse des résultats obtenus par western blot ou par dosage enzymatique de la catalase (**Tableau 20, 21**), la réalisation des tests statistiques a démontré que les changements des valeurs de médiane de densité n'est pas statistiquement significatif et que le profil de distribution des peroxysomes se ressemble dans les trois lignées BV2 sauvages et mutantes. Donc, l'ensemble des peroxysomes cellulaires sédimentent dans une zone de 1,18 à 1,19g/ml de densité dans un gradient de Nycodenz. D'après les tableaux représentés ci-dessous, on voit clairement que les moyennes de médianes de densité obtenus par dosage d'activité enzymatique de la catalase ne sont pas loin des valeurs de médiane obtenues par immunoblotting.

Tableau 20: Les moyennes de densités médianes de trois expériences indépendantes de fractionnement sur gradient de de Nycodenz de densité allant de 1,06 à 1,26 g/ml après analyse par immunoblotting de catalase, enzyme marqueur du peroxysome

Lignée cellulaire	Médiane Exp1 g/ml	Médiane Exp2 g/ml	Médiane Exp3 g/ml	Moyenne g/ml	SD
WT	1,1768	1,1855	1,1667	1,1763	± 0,007
ACOX1-KO	1,1866	1,1845	1,1901	1,1870	± 0,002
ABCD1/D2-KO	1,1894	1,2031	1,1872	1,1932	± 0,007

Tableau 21: Les moyennes de densités médianes de trois expériences indépendantes de fractionnement sur gradient de de Nycodenz de densité allant de 1,06 à 1,26 g/ml après dosage de l'activité de la catalase, enzyme marqueur du peroxysome.

Lignée cellulaire	Médiane Exp1 g/ml	Médiane Exp2 g/ml	Médiane Exp3 g/ml	Moyenne g/ml	SD
WT	1,1870	1,1928	1,1658	1,1818	± 0,01
ACO1-KO	1,1901	1,1853	1,1889	1,1881	± 0,002
ABCD1/D2-KO	1,1876	1,1979	1,1865	1,1906	± 0,005

1.2.2. Gradient de densité de Percoll

Le protocole décrit par Green et al. (Green et al. 1987) a été utilisé pour mieux séparer certains organites dans un gradient de densité Percoll™. Dans le but de mieux séparer les organites cellulaires co-distribués après centrifugation différentielle, et de repérer les variations possibles de densité et la distribution des enzymes dans les cellules microgliales. Brièvement, les fractions M, L et P ont été regroupées et chargées au-dessus d'une solution à 18 % de Percoll™ (18 % v/v Percoll™ [Pharmacia], 0,25 M de saccharose, 2 mM EDTA et 10 mM de Tris-HCl, pH 7,4). Après centrifugation pendant 40 min à 4°C, le gradient a été divisé en sept fractions de haut en bas. Pour contrôler la formation du gradient de densité, l'indice de réfraction de chaque fraction a été mesuré avec un réfractomètre. L'activité des enzymes marqueurs a été mesurée dans toutes les fractions collectées par des tests fluorimétriques. L'analyse par western blot n'a pas été réalisée car il nécessitait une étape supplémentaire pour éliminer les billes de Percoll.

Après centrifugation, les billes Percoll™ génèrent un gradient non linéaire continu dans lequel les lysosomes sont capables de sédimenter jusqu'à la fraction la plus dense du gradient (fraction 7), comme le montre la distribution de la β -galactosidase. Tandis que les microsomes (réticulum endoplasmique) détectés grâce à l'activité α -glucosidase alcaline, restent dans la partie inférieure du gradient de densité (la fraction 3) (**figure 26**). Les profils de distribution des lysosomes et de microsomes, en comparant les trois lignées cellulaires dans le gradient Percoll, viennent confirmer les résultats antérieurs obtenus après fractionnement sur un gradient de densité Nycodenz, où nous n'observons aucune différence ou changement remarquable dans la répartition cellulaire des organites. Comme le montre la **figure 26 (A, B et C)**, l'activité β -galactosidase dans

les fractions issues des trois lignées cellulaires sauvages et mutantes se concentre dans la fraction 7 enrichie de lysosomes, par rapport à l'ensemble des fractions, elle représente jusqu'à 75% d'activité. Alors que l'activité de l' α -glucosidase alcaline enzyme marqueur de microsomes, est détectée majoritairement dans la 3^{ème} fraction, et elle se trouve avec un pourcentage d'activité de 30% par rapport à la somme d'activité calculée dans le mélange M+L+P.

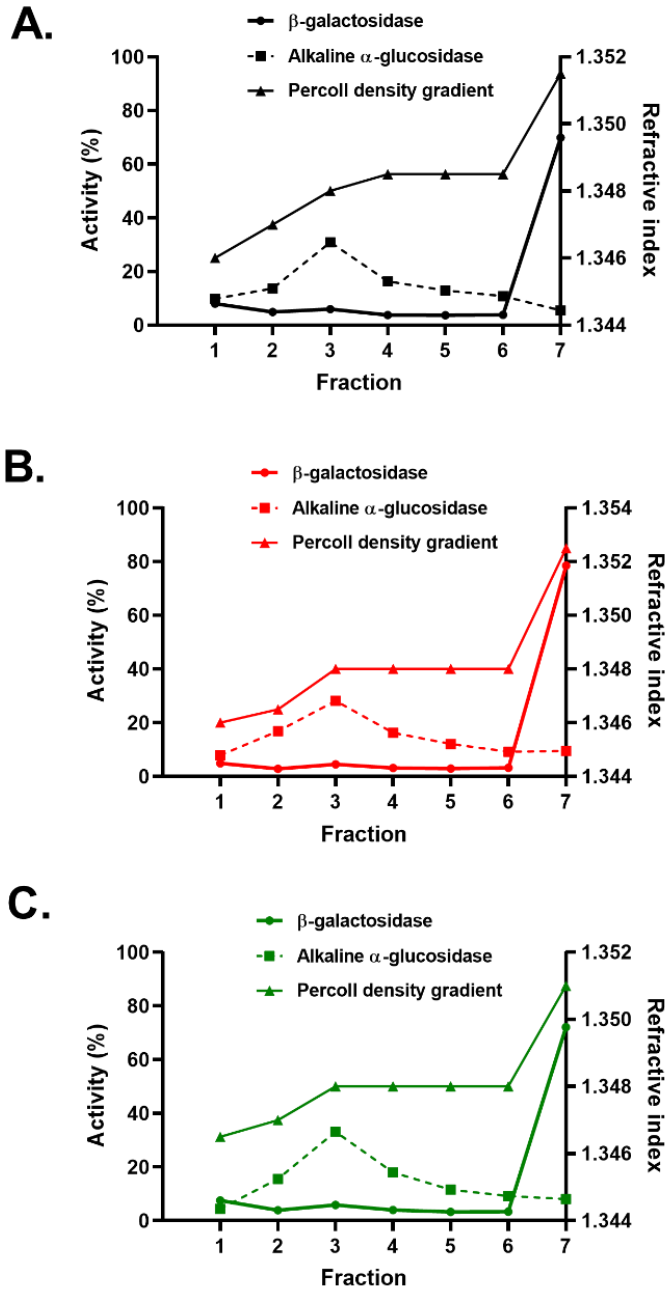


Figure 26: La distribution des activités relatives des enzymes marqueurs de lysosomes (β -galactosidase) et de microsomes des cellules BV2 microgliales dans un gradient de densité de Percoll. Un mélange de fractions M+L+P obtenues par centrifugation différentielle a été centrifugé dans un gradient de densité Percoll™ et 7 fractions ont été collectées de haut en bas du tube de centrifugation. La distribution des lysosomes et des microsomes a été établie sur la base respectivement des activités de la β -galactosidase et de l' α -glucosidase alcaline, mesurées dans les différentes fractions des trois lignées cellulaires (A. WT, B. ACOX1-KO, C. ABCD1/D2-KO). Le graphique montre le pourcentage de β -galactosidase et d' α -glucosidase alcaline dans chaque fraction du gradient Percoll™ et la densité de ces fractions.

1.2.3. Gradient de densité de saccharose

Le mélange d'organites M+L+P a été déposé sous forme de couche homogène au sommet d'un gradient linéaire de densité de sucrose qui s'étend de 1,09 g/cm³ à 1,26 g/cm³. Ce dernier subi une centrifugation isopycnique dans un rotor SW 65 Beckman, les fractions ont été recueillies en coupant le tube avec un dispositif similaire à celui décrit par Beaufay et al. (Beaufay et al. 1959; 1964). La linéarité du gradient a été vérifiée en mesurant la concentration du soluté dans chaque fraction par réfractométrie. Les activités β -galactosidase et de la catalase ont été dosées sur les 11 fractions de chaque type cellulaire. La **figure 28** regroupe l'ensemble des résultats obtenus après le dosage de la β -galactosidase enzyme marqueur de lysosome (A) et la catalase enzyme marqueur de peroxysomes (B). En effet, chaque graphique est une superposition des profils répartition des lysosomes ou de peroxysomes des trois lignées cellulaires avec les médianes de densité indiquées dans chaque graphe, pour faciliter la comparaison des profils de distributions entre les lignées cellulaires sauvages et mutantes, et repérer s'il existe un décalage dans la zone de concentration de l'organite ciblé.

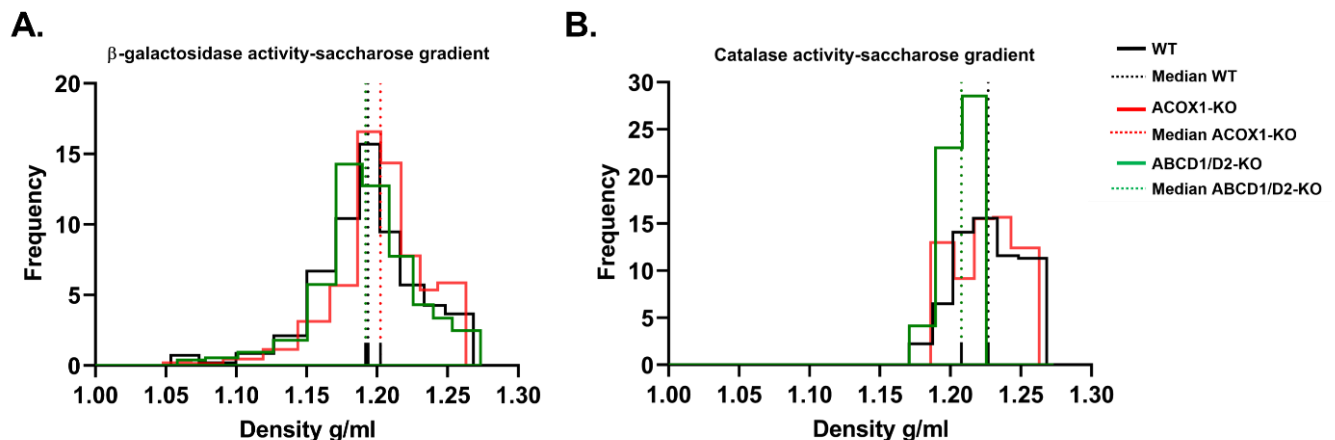


Figure 27: La distribution des activités de la β -galactosidase (enzyme marqueur de lysosome) et de la catalase, (enzyme marqueur du peroxysome) après ultracentrifugation isopycnique (gradient de saccharose allant de 1,09 g/cm³ à 1,26 g/cm³). Un mélange de fractions M+L+P obtenu par centrifugation différentielle des homogénats de cellules BV-2 (WT, ACOX1-KO, ABCD1/D2-KO) a été fractionné par ultracentrifugation isopycnique en utilisant un gradient de Saccharose. Les fractions du gradient ont été analysées par dosage enzymatique pour détecter la β -galactosidase (A) et catalase (B), les résultats ont été rapportés sur le graphique pour les trois lignées cellulaires. En Ordonnée : La fréquence, représente le quotient du pourcentage d'activité divisé par l'incrément de densité entre deux fractions, et en abscisse : La densité de la fraction en g/ml. La médiane indiquée dans le graphique désigne la densité dans laquelle on retrouve 50% des organites à l'équilibre.

La **figure 27 A** montre que la plupart des lysosomes se trouvent dans une zone de densité élevée de 1,20 g/ml. De plus, on remarque que les cellules WT et déficientes en ABCD1/D2 ont une médiane de densité identique, alors que les activités de cellules mutantes ACOX1-KO présentent un très faible décalage vers les zones à forte densité.

Après dosage de l'activité catalase, les peroxysomes (**Figure 27, B**) présentent un léger décalage de la médiane de densité dans les cellules ABCD1/D2-KO vers les zones de faible densité avec une fréquence double que celle des cellules WT et ACOX1-KO. En comparant les zones de sédimentations des deux types d'organites, nous constatons clairement que les deux structures intracellulaires présentent des médianes de densités différentes, les peroxysomes sédimentent dans une zone de densité un peu plus grande du gradient de densité en comparaison avec les lysosomes.

Il est possible de stipuler un changement de densité des peroxysomes dans les cellules mutantes par rapport aux cellules sauvages. Pour cette raison, nous avons réalisé une analyse par immunoblotting de ces fractions (obtenues par centrifugation isopycnique dans un gradient de sucrose linéaire) pour détecter la catalase, l'enzyme marqueur du peroxysome. La **figure 28** montre l'analyse des profils de distribution de la catalase peroxysomale pour chaque lignée cellulaire BV2 microgliale et l'immunoblot correspondant. L'intensité du signal de chaque fraction est rapportée à l'intensité du signal détectée dans le mélange de fractions M+L+P.

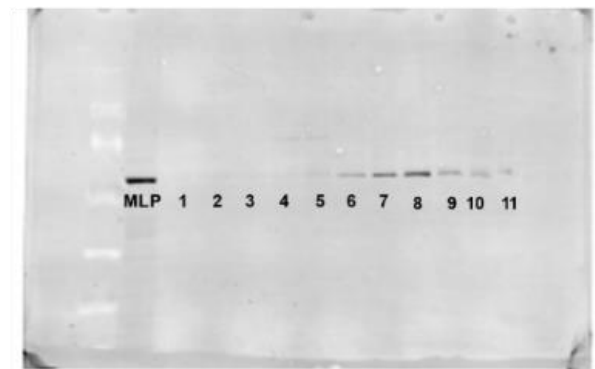
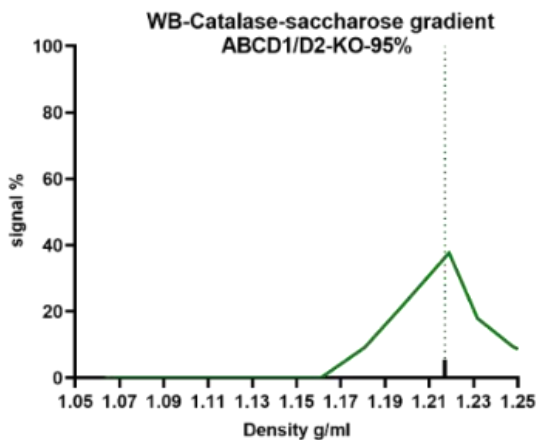
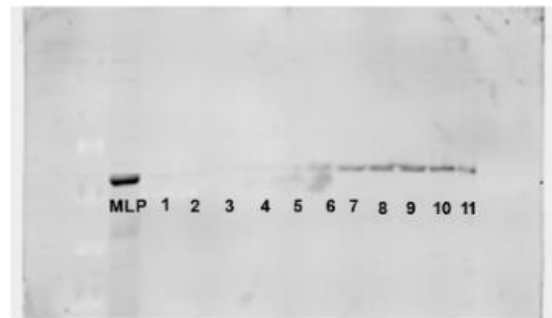
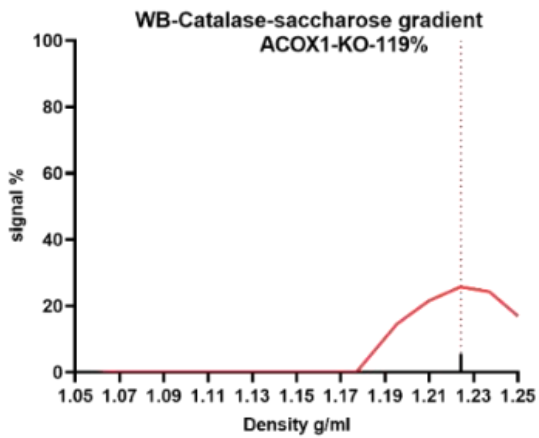
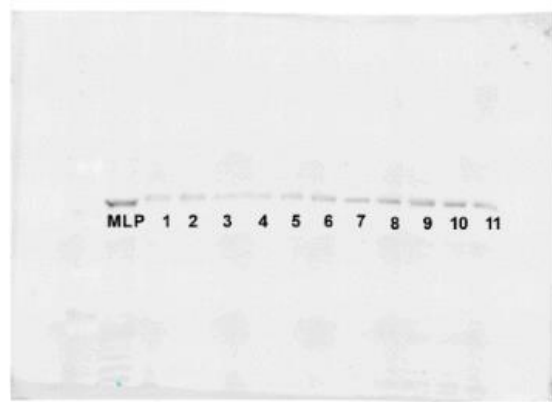
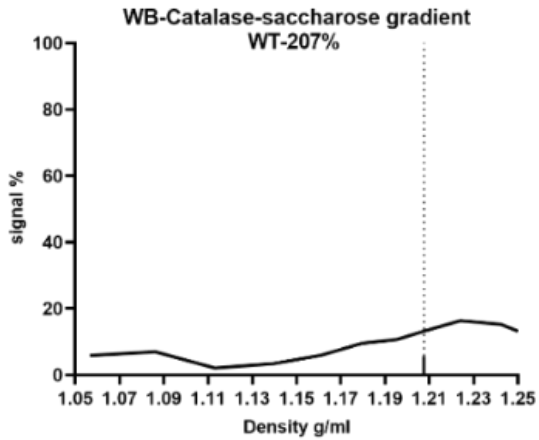


Figure 28: Analyse de la distribution intracellulaire de la catalase, l'enzyme marqueur du peroxysome, après ultracentrifugation isopycnique (gradient de sucrose de 1,06 à 1,26 g/ml). Un mélange de fractions M+L+P obtenu par centrifugation différentielle des homogénats de cellules BV-2 (WT (A, D), ACOX1-

KO (B, E) et ABCD1/D2-KO (C, F)) a été fractionné par ultracentrifugation isopycnique en utilisant un gradient de sucrose. Les fractions du gradient ont été coupées de haut en bas, et ensuite analysées par immunoblotting pour détecter la catalase. L'intensité du signal obtenue pour chaque fraction a été évaluée par densitométrie et les résultats ont été rapportés sur le graphique pour les trois lignées cellulaires. L'ordonnée du graphe correspond à la fréquence ($Q/SQ.r$, où Q représente l'activité trouvée dans la fraction, et SQ est l'activité totale représentant la somme des activités dans chaque fraction, et r , l'incrément de densité entre deux fractions), et en abscisse : La densité de la fraction en g/ml, la densité médiane indiquée dans le graphique désigne la densité dans laquelle on retrouve 50% des organites à l'équilibre.

Les résultats obtenus par dosage enzymatique de la catalase ont révélé la présence d'un décalage dans la zone de sédimentation des peroxysomes dans les cellules ABCD1/D2-KO, ont été vérifiés par immunoblotting (**Figure 28**). Le Western blot montre que les zones de sédimentations des peroxysomes varient faiblement, mais ces variations ne sont pas statistiquement significatives. L'immunoblotting sur les échantillons du fractionnement subcellulaire obtenu après centrifugation isopycnique d'un gradient de densité de saccharose a permis de déterminer que les peroxysomes dans les trois lignées cellulaires sédimentent dans une zone de densité comprise entre 1,21 et 1,22 g/ml (**Figure 28**). Le type de gradient utilisé pour le fractionnement peut aussi modifier mais légèrement la densité des structures subcellulaires. Dans le gradient de Nycodenz (Figure 25), les peroxysomes se trouvaient dans une zone de densité de 1,19-1,21g/ml. Alors que, dans le gradient de sucrose, après fractionnement la catalase se concentre dans la région de 1,21-1,22g/ml.

ii. Impact sur la densité des organites

Le coefficient de sédimentation de particules cellulaires ne dépend pas seulement de la taille, mais également de la densité de celles-ci. Étant donné que les lysosomes, les mitochondries, les peroxysomes et les microsomes ont des profils de distribution presque similaires et qui parfois se chevauchent, nous avons fait appel à l'utilisation de gradient de densité de Nycodenz à faible osmolarité (Graham 2001a; 2001b). Donc, pour mieux documenter les caractéristiques des structures cytoplasmiques et leurs distributions intracellulaires dans les cellules microgliales et explorer les différences intrinsèques de densité des organites (R. Wattiaux et al. 1978) nous avons utilisé une approche combinée de centrifugation différentielle et gradient de densité Nycodenz décrite dans la littérature par Jadot et al., (Michel Jadot et al. 2017). Pour séparer davantage les fractions subcellulaires, un mélange de fractions M+L+P des cellules microgliales obtenues par

centrifugation différentielle a été centrifugé dans un gradient de densité Nycodenz discontinu, et 11 fractions ont été ensuite collectées de haut en bas du tube de centrifugation. Ceci permet une bonne séparation des peroxysomes des autres constituants majeurs de la fractions L (lysosomes et microsomes). Les activités relatives spécifiques des enzymes marqueurs de lysosomes et de peroxysomes ont été mesurées sur les différentes fractions. La modification de la densité peut être suffisante pour permettre aux particules cytoplasmiques de migrer dans un gradient de Nycodenz, loin de leur densité d'équilibre normale indiquée par la médiane de densité. L'enzyme marqueur β -galactosidase des lysosomes des cellules microgliales sédimentent dans la zone de densité 1,14 et 1,15 g/ml du gradient de Nycodenz. Alors que la densité d'équilibre des microsomes représentés par l' α -glucosidase alcaline, se situe dans une région un peu plus dense avec une médiane de 1,17 à 1,18g/ml de densité. Alors qu'en regardant la distribution de l'activité α -glucosidase alcaline des cellules humaines CFPAC de la fibrose hépatique, la médiane de densité d'équilibre a été partagée entre un pic dans la zone supérieure du gradient de densité (maximum à 1,112 g/ml) et une autre activité vers la zone la plus dense du gradient, représentant peut-être une enzyme libérée des microsomes sous forme soluble (Gilbert et al. 1998). Les mitochondries se trouvent dans la zone de densité de 1,15g/ml chez toutes les lignées cellulaires. Alors que la zone de densité enrichie en peroxysomes était de 1,19g/ml de densité, repérée grâce à l'activité de catalase dosée sur les différentes fractions subcellulaires. Par ailleurs, une autre étude faite avec les fractions M+L (fractions mitochondriale lourde et légère) isolées à partir du foie de souris ont été centrifugé dans un gradient de Percoll. Les résultats ont montré que dans des conditions iso-osmotique les lysosomes sédimentent dans les zones les plus denses du gradient Percoll (Fraction 6) (Robert Wattiaux et al. 2007). Pour l'activité cytochrome C oxydase marqueur de mitochondrie, elle se trouve majoritairement dans les fractions lourdes du gradient de densité Percoll (Fraction 7). Ici, le dosage enzymatique *in vitro* de cytochrome C oxydase n'était fait que sur les fractions du gradient de Nycodenz, et dans celui-ci nous voyons que la médiane de densité de la β -galactosidase qui est à 1,15g/ml pour toutes les lignées cellulaires BV2, est la même densité d'équilibre qui est retrouvée pour cytochrome C oxydase des cellules BV2 microgliales. Les fractions M+L+P (fractions issues de la centrifugation su surnageant postnucléaire) des cellules cancéreuses HeLa d'origine humaine ont également fait l'objet d'une analyse par fractionnement subcellulaire par centrifugation isopycniqque dans un gradient Percoll. Une nouvelle fois, les lysosomes se retrouvent présents abondamment dans la fraction 7 (Boonen et al. 2008).

Quand le mélange de fractions M+L+P a été centrifugé dans un gradient de densité Percoll, cela a permis aux lysosomes (grâce à la mesure de l'activité β -galactosidase) de sédimenter dans la fraction (La fraction 7) la plus dense du gradient. Ce résultat ressemble à celui obtenu avec les ostéoclastes issues de macrophage (Puissant et Boonen 2016; Puissant et al. 2014). En revanche, les compartiments biosynthétiques/pré-lysosomales (réticulum endoplasmique, appareil de golgi et endosome) contenant de l' α -glucosidase alcaline sont restés dans la zone de faible densité du gradient Percoll ce qui est aussi le cas pour les ostéoclastes différenciés à partir des macrophages RAW264.7. En effet, l'activité de l' α -glucosidase alcaline se trouve dans la fraction 3 du gradient de densité Percoll (Puissant et Boonen 2016). Les trois lignées cellulaires microgliales BV-2 sauvages et mutantes présentent le même profil de distribution des deux enzymes lysosomal et pré-lysosomal et les déficiences en ACOX1 ou en ABCD1/ABCD2 n'affectent pas cette distribution. Les fractions d'organites (c.-à-d. M, mitochondrie lourde ; L, mitochondrie légère ; et P, microsomal) issues des cellules 293 de reins embryonnaires humains, (également appelées cellules HEK293), et préparées à partir du surnageant postnucléaire ont été mélangés, puis fractionnés dans un gradient de Percoll discontinu. Le profil de distribution de lysosomes des cellules HEK293 est similaire à celui des cellules microgliales BV-2 (Chauvet et al. 2015). Pareillement, pour les fibroblastes WI-38 (fibroblastes de poumon humains) montrent un enrichissement de la fraction 7 en lysosomes (Hamer et Jadot 2005).

Pour l'analyse Western blot, Inous avons déposé la même quantité de protéines dans chaque puits du gel PAGE-SDS et donc l'intensité du signal mesurée après immunoblot correspond à l'enrichissement relatif de la protéine dans chacune des fractions. L'analyse semi-quantitative de 3 expériences indépendantes indique que la densité d'équilibre médiane de la catalase se situe entre 1,18 à 1,20g/ml dans le gradient de densité Nycodenz. Dans un gradient de densité de sucrose appliquée sur les fractions ML du foie de rat, l'activité de la catalase est plus abondante dans les fractions de hautes densités du gradient (Della Valle et al. 2011). Dans la littérature, la plupart des publications consultées sur le fractionnement subcellulaire se focalisent plutôt sur la purification de lysosomes ou protéines lysosomales plutôt que sur d'autres organites subcellulaires. Les fractions M+L+P préparées à partir des cellules microgliales BV-2 *Wt* contrôles ou de cellules BV-2 mutantes (*Acox1*^{-/-} ou *Abcd1/d2*^{-/-}) ont été fractionnées dans un gradient linéaire de densité de saccharose. Il faut noter que le gradient de densité à base de sucrose est moins utilisé aujourd'hui à cause du ratio de pression osmotique/densité qui est élevé et qui peut provoquer un rétrécissement

réversible ou irréversible des organites et ainsi réduire les différences de densité entre certains types d'organites (Castle 2003; 2004). Nos résultats montrent que la densité d'équilibre de la catalase qui se trouvait 1,18 à 1,20g/ml dans le gradient de Nycodenz, est à 1,21 et 1,23g/ml dans un gradient de sucrose. Donc nos observations confirment l'effet de sucrose sur les organites subcellulaires après centrifugation isopycnique. Ce changement de densité provoquée par le sucrose, n'était pas observé seulement pour les peroxysomes mais aussi pour les lysosomes. La médiane de densité de la β -galactosidase (enzyme marqueur de lysosome) dans les fractions de gradient de Nycodenz est de 1,15g/ml, mais dans le gradient de sucrose la médiane de densité est de 1,19 à 1,21g/ml. Ces différences de densité s'appliquent sur la lignée sauvage comme les deux lignées BV-2 mutantes. Ce qui s'est traduit par un déplacement de la distribution de la β -galactosidase et de l' α -glucosidase alcaline vers la région de plus haute densité du gradient. Ces observations sont en accord avec celles rapportées par Hamer et al. suite au fractionnement subcellulaire des fibroblastes humaines par centrifugation isopycnique (Hamer et Jadot 2005). Il faut noter que les faibles décalages repérés dans les médianes de densité de la catalase entre les lignées sauvages et mutantes étaient statistiquement non significatifs. Dans trois études faites par Boonen et al., et Jensen et al., à partir du foie de rat ou de souris, un mélange de fraction M+L a été soumis à une centrifugation isopycnique dans un gradient de sucrose linéaire. Les lysosomes représentés par la β -galactosidase s'équilibraient dans les fractions lourdes du gradient avec une médiane de densité estimée à 1,19 g/mL (Jensen et al. 2007; Boonen et al. 2006; 2014). Dans une étude conduite par Xu et al., sur les fractions (M+L) de cerveaux de souris avec des déficiences lysosomales. Les lysosomes neuronaux se trouvent dans les fractions de faible densité (~1,09–1,13 g/ml). Alors que les mitochondries sédimentent dans les zones de haute densité (~1,15–1,20 g/ml) (S. Xu et al. 2010). La densité d'équilibre des lysosomes est la seule à être affectée mais pas des autres organites cellulaires dans un gradient de sucrose, si on les compare avec les résultats rapportés sur le foie de souris. Les mêmes observations ont été rapportées par (Della Valle et al. 2006) et (Dixit et al. 2011).

Les résultats de nos vérifications par la réalisation du fractionnement par centrifugation différentielle et isopycnique, dans leur ensemble, permettent de croire que l'absence des gènes *Acox1* et *Abcd1* et *Abcd2* dans les cellules microgliales BV-2 n'affecte ni la taille ni la densité des organites cellulaires.

b. L'impact des déficiences peroxysomales sur l'expression des gènes d'inflammation des cellules BV2 microgliales

2. Expression des gènes microgliales

L'absence des gènes qui codent pour des enzymes intervenant dans des voies métaboliques essentielles comme *Acox1*, *Abcd1*, *Abcd2* peuvent constituer un stress pour la cellule, et peuvent affecter l'expression d'autres gènes de différentes voies de signalisation moléculaire. Et pour vérifier cette hypothèse on a réalisé des RTqPCR sur de l'ARNm isolés à partir des cellules microgliales BV2 sauvages et mutantes. Cette vérification a ciblé majoritairement les gènes d'inflammation, ce qui va nous permettre de mieux comprendre les voies de signalisation et les mécanismes moléculaires qui interviennent dans la pathogenèse des maladies liées aux déficiences peroxysomales et qui mènent le plus souvent à des conséquences biologiques délétères, manifestées sous forme d'inflammation. Nous avons également ajouté une nouvelle condition pour tester le comportement des cellules sauvages et mutantes face au stress oxydatif en les traitant pendant 24H avec du LPS (1µg/ml).

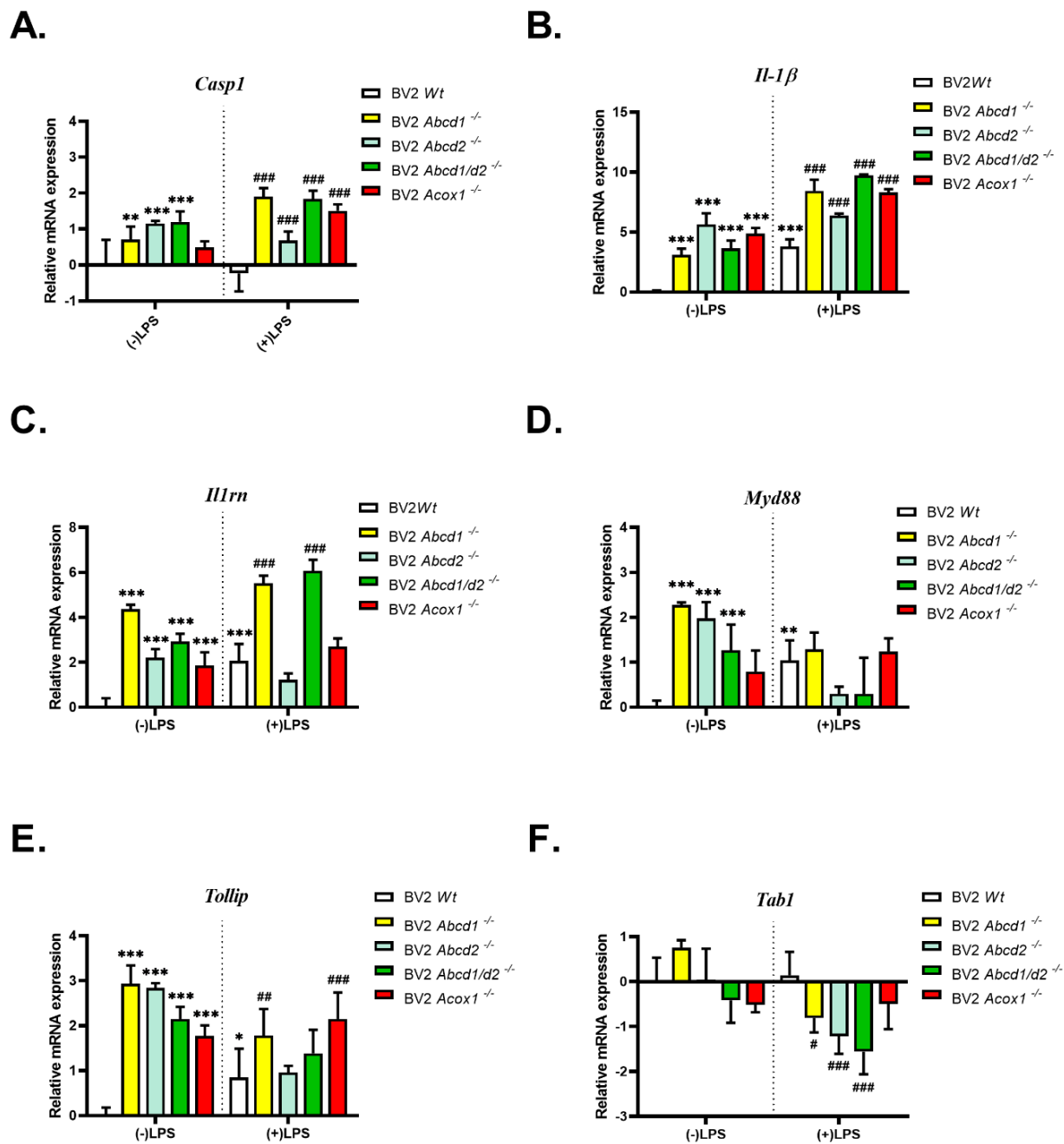


Figure 29: L'impact des déficiences peroxysomales sur l'expression des gènes d'inflammation, *Casp1* (A) *Il-1β* (B), *Il1rn* (C), *Myd88* (D), *Tollip* (E) et *Tab1* (F) des cellules BV2 sauvage WT et mutantes *Abcd1*^{-/-}, *Abcd2*^{-/-}, double mutantes *Abcd1/d2*^{-/-} et *Acox1*^{-/-}. L'ARN a été extrait à partir des cellules BV2

et puis transcrit en ADNc par une transcriptase inverse, puis la quantification du niveau d'expression des gènes a été réalisée grâce à la technique de qPCR. Les graphes présentent la moyenne \pm SD ($n = 3$), la significativité statistique des résultats est déterminée selon la valeur du p (***) $p \leq 0,001$. ** $p \leq 0,01$. * $p \leq 0,05$) comparé au control, (### $p \leq 0,001$. ## $p \leq 0,01$) comparé au control avec traitement LPS seul. Les analyses statistiques étaient réalisées en utilisant le test ANOVA1 et Tukey test.

La **figure 29** montre l'expression des gènes d'inflammation *Casp1*, *Il-1 β* , *Il1rn*, *Myd88*, *Tollip* et *Tab1* des cellules BV2 sauvages *Wt* et mutantes *Abcd1*^{-/-}, *Abcd2*^{-/-}, double mutantes *Abcd1/d2*^{-/-} et *Acox1*^{-/-}. L'expression de la caspase 1 (**Figure 29, A**) est induite significativement chez les cellules mutantes, et cette induction s'accroît après traitement des cellules avec du LPS pendant 24H. L'expression du gène *Il-1 β* (**Figure 29, B**) suit le profil d'expression de la caspase 1, avec une induction importante surtout chez les cellules double mutantes après traitement au LPS, ce qui est aussi le cas en regardant l'expression du gène *Il1rn* (**Figure 29, C**), qui est 2 fois plus exprimé dans les cellules sauvages avec traitement LPS seul. Tandis que pour le gène *Myd88* (**Figure 29, D**), les mutations peroxysomales augmentent significativement son expression en comparant avec les cellules sauvages *Wt*, et le traitement LPS fait diminuer l'expression sauf pour les cellules sauvages, et *Acox1*^{-/-} où le traitement LPS fait augmenter l'expression du gène *Myd88*. Pour le gène *Tollip* (**Figure 29, E**), qui code pour une protéine de liaison à l'ubiquitine qui interagit avec plusieurs composants de la cascade de signalisation du récepteur de type Toll (TLR), la protéine régule la signalisation inflammatoire et est impliquée dans le trafic des récepteurs de l'interleukine-1 et dans le renouvellement de la kinase associée à l'IL1R, est fortement induite chez les cellules BV2 mutantes en comparaison avec les cellules *Wt*, mais cette induction diminue avec le traitement LPS, le taux d'expression devient presque au même niveau que les cellules sauvages et mutantes sauf pour les cellules *Abcd1*^{-/-} et *Acox1*^{-/-} l'expression est significativement plus élevée. En ce qui concerne l'expression du gène *Tab1* (**Figure 29, F**) codant pour une protéine régulatrice de MAP kinase MAP3K7/TAK1, connu par son implication dans différentes voies de signalisation intracellulaires telles que celles induites par TGF- β et interleukine-1, et interagissant également avec la protéine TAK1 kinase, son expression varie selon le type cellulaire. Sans traitement LPS seules les cellules déficientes en *Abcd1* montrent une augmentation non significative d'expression par rapport au *Wt*. Alors que suite au traitement LPS pendant 24H, on voit que toutes les cellules

mutantes sous expriment le gène *Tab1* surtout dans les cellules double déficientes. Le traitement LPS n'affecte pas l'expression génique de *Tab1* des cellules *Acox1*^{-/-}.

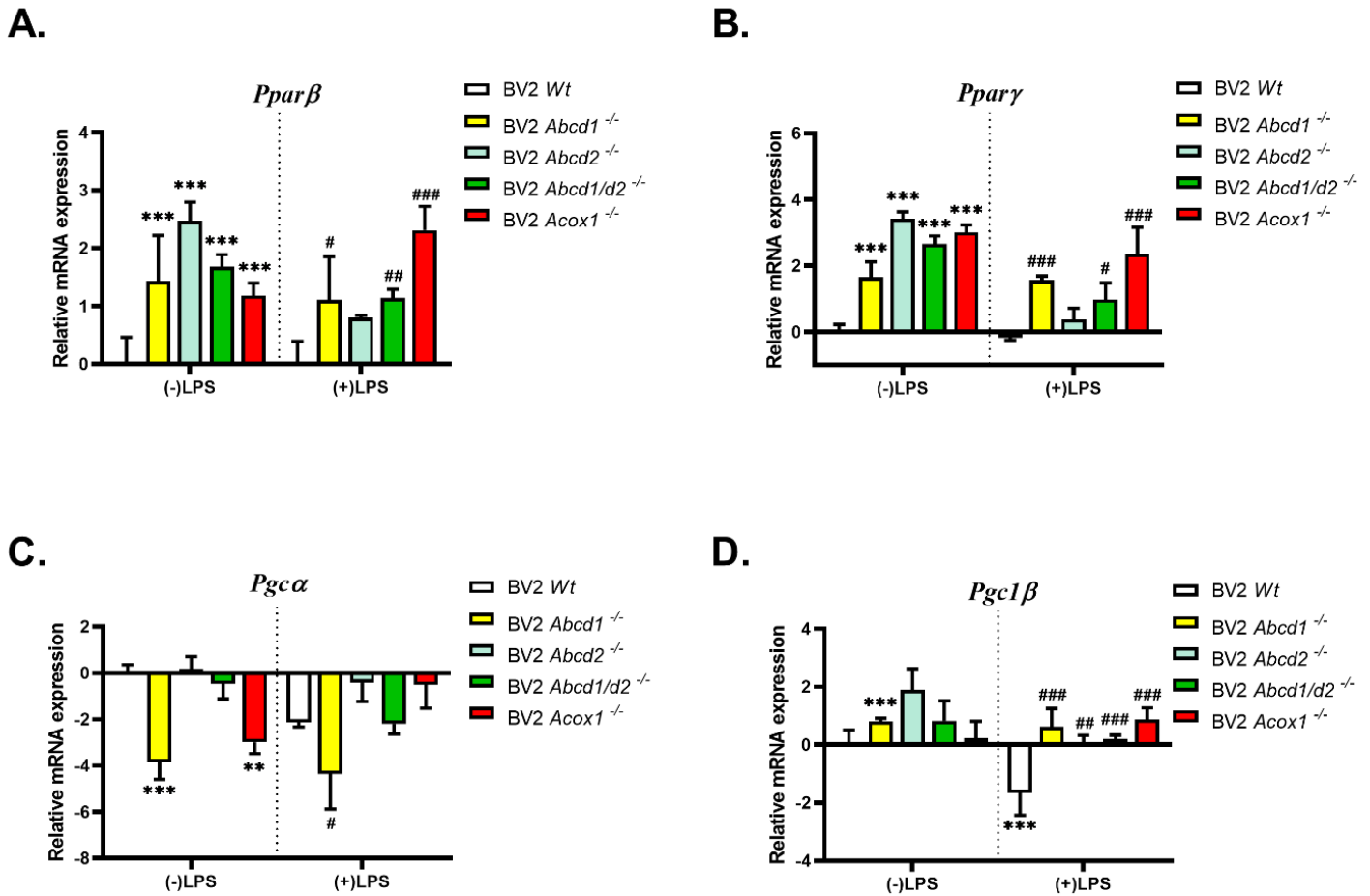


Figure 30: L'impact des mutations au niveau des gènes peroxysomaux sur l'expression des gènes de facteur de transcription, *Pparβ* (A) *Pparγ* (B), *pgc1α*(C), *pgc1β* (D), des cellules BV2 sauvage WT et mutantes *Abcd1*^{-/-}, *Abcd2*^{-/-}, double mutantes *Abcd1/d2*^{-/-} et *Acox1*^{-/-}. L'ARN a été extrait à partir des cellules BV2 et puis transcrit en ADNc par une transcriptase inverse, puis la quantification du niveau d'expression des gènes a été réalisée grâce à la technique de qPCR. Les graphes présentent la moyenne \pm SD (n = 3), la significativité statistique des résultats est déterminée selon la valeur du p (***) $p \leq 0,001$. ** $p \leq 0,01$. * $p \leq 0,05$) comparé au control, (#### $p \leq 0,001$. ## $p \leq 0,01$) comparé au control avec traitement LPS seul. Les analyses statistiques étaient réalisées en utilisant le test ANOVA1 et Tukey test.

L'expression génique des facteurs de transcription a été également investiguée. Le récepteur bêta activé par les proliférateurs de peroxysomes « *Ppar-β* ou *Ppar-delta* » est un régulateur clé de différentes voies métaboliques. Son expression comme montrée sur la (figure 30, A) est induite

significativement chez les cellules mutantes, elle est de 1 à 2 fois plus importante que celle des cellules sauvages *Wt*. Cette élévation est plus remarquable surtout chez les cellules mutantes déficientes en *Acox 1* après traitement LPS, tandis que pour les cellules mutantes *Abcd1*^{-/-} *Abcd2*^{-/-}, et double mutantes *Abcd1/d2*^{-/-}, le traitement LPS réduit l'expression génique du récepteur nucléaire *Ppar-β*, mais l'induction induite par les mutations est toujours préservée. Le même effet de surexpression est observé dans l'expression du gène *Ppar-γ*, connu pour son implication et sa régulation du métabolisme lipidique. Cette élévation d'expression s'atténue avec 24H du traitement LPS (**figure 30, B**).

Le coactivateur gamma-récepteur activé par les proliférateurs de peroxyosomes (PGC)-1alpha fait partie d'une famille de coactivateurs de transcription qui joue un rôle central dans la régulation du métabolisme énergétique cellulaire. PGC-1alpha stimule la biogenèse mitochondriale, et participe à la régulation du métabolisme des glucides et des lipides. L'expression du gène *Pcg-1 alpha* est impactée par les déficiences peroxyosomales. On observe une diminution de son expression génique dans les cellules BV2 déficientes. Un changement de niveau d'expression du *Pcg-1 alpha* s'installe après traitement LPS pour les cellules déficientes en *Acox1*, et devient similaire à celui des cellules *Abcd2*^{-/-} (**figure 30, C**). Le coactivateur-1 bêta (PGC-1 bêta) du récepteur activé par les proliférateurs de peroxyosomes (PPAR-gamma) est un régulateur bien établi de la β-oxydation des acides gras et de la phosphorylation oxydative dans les mitochondries. Contrairement à PCG1-alpha, l'expression de PCG-1beta augmente dans les cellules mutantes avec et sans traitement LPS. Le traitement LPS diminue significativement l'expression du *Pgc1β* des cellules *Wt* (**figure 30, D**). Même pour les autres lignées cellulaires, on observe une légère diminution de *Pgc1β* en comparant les cellules traitées avec celles non traitées, sauf pour les cellules *Acox1*^{-/-}

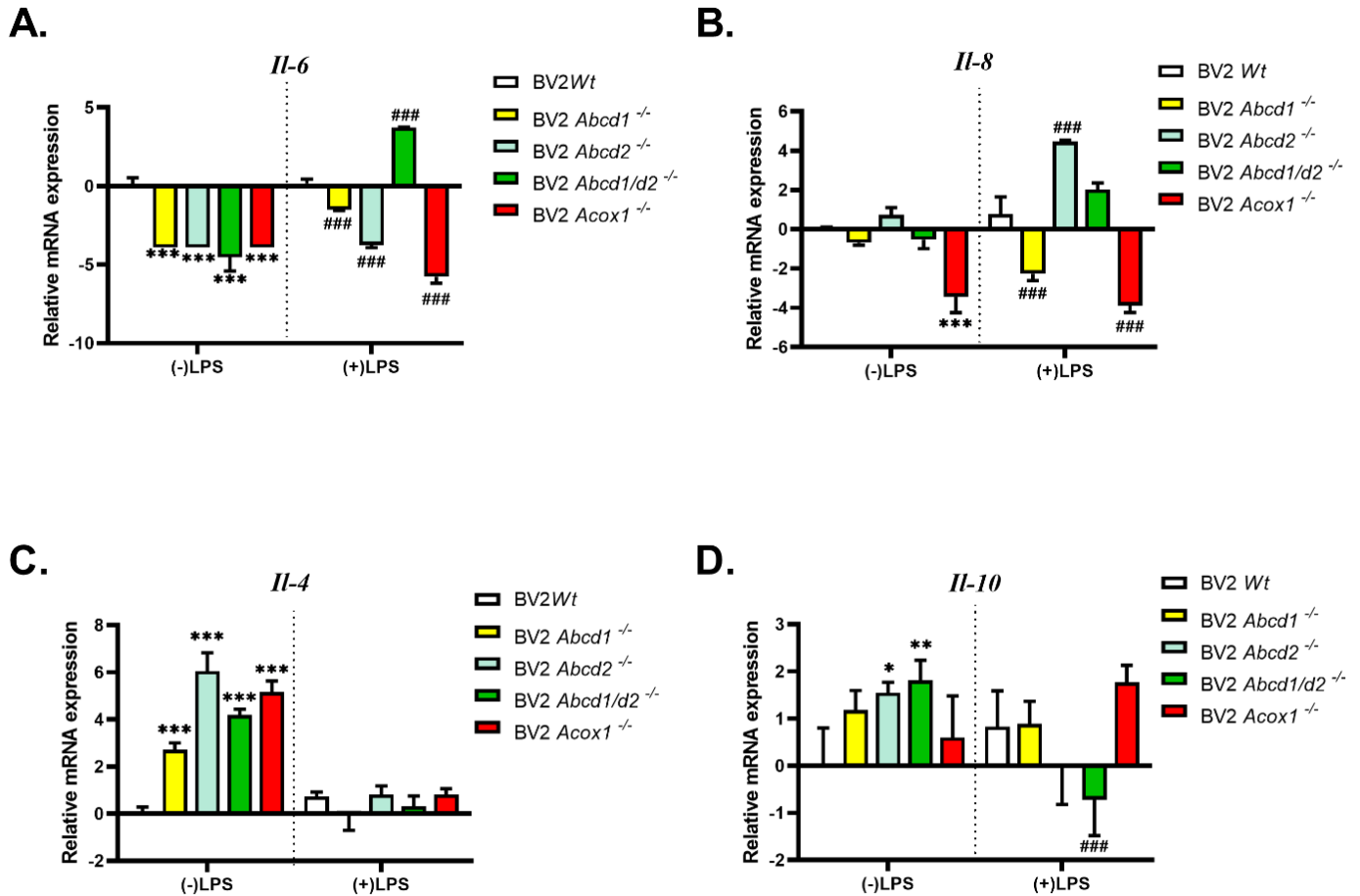


Figure 31: L'impact des mutations au niveau des déficiences peroxysomales sur l'expression des gènes pro inflammatoires, *Il-6*(A) *Il-8* (B), et anti-inflammatoires *Il-4*(C), *Il-10* (D), des cellules BV2 sauvage WT et mutantes *Abcd1*^{-/-}, *Abcd2*^{-/-}, double mutantes *Abcd1/d2*^{-/-} et *Acox1*^{-/-}. L'ARN a été extrait à partir des cellules BV2, ensuite transcrit en ADNc par une transcriptase inverse, puis la quantification du niveau d'expression des gènes a été réalisée grâce à la technique de qPCR. Les graphes présentent la moyenne \pm SD ($n = 3$), la significativité statistique des résultats est déterminée selon la valeur du p (***) $p \leq 0,001$. ** $p \leq 0,01$. * $p \leq 0,05$) comparé au control, (###) $p \leq 0,001$. ## $p \leq 0,01$) comparé au control avec traitement LPS seul. Les analyses statistiques étaient réalisées en utilisant le test ANOVA1 et Tukey test.

Pareillement, l'expression des gènes pro-inflammatoire (*Il-6* et *Il-8*) et anti-inflammatoire (*Il-4* et *Il-10*) des cellules BV2 microgliales a été examinée. Suite à l'analyse des niveaux d'expression par RTqPCR, les résultats ont montré que les deux gènes pro-inflammatoires sont réprimés dans les cellules mutantes avec et sans traitement LPS, sauf pour les cellules doubles mutantes *Abcd1/d2*^{-/-} qui présentent un niveau d'expression significativement supérieur que celui des cellules sauvages. Les cellules *Abcd2*^{-/-} et Wt avec traitement LPS se joignent aux cellules doubles mutantes en ce qui concerne l'expression du gène *Il-8*, on voit une induction de l'expression

génique du gène pro-inflammatoire (**Figure 31, A, B**). Quant aux gènes anti-inflammatoires *Il-4* et *Il-10*, ils s'expriment d'une manière opposée en comparaison avec les gènes pro-inflammatoires. Les mutations au niveau des gènes peroxysomaux activent l'expression des gènes anti-inflammatoires d'*Il-4* et *IL-10*. Par contre le traitement LPS, atténue cette induction chez toutes les cellules mutantes, et le taux d'ARNm d'*Il-4* et *Il-10* devient similaire à celui des cellules sauvages (**Figure 31, C et D**). Encore une fois, les cellules *Acox1*^{-/-} se distinguent par rapport aux autres lignées cellulaires. Contrairement aux autres lignées BV2 mutantes, le traitement LPS a fait augmenter davantage l'expression *Il-10* des cellules *Acox1*^{-/-}

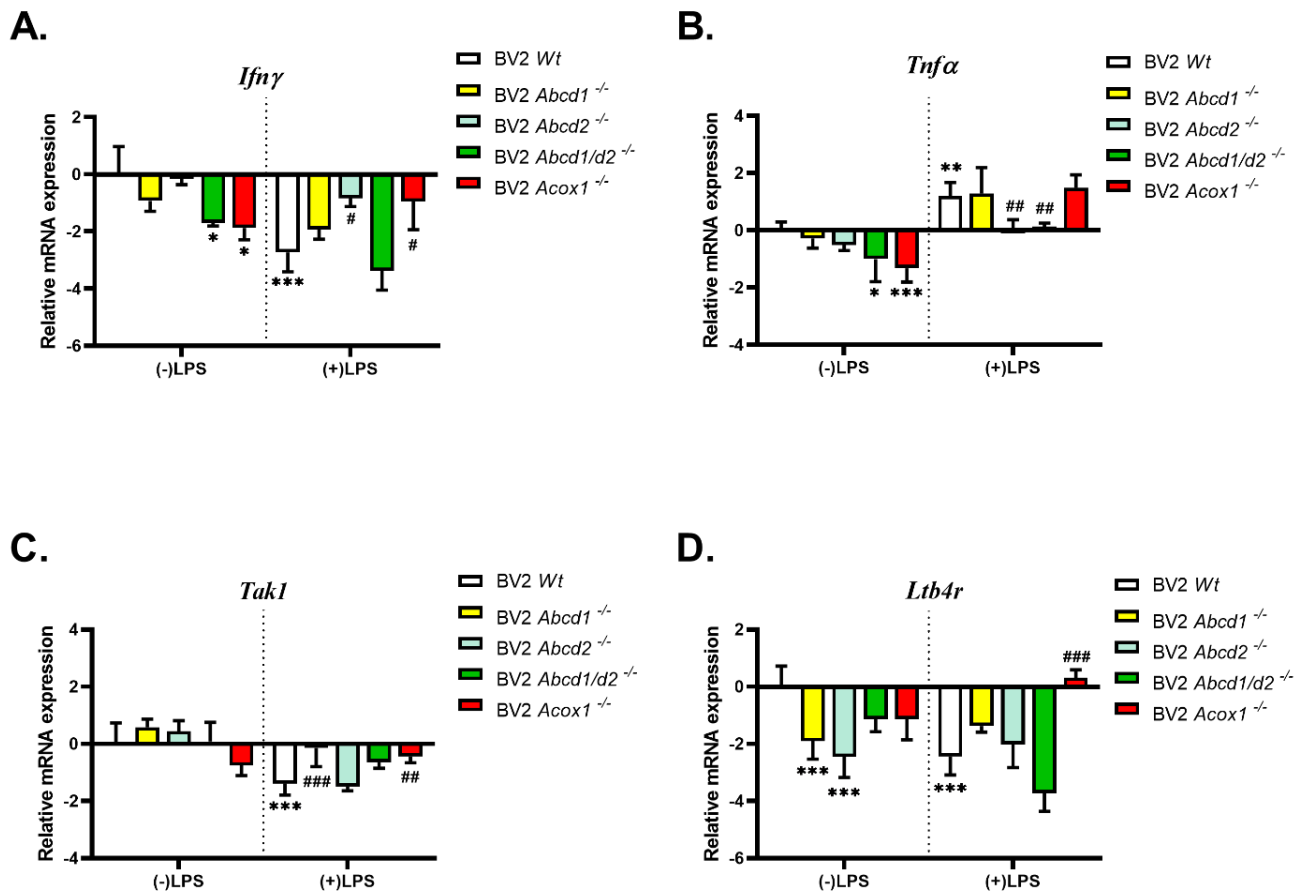


Figure 32: L'impact des mutations au niveau des gènes peroxysomaux sur l'expression des gènes d'inflammation, *Ifny*(A) *Tnfα*(B) *Tak1*(C), *Ltb4R* (D), des cellules BV2 sauvage WT et mutantes *Abcd1*^{-/-}, *Abcd2*^{-/-}, double mutantes *Abcd1/d2*^{-/-} et *Acox1*^{-/-}. L'ARN a été extrait à partir des cellules BV2 et puis transcrit en ADNc par une transcriptase inverse, puis la quantification du niveau d'expression des gènes a été réalisée grâce à la technique de qPCR. Les graphes présentent la moyenne ± SD (n = 3), la significativité statistique des résultats est déterminée selon la valeur du p (***) p ≤ 0,001. ** p ≤ 0.01. * p ≤ 0,05) comparé au control, (### p ≤ 0,001. ## p ≤ 0,01) comparé au control avec traitement LPS seul. Les analyses statistiques étaient réalisées en utilisant le test ANOVA1 et Tukey test

La **figure 32** présente le niveau d'expression d'autres gènes d'inflammation. L'interféron gamma est une cytokine soluble dimérisée qui est le seul membre de la classe des interférons de type II, permet d'activer la réponse immunitaire innée et acquise. Ces protéines sont généralement produites suite à une infection virale. En se fixant sur leurs cellules cibles, ces cytokines déclenchent chez celles-ci diverses réactions permettant la mise en place d'un état de résistance aux virus. Ici dans la **figure 32, A**, on peut remarquer que les déficiences peroxysomales au niveau des cellules BV2 microgliales répriment l'expression de *Ifn gamma*, et cette diminution s'accroît avec le traitement LPS de 24H. Tandis que l'expression du gène *Tnfα* codant pour une cytokine possédant des propriétés pro-inflammatoires et des fonctions d'immuno-régulation diminue chez les cellules mutantes. Mais après traitement LPS, l'effet s'inverse, on remarque une augmentation de l'expression de ces protéines transmembranaires facteurs de nécrose tumorale (**figure 32, B**). Alors que pour le TAK1, qui est un régulateur central de la mort cellulaire, activé par de nombreux ligands exogènes et endogènes, comme le lipopolysaccharide microbien, l'IL-1, le TNFα et le ligand induisant l'apoptose lié au TNF (TRAIL), et permet d'initier la signalisation cellulaire conduisant ainsi à l'activation du NF-κB et des MAPK. Ici, dans le **graphe C de la figure 32**, le gène *Tak1* est induit faiblement dans les cellules mutantes, et est réprimé significativement après le traitement LPS. Le gène *Tak1* s'exprime d'une manière opposée comparant au gène *Tnfα* **figure 32, B** et d'une manière similaire au *Tab1* (**figure 29, F**). Leukotriene B4 Receptor, le gène *Ltb4r*, impliqué dans la réponse inflammatoire et la voie de signalisation des neuropeptides, est un récepteur du leucotriène B4, un puissant chimiotactique impliqué dans l'inflammation et la réponse immunitaire. Son expression comme montré dans la **figure 32 graphe D**, est abaissée par les mutations géniques avec ou sans traitement LPS, sauf pour les cellules mutantes *Acox1^{-/-}*, où le traitement LPS active significativement l'expression du gène *Ltb4r*.

iii. *L'impact des déficiences peroxysomales sur l'expression des gènes de l'inflammation*

Plusieurs études ont démontrés l'implication des mitochondries et des peroxysomes dans la pathogenèse de maladies neurodégénératives telles que les leucodystrophies, mais la séquence des événements moléculaires responsables de l'altération des neurones reste à déterminer (Vishwanath 2016). Parmi les maladies neurodégénératives peroxysomales, certaines sont la conséquence d'un déficit d'un enzyme ou d'un transporteur peroxysomal impliqué chacun dans la β -oxydation des AGTLC (Wanders et al. 2010; Trompier et al. 2014). La neuroinflammation et le stress oxydatif sont deux caractéristiques principales qui accompagnent les maladies neurodégénératives peroxysomales rares comme c'est le cas dans d'autres troubles de la démyélinisation (Singh et Pujol 2010). Ceci a été corroboré par les résultats de Fan et al. chez les souris déficientes en *Acox1* (Fan et al. 1998) et par Ferdinandusse et al., sur des patients déficients en *ACOXI* (OMIM #264470) (Ferdinandusse et al. 2007). De plus, il a été montré que la déficience en *Acox1* dans les oligodendrocytes 158N de souris *Acox1* génère du stress oxydatif (J. Huang et al. 2011; Baarine et al. 2012). Ce stress oxydatif peut activer la microglie conduisant ainsi à la surproduction de molécules pro-inflammatoires (Raas, Gondcaille, et al. 2019; Raas, Saih, et al. 2019). L'absence de l'expression des gènes *Abcd1* ou *Abcd2* ; ou les expressions des deux gènes *Abcd1/d2* en même temps, ou encore de l'expression de gène *Acox1*, provoque chacune une dérégulation de la β -oxydation peroxysomale responsable de la dégradation des acides gras, conduisant à une accumulation de AGTLC dans le plasma et les tissus. La comparaison des cellules doubles mutantes *Abcd1/d2*^{-/-} avec les deux lignées cellulaires portant chacune une simple mutation (*Abcd1*^{-/-} ou *Abcd2*^{-/-}) donne l'opportunité de mieux comprendre les rôles spécifiques de ces transporteurs peroxysomaux ABCD (ABCD1 et ABCD2) et les conséquences de leurs déficits dans les cellules microgliales.

L'étude menée par Raas et al., sur la caractérisation préliminaire de l'impact des déficiences peroxysomales dans les cellules microgliales a montré que l'expression du gène *Trem2* (triggering receptor expressed on myeloid cells 2) est affectée. Ceci serait à l'origine du changement profond dans les fonctions microgliales liées à l'inflammation et à la phagocytose (Raas, Gondcaille, et al. 2019). De plus, le travail publié par Chung et al. rapporte que l'absence du gène *dACOXI* chez la

drosophile cause une réduction de longévité, une perte de la vision, une altération de la transmission synaptique et une perte des cellules gliales et axonales (H.-L. Chung et al. 2020). Nos analyses des ARNm extraits à partir des cellules microgliales sauvages et mutantes, montrent que les déficiences peroxysomales affectent considérablement l'expression des gènes de l'inflammation. Le taux d'induction des ARNm des gènes pro-inflammatoires dans les cellules microgliales varie en fonction du gène peroxysomal muté et également si les cellules ont été traitées ou non avec du LPS. Ce qui signifie que les cellules microgliales mutantes peuvent activer des réseaux de signalisation différents ou convergents pour déclencher le processus inflammatoire.

En absence de tout stimulus, nous avons constaté que les niveaux d'expression des gènes codant pour les cytokines pro-inflammatoires (IL-1 β et IL-6) sont modifiées dans les cellules déficientes en *Acox1*. L'induction d'IL-1 β et d'IL-6 après un traitement LPS des cellules microgliales a été précédemment signalé par Qin et al. (Y. Qin et al. 2016). Par rapport aux cellules sauvages, les cellules mutantes *Acox1*^{-/-} surexpriment le gène *Il-1 β* et répriment l'expression du gène *Il-6*. Le même résultat a été décrit par Raas et al., pour les cellules déficientes en *Acox1*^{-/-} (Raas, Saih, et al. 2019). Les fibroblastes prélevés à partir des patients déficient en ACOX1 (P-NALD) montrent une altération de l'expression de la voie de signalisation IL-1 accompagnée d'une sécrétion excessive des cytokines IL-6 et IL-8 (El Hajj et al. 2012). Contrairement aux fibroblastes P-NALD, nos expériences réalisées sur les cellules microgliales déficientes en *Acox1* montrent une diminution de taux d'expression génique d'*Il-6* et *Il-8*, et même à la suite du traitement LPS. De plus, l'article publié par El Hajj et al., démontre que l'absence de l'activité ACOX1 active l'expression des gènes *Il-1 α* , *Il-1 β* , *Il-1r1*, *Il-1rn*, *Il-17c*, et de Toll-interacting protein (*Tollip*) (El Hajj et al. 2012). Ces données sont en accord avec nos résultats obtenus avec les cellules microgliales déficientes en *Acox1*^{-/-}. L'activation de la voie inflammatoire IL-1 est déclenchée par la liaison de l'hétérodimère IL-1 α /IL-1 β à l'IL-1R1 (Allan et Rothwell 2001). La cytokine pro-inflammatoire IL-1 contrôle l'expression d'autres gènes inflammatoires comme le *Tnf- α* et l'interféron (*Ifn*) par une voie de signalisation de transduction bien établie (C. A. Dinarello 1994). D'après la littérature, IL1RN est un récepteur antagoniste d'IL-1 qui permet de moduler la réponse inflammatoire (Allan et Rothwell 2001). Nos expériences montrent que le récepteur antagoniste d'IL-1 est induit dans les cellules mutantes. Avec le traitement LPS, *Il1rn* est surexprimé particulièrement dans les cellules sauvages et mutantes *Abcd1*^{-/-}, *Abcd1/d2*^{-/-} et *Acox1*^{-/-}. Cette surexpression d'*Il1rn* serait une réponse des cellules microgliales activées afin de moduler

l'inflammation induite suite aux mutations et/ou après traitement LPS pour maintenir une homéostasie immunitaire (Allan et Rothwell 2001). L'induction de *Tollip*, constitue également un élément important dans la voie de signalisation IL-1R (Burns et al. 2000) qui peut limiter la production des cytokines pro-inflammatoires (G. Zhang et Ghosh 2002) en contrôlant l'expression de IL-6 et du TNF- α en réponse au IL-1 β (Didierlaurent et al. 2006). Cette observation est corroborée par nos résultats qui montrent l'augmentation de l'expression du gène *Tollip* accompagné par une répression des gènes *Tnf- α* et *Il-6* dans les cellules microgliales mutantes. De plus, l'analyse de l'expression des gènes anti-inflammatoires a montré que les gènes *Il-4* et *Il-10* sont surexprimés dans les cellules mutantes en comparaison avec les cellules sauvages. Mais le traitement LPS abroge cette induction surtout pour les cellules déficientes *Abcd1*^{-/-} et les cellules double déficientes *Abcd1/d2*^{-/-}.

Une étude établie par Dai et al., a montré que l'activation des cellules microgliales BV-2 avec du LPS déclenche une réaction inflammatoire *in vitro* par la voie de signalisation Toll-like receptor 4 (TLR4)/adapter protein myeloid differentiation factor 88 (MyD88)/nuclear factor- κ B (NF- κ B) provoquant ainsi une induction de l'apoptose des cellules surrénaliennes PC12 (Dai et al. 2015). Le récepteur de type Toll (TLR) 4 est le plus largement étudié de tous les TLRs dans la réponse aux LPS (Poltorak et al. 1998; Shimazu et al. 1999). TLR est un récepteur membranaire qui permet la reconnaissance de la plupart des bactéries gram négatif (Akira et al. 2006). L'expression des gènes TLR4, MyD88, et NF- κ B est augmentée significativement, induisant par conséquence l'expression du gène IL-1 β . Nos résultats ont montré que le taux d'expression des gènes *Myd88*, *Casp1* et *Il-1 β* est élevée dans les cellules microgliales mutantes avec ou sans traitement LPS. Plusieurs études ont montré que la stimulation des cellules microgliales par le LPS, active l'expression de TLR4 et MyD88. Ceci entraîne la dégradation et la phosphorylation de protéines inhibitrice κ B (I κ B) qui empêche la translocation du facteur de transcription NF- κ B. Ce dernier est réputé contrôler l'expression de cytokines pro-inflammatoires, tels que l'IL-1 β , l'IL-6, le TNF- α , l'IL-12 et l'interféron β) (Aravalli et al. 2007; Lehnardt et al. 2002). Les maladies neurodégénératives sont toujours accompagnées de l'augmentation du taux de la cytokine IL-1 β , qui stimulerait davantage l'inflammation et l'apoptose au niveau du système nerveux central (Dai et al. 2015). Nous avons remarqué que par rapport aux cellules sauvages *Wt*, le taux d'ARNm *Il-*

I β s'accroît notablement dans les cellules microgliales BV2 mutantes, et ce taux d'induction augmente davantage dans les cellules déficientes traitées aux LPS.

Les cytokines pro-inflammatoires inhibent la croissance et la dissémination bactérienne, mais leur surproduction peut causer un choc endotoxique, connu sous le nom de septicémie (Y. Qin et al. 2016). Il a été démontré que la septicémie induite par l'injection périphérique du LPS active les cellules microgliales dans le cerveau de rat (Buttini et al. 1996; Nimmerjahn et al. 2005). La microglie activée sécrète de nombreuses chimiokines et cytokines qui exercent des effets neuroprotecteurs ou neurotoxiques. La microglie peut adopter deux phénotypes distincts (Mills et al. 2000). Le phénotype M1 qui est caractérisé par la sécrétion des cytokines Th1 et une production massive des médiateurs pro-inflammatoires. Alors que le phénotype M2 implique l'expression des molécules Th2 anti-inflammatoire comme IL-4 et IL-10 (Lacy-Hulbert et Moore 2006). Donc les cellules microgliales peuvent agir en réponse aux cytokines Th1 ou Th2 en empruntant deux voies distinctes : la voie IFN γ /TNF α ou la voie IL-4/IL13 (Durafour et al. 2012). Le travail publié par Qin et al., suggère l'existence d'une tolérance aux endotoxines quand les cellules microgliales sont préconditionnées avec du LPS. Elles peuvent ainsi développer un mécanisme de défense neuroprotecteur qui permet d'atténuer les réponses pro-inflammatoire (Y. Qin et al. 2016). Nous avons observé que le processus anti-inflammatoire est activé dans nos modèles de cellules microgliales présentant un déficit peroxysomal. Toutes les cellules mutantes révèlent une diminution de l'expression des cytokines pro-inflammatoires *Il-6* et *Il-8*, sauf les cellules doubles déficientes *Abcd1/d2^{-/-}*. Quant à l'expression génique d'*Il-4* et d'*Il-10*, impliqués dans le processus anti-inflammatoire, est augmentée, alors qu'elle est diminuée après traitement au LPS et ceci dans toutes les cellules mutantes, contrairement aux cellules sauvages. L'augmentation des cytokines anti-inflammatoires nous laisse penser que les cellules microgliales mutantes adoptent un phénotype M2, qui peut être décrit comme une tolérance aux mutations géniques comparée à la tolérance aux endotoxines décrite par Qin et al., suite aux traitements répétés et successifs aux LPS (10ng/ml puis avec 100ng/ml) des cellules microgliales (Y. Qin et al. 2016). De façon intéressante, il est important de souligner que l'augmentation d'expression de gènes codant pour des protéines participant à la voie de signalisation pro-inflammatoire IL-1 (*Myd88*, *Tab1*, *Tak1*) dans les cellules mutantes s'atténue après traitement de ces cellules par le LPS pendant 24H. Alors que l'expression des gènes *Il-1 β* , *Casp1* et *Tnf- α* reste élevée avec le traitement LPS. Le complexe composé par le

TGF β -activated kinase 1 (TAK1) et ses protéines de liaisons, TAB1, TAB2 et TAB3, sont également recrutées au TRAF6 (TNFR-associated factor 6) (C. Wang et al. 2001). TAK1 phosphoryle l'IKK- β et la MAP kinase kinase 6 (MKK6), permettant ainsi l'activation de NF κ B et les MAP kinases, puis une induction de l'expression des gènes impliqués dans la réponse inflammatoire.

Par ailleurs, l'activation aiguë ou chronique de la microglie entraîne la libération des molécules potentiellement cytotoxiques comme les cytokines pro-inflammatoires, les espèces réactives d'oxygène, le NO et des molécules chimiotactiques comme le leucotriène B4 (LTB4) (Hughes 2012; Surace et al. 2012; Trang et al. 2012). Curieusement, le LTB4 est également un agoniste physiologique important de PPAR α . L'activation de PPAR α diminue la sécrétion de LTB4 et stimule sa dégradation par la β -oxydation peroxysomale. Le LTB4 joue un grand rôle dans la régulation de l'inflammation via sa double capacité d'exercer des effets pro-inflammatoires via son récepteur BLT2 (LTB4R) et des effets anti-inflammatoires via PPAR α (Narala et al. 2010). Nos résultats montrent que le traitement LPS abaisse l'expression de *Ifn- γ* et de *Ltb4r* dans les cellules mutantes et sauvages. Ajouter à cela, que les récepteurs nucléaires sont aussi affectés par les déficiences des gènes mutés de la β -oxydation peroxysomale, et par le traitement LPS dans les cellules microgliales. En effet, nos résultats montrent que les expressions de gènes *Ppar β* et *Ppar γ* sont significativement induites dans toutes les cellules mutantes par rapport aux cellules sauvages. Parallèlement, Fan et al., ont observé dans le foie de souris déficientes en *Acox1* une activation soutenue des voies de signalisation PPAR α (Fan et al. 1996; 1998). Cette activation des récepteurs nucléaires peut être expliquée par l'accumulation des AGTLC, à la fois substrats d'ACOX1 et activateurs des PPARs dans les cellules microgliales (J. Huang et al. 2012). Les PPARs, comme d'autres récepteurs nucléaires, jouent le rôle de facteurs de transcription pour réguler l'expression génique suite à leurs activations par des ligands naturels ou synthétiques (Schoonjans et al. 1997). Le PPAR γ murin est capable d'activer le promoteur du gène de l'enzyme bifonctionnelle, qui code pour la deuxième enzyme du système de la β -oxydation peroxysomale (Y. Zhu et al. 1993). Dans le foie de souris déficientes en *Acox1*, la suppression de PPAR α s'accompagne d'une surexpression de PPAR γ , contribuant vraisemblablement à la stéatose hépatique développée chez souris *Acox1*^{-/-}. Or, PPAR γ a été décrit comme un régulateur essentiel de l'adipogenèse. Ceci suggère que l'accumulation excessive des AGTLC, principalement insaturés, entraînerait une

saturation ligand-dépendante du PPAR α et en même temps une activation des autres isoformes de PPARs, PPAR γ et PPAR β . Les AGTLC n'activent pas seulement les PPARs mais aussi les récepteurs TLRs (Shimizu 2009; Bensinger et al. 2008; Kawai et al. 2010). Ceci pourrait expliquer l'exacerbation de la réponse inflammatoire dans les cellules mutantes traitées pendant 24H aux LPS (1 μ g/ml). Le traitement LPS a diminué légèrement l'expression des gènes *Ppar β* et *Ppar γ* dans les cellules mutantes *Abcd1^{-/-}* et *Abcd1/d2^{-/-}*, alors que remarquablement un effet inverse est observé dans les cellules déficientes en *Acox1^{-/-}*. Il faut également noter que le traitement LPS n'a pas d'effet sur l'expression des PPARs dans les cellules sauvages. Cependant, les expressions des coactivateurs *Pgc1- α* et *Pgc1- β* diminuent avec le traitement LPS chez les cellules sauvages. PPAR β est capable d'inhiber l'activation de NF κ B et induire l'expression des médiateurs anti-inflammatoires tel que le TGF- β (Bishop-Bailey et Bystrom 2009). De plus, PPAR γ permet d'inhiber les activités transcriptionnelles de NF κ B, de réduire la production des molécules pro-inflammatoires, et d'induire l'expression des médiateurs anti-inflammatoires (W. Huang et al. 2010; J. H. Chung et al. 2008; Zolezzi et al. 2017). Dans des conditions de culture en présence des LPS, les macrophages *Ppar γ ^{-/-}* montrent une augmentation importante des taux d'expression des cytokines pro-inflammatoires *Il-6*, *Il-12*, *Il-1 β* et *Tnf- α* (Heming et al. 2018). L'activation de PPAR α et PPAR β / δ inhibe l'expression de TNF- α induit par LPS dans les cardiomyocytes de rat nouveau-nés (Takano et al. 2000). Une autre observation rapportée par Zhu et al., démontre que l'inflammation induite par les LPS, et activant la voie NF κ B, est inhibée dans les cellules RAW264.7 suite à l'activation de PPAR γ (T. Zhu et al. 2016). Plusieurs études ont démontré qu'il existe une voie de signalisation qui permet l'interaction entre le PPAR γ et IL-10 (A. E. Ferreira et al. 2014). Nos résultats montrent que l'induction de l'expression de PPAR γ s'accompagne d'une augmentation de l'expression du gène anti-inflammatoire *Il-10*. Le traitement LPS, atténue l'induction de l'expression de *Ppar γ* et *Il-10*. La voie de signalisation PPAR γ /IL-10 bloque Myd88 ce qui par conséquent inhibe la signalisation TLR (M.-J. Choi et al. 2017). Une étude réalisée dans les monocytes humains par Dasu et al., a montré que l'expression de TLR2 et TLR4 induites par Pam- (Pam3CSK4, est un lipopeptide synthétique tri acylé (LP) imite l'extrémité amino-terminale acylée des LP bactériennes) et le LPS est inhibée par la pioglitazone, un agoniste de PPAR γ (Dasu et al. 2009). De plus, les ligands de PPAR γ protègent contre la neurotoxicité, en augmentant l'expression de *Pgc1- α* et en modulant la dynamique des mitochondries dans les neurones (Christofides et al. 2021). Une autre étude conduite chez le rat par Liu et al., a montré que

l'activation de *Pgc1- α* protège, en inhibant le processus pro-inflammatoire, contre une lésion aigüe de poumon induite par les LPS (W. Liu et al. 2021). Le traitement de souris avec du TNF- α et de l'IL-1 ou avec du LPS permet de diminuer le taux des ARNm de RXR α , PPAR α , PPAR γ , LXR α , et PGC1- α , PGC1- β dans le foie, ce qui contribue aux altérations dans le métabolisme lipidique hépatique durant la phase inflammatoire aigüe médiée par les cytokines pro-inflammatoires (M. S. Kim et al. 2007). Pareillement, dans les cellules microgliales le traitement aux LPS diminue l'expression de PPAR γ ainsi que le taux d'ARNm des coactivateurs *Pgc1- α* , et *Pgc1- β* .

L'ensemble de ses résultats renforce l'idée que la perturbation du métabolisme des acides gras, en l'occurrence dans le peroxyosome, se traduit par une activation du processus inflammatoire et finalement par une dérégulation de l'homéostasie des cellules microgliales qui serait à l'origine de la neuroinflammation.

c. **Conséquence des déficiences peroxysonales sur l'expression des hydrolases lysosomales**

3. Expression protéique

3.1. Dans les lysats cellulaires

Les réponses immunitaires des cellules microgliales sont très importantes pour assurer l'intégrité des cellules du système nerveux central. La régulation des fonctions des cellules BV-2 peut être assurée par différentes cathepsines dont la plupart sont localisées au niveau du lysosomes. Récemment, au laboratoire à Dijon, une analyse transcriptomique a été réalisée par RNA-seq sur les lignées cellulaires sauvages et mutantes. L'analyse des données a montré que l'expression des ARNm issus de nombreux gènes et participant à la phagocytose ou contrôlant la réponse inflammatoire a été affectée. Ces résultats (non encore publiés) indiquent qu'un certain nombre d'ARNm codant pour des protéines lysosomales, à l'exemple de la Cathepsine B, la Cathepsine D, la Cathepsine K, Lamp2 et le lysozyme sont surexprimés. Nous avons donc cherché à analyser ces résultats par d'autres approches au niveau post traductionnel et l'expression de ces protéines comme reporté ci-après dans les figures **33**, **34** et **35**. Nous avons donc décidé d'établir des expériences d'immunoblotting afin de détecter les protéines lysosomales dans les lysats cellulaires et le milieu de culture des cellules BV-2.

De nombreuses études visent à prouver et chercher l'implication des lysosomes dans l'activation des microglies et dans la réponse inflammatoire. Les cellules immunitaires microgliales contiennent deux formes principales de CathB et CATHK détectées par Western blot la forme à ~43-45kDa la forme précurseur glycosylée et la forme mature à ~28-38 kDa produite par le clivage protéolytique. Les cathepsines sont produites sous une forme immature « pro-cathepsine » et pour devenir matures et actives elles subissent une activation protéolytique pour devenir des protéines fonctionnelles dans le système lysosomal et endosomal. Différentes cathepsines sont soit intracellulaires localisées dans les lysosomes soit extracellulaire. Les hydrolases lysosomales secrétées par la cellule. Elles sont également exprimées différemment par la microglie en réponse aux différents stimuli pro-inflammatoire. Après analyse par western blot des lysats cellulaires et des milieux de culture des trois lignées cellulaires, nos résultats montrent que le taux d'expression de la cystéine protéase CATHB lysosomale est élevé chez les cellules déficientes en *Abcd1*, *Abcd2*, double mutante *Abcd1/d2* et en *Acox1* comparées aux cellules sauvages *Wt*. Nous avons évalué également l'expression de LAMP2, une protéine localisée au niveau de la membrane lysosomale. L'analyse par western blot révèle une faible induction de l'expression de LAMP2 dans les cellules déficientes en *Abcd1*, mais pas dans les cellules déficientes en *Abcd2*, double mutante *Abcd1/d2* et en *Acox1*. L'analyse transcriptomique indique également une augmentation des ARNm codant pour LAMP2, aussi bien dans les BV-2 *Acox1*^{-/-} que dans les BV-2 *Abcd1d2*^{-/-}. La forme pro est traitée pendant le transport à travers les endosomes, sur son chemin vers les lysosomes où la forme mature s'accumule.

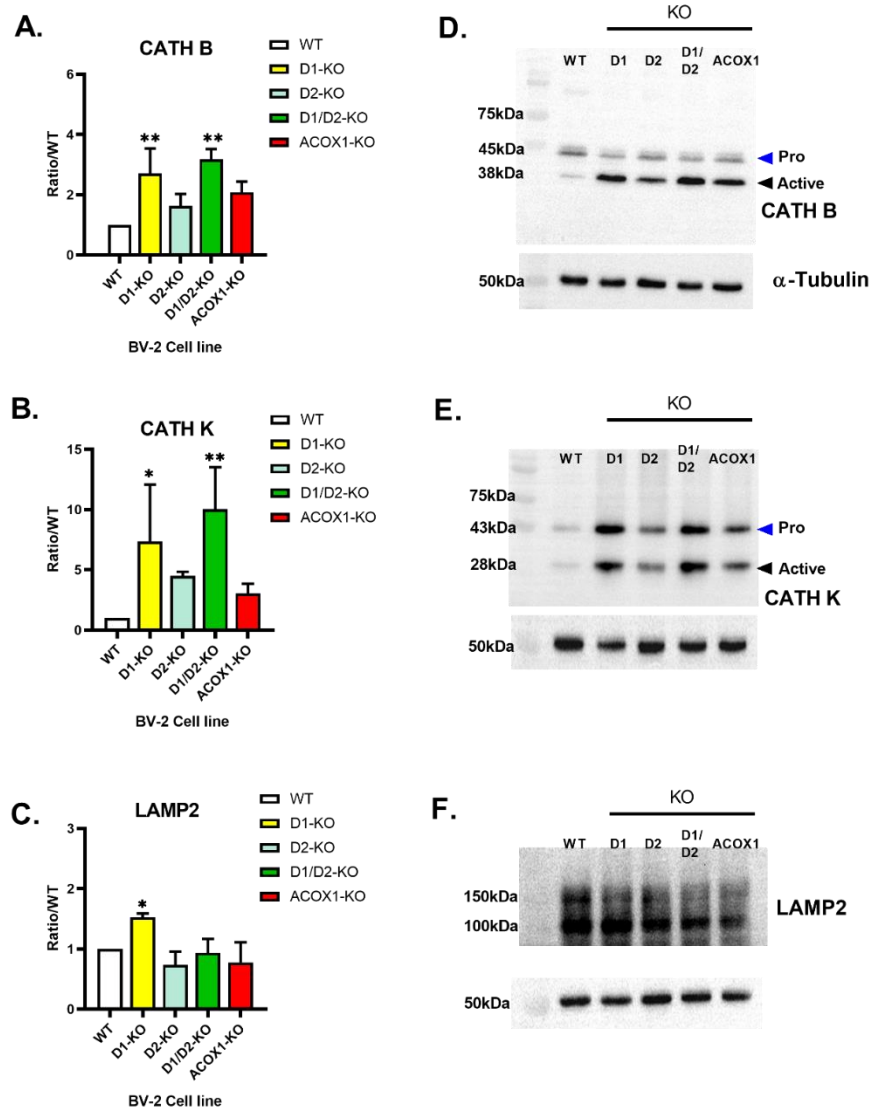


Figure 33: L'analyse de l'expression protéique de la CATHB (38kDa), CATHK (28kDa) et LAMP2 (110kDa) par western blot des cellules BV-2 (WT, *Abcd1*^{-/-}, *Abcd2*^{-/-}, *Abcd1d2*^{-/-} et *Acox1*^{-/-}). Trente µg de protéines d'extrait cellulaire ont été séparées sur un gel d'électrophorèse SDS PAGE de 12%, ou 10% puis transférées sur une membrane PVDF et analysée par immunoblotting avec l'anticorps anti CathB (A, D), anti CathK (B, E) et anti-Lamp2 (C, F). Analyse densimétrique de l'immunoblot pour comparer l'intensité du signal obtenu au niveau des bandes. Les graphes présentent la moyenne ± SD (n = 3), la significativité statistique des résultats est déterminée selon la valeur du p (*** p ≤ 0,001. ** p ≤ 0.01. * p ≤ 0,05) comparé au control, (#### p ≤ 0,001. ## p ≤ 0,01) comparé au control avec traitement LPS seul. Les analyses statistiques étaient réalisées en utilisant le test ANOVA1 et Tukey test. Les pointes de flèche bleue et noires désignent les formes de protéine précurseur et mature respectivement.

Les lysosomes sont des organites à membrane unique, considérées comme sites de recyclage dans les cellules eucaryotes. Ils sont équipés d'hydrolases acides et dégradent les macromolécules vieilles ou endommagées et les organites séquestrés ou internalisés par

autophagie, endocytose et phagocytose. Les blocs de macromolécules (acides aminés, sucres, nucléosides, etc.) libérés par ces hydrolases sont ensuite exportés vers le cytosol par des transporteurs lysosomaux pour être réutilisés dans le métabolisme cellulaire. En plus de ce rôle catabolique bien connu, les lysosomes sont impliqués dans d'autres fonctions cellulaires, telles que la mort cellulaire, réparation de la membrane cellulaire et le rétablissement de l'homéostasie cellulaire.

Les précurseurs de la cathepsine subissent un traitement protéolytique et une maturation dans les lysosomes, les protéases sont présentes sous deux formes dans la cellule, précurseur (Pro) et mature (Active). Dans **la figure 33 (D, E)**, on voit clairement l'induction de l'expression protéique des protéases lysosomales CATHB et CATHK dans les cellules mutantes. Ces différences se voient dans les deux formes mature et précurseur de l'enzyme lysosomale CATHK. En ce qui concerne, la protéine membranaire LAMP2, les résultats ne montrent pas de différences significatives dans l'expression protéique en comparaison avec les cellules sauvages Wt, à l'exception des cellules déficientes en *Abcd1* qui présentent une légère élévation, mais statistiquement significative (**Figure 33, C, F**). Les cathepsines B et K s'expriment pareillement dans les cellules mutantes en particulier la forme active.

En plus, notre étude a visé aussi l'exploration de l'expression des protéines lysosomales dans des conditions de stress cellulaire de microglies par traitement des cellules BV2 sauvages et mutantes avec du LPS pendant 24H. De l'immunoblotting a été réalisé sur 30µg d'extrait protéique pour détecter les protéases lysosomales. **La figure 34** montre l'expression protéique des trois protéines lysosomales CATHB, CATHK, et LAMP2, l'induction dans les cellules mutantes est presque au même niveau avec ou sans traitement LPS. (**Figure 34**). L'expression de la protéine LAMP2 est légèrement modifiée par le traitement LPS, mais non significative.

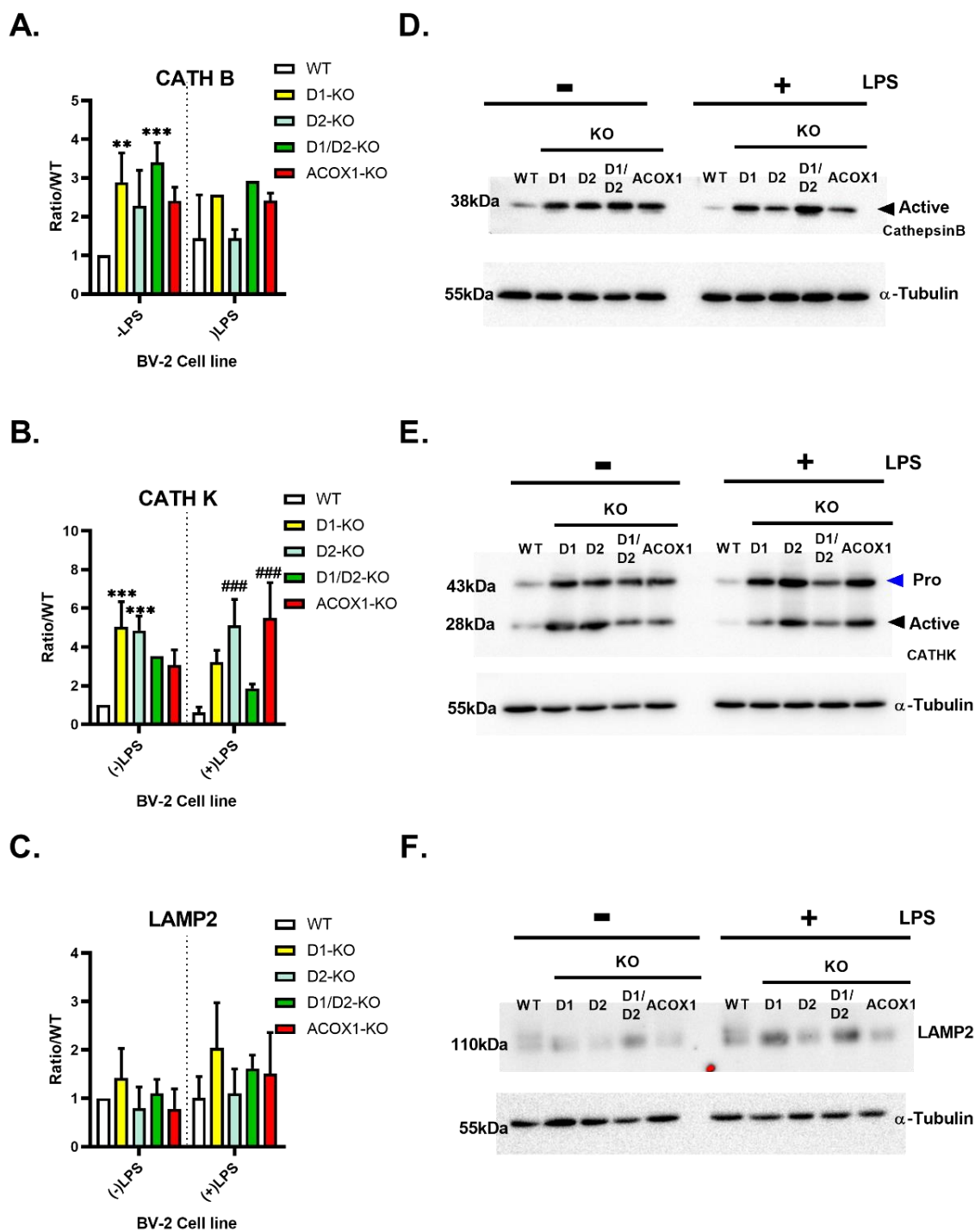


Figure 34 L'analyse de l'expression protéique de la CATHB (38kDa), CATHK (28kDa) et LAMP2 (110kDa) par western blot des cellules BV-2 (WT, Abcd1-/-, Abcd2-/-, Abcd1d2-/- et Acox1-/-). Trente µg d'extrait de protéines stimulées avec du LPS (1µg/ml) pendant 24h, séparées sur un gel d'électrophorèse SDS PAGE de 12%, ou 10% puis transférées sur une membrane PVDF et analysée par immunoblotting avec l'anticorps anti CathB (A, D), anti CathK (B, E) et anti-Lamp2(C, F). Analyse densimétrique de l'immunoblot pour comparer l'intensité du signal obtenu au niveau des bandes. Les

graphes présentent la moyenne \pm SD ($n = 3$), la significativité statistique des résultats est déterminée selon la valeur du p ($*** p \leq 0,001$. $** p \leq 0,01$. $* p \leq 0,05$) comparé au control, ($### p \leq 0,001$. $## p \leq 0,01$) comparé au control avec traitement LPS seul. Les analyses statistiques étaient réalisées en utilisant le test ANOVA1 et Tukey test. Les pointes de flèche bleue et noires désignent les formes de protéine précurseur et mature respectivement.

La cathepsine B est surexprimée dans les cellules mutantes et après traitement LPS de 24H (**Figure 34, A, D**). Ainsi que pour l'expression de la Cathepsine K dans les cellules mutantes, la protéine est surexprimée considérablement par rapport aux cellules sauvages *Wt*. Le traitement LPS, active significativement l'expression de la cathepsine K des cellules *Abcd2^{-/-}* et les cellules *Acox1^{-/-}* par rapport aux cellules contrôle ayant reçu un traitement LPS (**Figure 34, B, E**). Le niveau d'expression protéique de la protéine LAMP2 représenté dans le graphe C, ne montre pas de changements notables en comparant les lignées cellulaires entre elles. Mais avec un traitement LPS, les cellules mutantes modifient légèrement l'expression de LAMP2 cellulaire qui se traduit par une faible élévation affectant les 4 lignées cellulaires déficientes (**Figure 34, C, F**).

3.2. Dans le milieu de culture

Les protéines cellulaires ne sont pas seulement présentes dans la cellule mais aussi dans le milieu extracellulaire. Les protéases lysosomales telles que les cathepsines, sont secrétées par les cellules afin d'assurer les échanges intercellulaires et pour réguler différentes voies de signalisation comme l'inflammation. Ici, l'extrait protéique de milieu de culture a été séparé sous un champ électrique, et puis transféré sur une membrane PVDF afin de détecter les bandes correspondantes aux cathepsine K.

La **figure 35** présente le résultat de sécrétion de la forme précurseur de Cathepsine K dans le milieu de culture cellulaire qui est de 28kDa. On remarque que les déficiences peroxysomales n'augmentent pas seulement l'expression génique et protéique de la protéase lysosomale mais aussi sa sécrétion dans le milieu extracellulaire. De plus, le traitement LPS pendant 24H des cellules BV2 microgliales exacerbe remarquablement le taux de sécrétion de la forme Pro-CathK dans le milieu de culture cellulaire. La forme mature de CATHK était non détectable dans l'ensemble des western blots réalisées sur les extraits protéiques de milieu de culture.

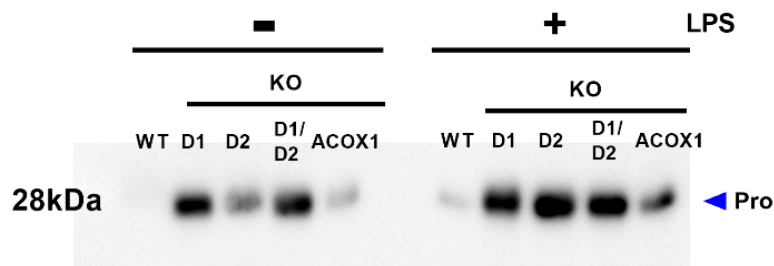
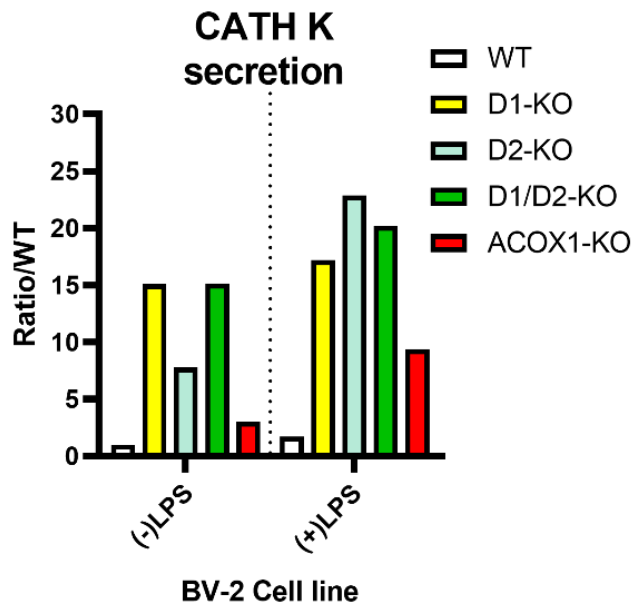


Figure 35: Les déficiences peroxysomale et le traitement LPS augmentent la sécrétion de la forme pro de la protéine Cathepsine K (28kDa) dans le milieu de culture. Analyse de l'expression protéique de la CATHK par western blot des cellules BV-2 (WT, *Abcd1*^{-/-}, *Abcd2*^{-/-}, *Abcd1d2*^{-/-} et *Acox1*^{-/-}) traitées avec du LPS pendant 24H. L'extrait protéique du milieu de culture a été séparé sur un gel d'électrophorèse SDS PAGE de 12%, puis transférées sur une membrane PVDF et analysée par immunoblotting avec l'anticorps anti CathK. L'Analyse densimétrique de l'immunoblot a été faite pour comparer l'intensité du signal obtenu au niveau des bandes par rapport au Wt. Flèche bleue : la protéine sous sa forme pro.

4. Activité enzymatique

Afin de conforter nos résultats obtenus par western blot montrant que les mutations des gènes peroxysomaux augmentent l'expression protéique des enzymes lysosomales. On a procédé à la mesure des activités enzymatiques *in vitro* des enzymes lysosomales des cellules microgliales sauvages et déficientes.

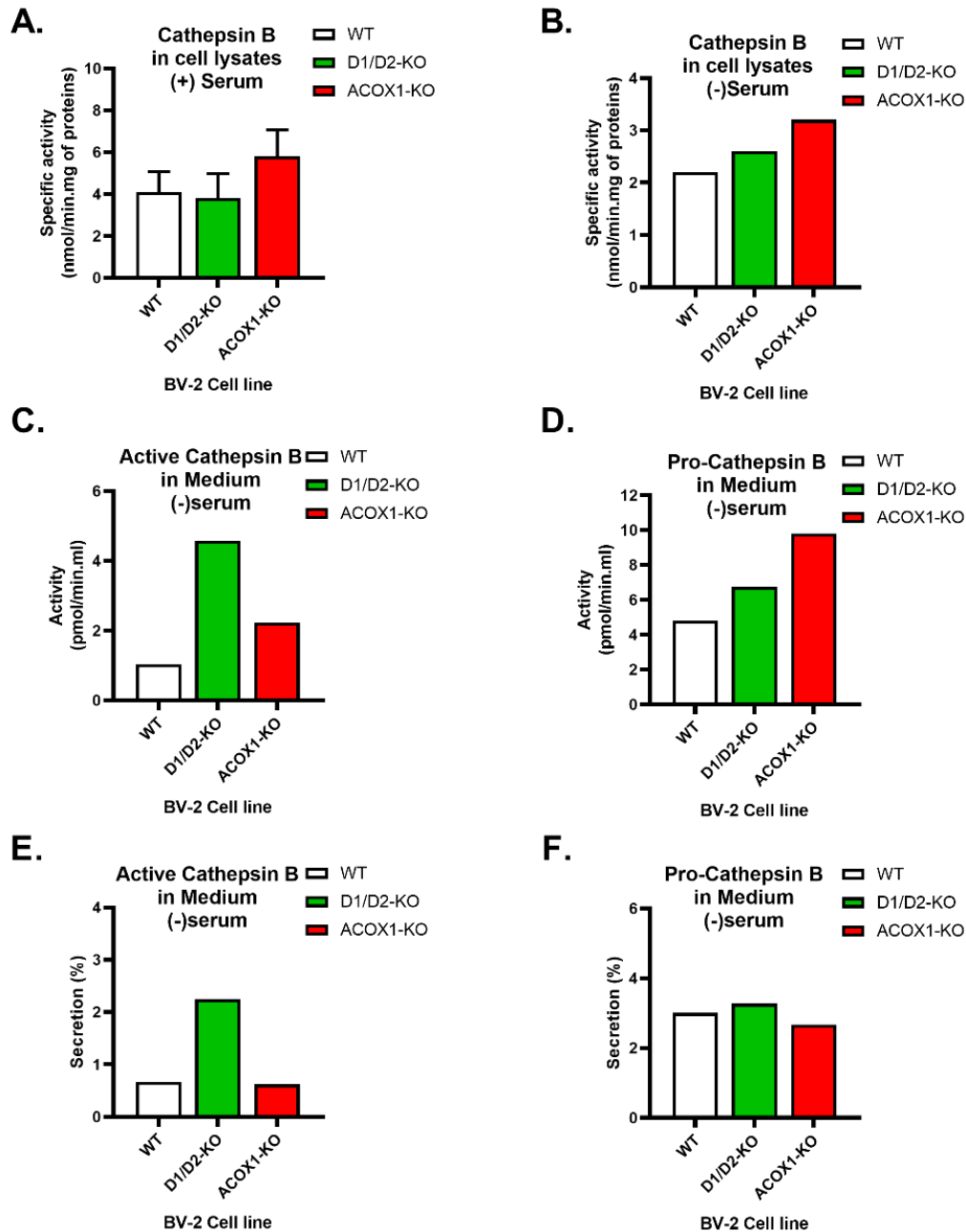


Figure 36: Mesure de l'activité spécifique de la cathepsine B dans les lysats des cellules BV-2 WT, *Abcd1d2*^{-/-}, *Acox1*^{-/-}. A. Les résultats représentent la moyenne de l'activité spécifique de la cathepsine B dans les lysats de cellules cultivées dans un milieu de culture pourvu de sérum (\pm écart-type) calculée à partir des activités mesurées dans 3 expériences indépendantes. B. Résultats de l'activité spécifique

Cathepsine B dans les lysats cellulaires en absence de sérum, C. Mesure de l'activité enzymatique de la cathepsine B forme active dans le milieu de culture, D. Mesure de l'activité enzymatique de la forme Procathepsine B dans le milieu de culture dépourvu de serum. E. Pourcentage de sécrétion de la cathepsine B forme active dans le milieu de culture cellulaire. F. Pourcentage de sécrétion de la forme Procathepsine B dans le milieu de culture dépourvu de sérum.

Dans cette partie du manuscrit, on présente les résultats du dosage de l'activité enzymatique de la Cathepsine B active et la Procathepsine B dans les lysats cellulaires et dans le milieu de culture. Afin de doser l'activité de la cathepsine B dans le milieu de culture cellulaire c'était nécessaire de procéder à l'élimination des protéines albumine du serum bovin contenues dans le milieu de culture. Pour cette raison, les cellules ont subi 4H de privation de serum avant la récolte.

La figure 36 montre les résultats de dosage de l'activité enzymatique de la cathepsine B (CathB) dans les lysats cellulaires de cellules BV-2. Une faible augmentation de l'activité de la cathepsine B est observée dans les cellules *Acox1*^{-/-} comparées aux cellules sauvages *Wt*. Alors que dans les cellules *Abcd1d2*^{-/-}, l'activité enzymatique CATHB est similaire aux cellules WT (**figure 36, A**). Quand mesurée sur des lysats de cellules privées de sérum pendant 4H, l'activité enzymatique de la cathepsine diminue par rapport à celle en présence de sérum, mais le profil est presque similaire **figure 36, B**. L'activité de la forme active de la cathepsine B dans le milieu de culture est faiblement plus élevée chez les cellules doubles mutantes **figure 36, C**. Alors que l'activité enzymatique de la forme Procathepsine dans le milieu de culture est en concordance avec celle dosée dans les lysats cellulaires en absence de sérum **figure 36, D**. Dans le **graphe E** de la figure 36, on trouve le pourcentage de sécrétion de la forme active de la cathepsine B dans le milieu extracellulaire. Les cellules doubles mutantes libèrent davantage la forme active de la protéase lysosomales que les cellules sauvages et les cellules déficients en *Acox1*. Cependant, le pourcentage de sécrétion de la Procathepsine B est similaire dans les 3 types cellulaires **figure 36, F**.

iv. Impact sur l'expression des hydrolases lysosomales

Les enzymes lysosomales dégradent les composés cellulaires séquestrés par autophagie ou des composants extracellulaire internalisés par endocytose ou par phagocytose (Trivedi et al. 2020). Les cathepsines sont des hydrolases lysosomales jouant un rôle vital dans la digestion, la résorption osseuse, l'apoptose, la réponse immunitaire, la libération des hormones, la synthèse protéique, le transport vésiculaire et l'autophagie (Brix et al. 2008; Turk et al. 2012). Cependant, l'état inflammatoire affecte considérablement leurs activités (Patel et al. 2018). Les cathepsines sont impliquées dans plusieurs maladies neurodégénératives telles que la maladie d'Alzheimer ou la schizophrénie (Timur et al. 2016; Schilcher et al. 2014). Nos résultats montrent que les déficiences peroxysomales dans les cellules microgliales BV-2 altèrent l'expression protéique et l'activité enzymatique des enzymes lysosomales. Ceci pose la question de l'implication des lysosomes dans la pathogenèse des leucodystrophies peroxysomales. les travaux de Mizunoe et al., indiquent que la surexpression de la cathepsine B dans les adipocytes cause un dysfonctionnement du métabolisme lipidique (Mizunoe et al. 2020). De plus, plusieurs études ont souligné l'implication de la surexpression et la sécrétion des cathepsines des microglies activées dans la neuroinflammation chronique, la neurotoxicité et la mort neuronale (Nakanishi 2020b). La localisation des cathepsines n'est pas limitée au compartiment endolysosomal, mais elles peuvent être localisées également dans le cytoplasme et le milieu extracellulaire, soulignant ainsi leur implication dans différentes activités biologiques endo- et extra-lysosomales (Reiser et al. 2010; Vizovišek et al. 2019).

Les variations de l'expression ou de la localisation de la cathepsine B microgliale jouerait un rôle majeur dans l'accélération de la sénescence cérébrale. Nakanishi et al., ont indiqué que durant le processus neuropathologique, les cellules microgliales activées expriment et secrètent différentes cathepsines, et leurs activités enzymatiques contribuent à la persistance de l'inflammation et de la réponse immunitaire (Nakanishi 2003; 2020a; Lowry et al. 2018). Trois voies de signalisations sont connues pour l'activation de l'inflammasome NLRP3, et impliquent particulièrement le flux potassique, la génération de ROS et la production de la cathepsine B. La présence de LPS déclenche les voies de signalisation toll-like receptor (TLR)-4 et celle de l'ATP. L'inflammasome NLRP3 (NOD-like receptor containing-pyrin domain 3) est ensuite activé pour cliver la pro-caspase-1 en caspase-1, permettant ainsi la sécrétion de IL-1 β (Nakanishi 2020b;

Wynick et al. 2016). Une étude *in vivo* sur des souris déficientes en TLR-4 et traitées avec du LPS, a montré que l'inhibition de l'activité de cathepsine B réduit l'activation de la caspase-11 et de l'inflammasome NLRP3 (N. Chen et al. 2018). La maturation de la cytokine pro-inflammatoire IL-1 β en IL-1 β nécessite, en plus de la caspase-1, la présence de la protéase cathepsine B (Hentze et al. 2003; Gicquel et al. 2015; Okinaga et al. 2015) (Gicquel et al. 2015). Une étude *in vitro* conduite par Terada et al., a démontré que l'inhibition pharmacologique et génique de la cathepsine B bloque la sécrétion de l'interleukine mature IL-1 β par les microglies stimulées avec de la chromogranine A (Terada et al. 2010). La cathepsine B peut seule induire la maturation de procaspase 1 sans l'implication de NLRP3, mais ce processus d'activation se passe uniquement dans un milieu à pH acide (Vancompernelle et al. 1998). En effet, la cathepsin B est impliquée dans l'activation de la procaspase-1 à travers l'activation directe de la procaspase-11 dans des conditions de pH neutre. Ajouter à cela, que l'activité de la cathepsine B est impliquée dans la production de TNF- α , en jouant un rôle majeur dans les modifications post-traductionnelle de TNF- α , son transport et sa sécrétion (Ha et al. 2008). L'activité protéolytique de cathepsine B entraîne la dégradation de I κ B α ubiquitinylée, permettant l'activation de NF κ B. Le NF κ B est un facteur de transcription clé impliqué dans la régulation de l'expression des gènes médiateurs de neurotoxicité des cellules microgliales activées en phénotype M1 neurotoxique (J. Ni et al. 2015). Nos travaux montrent que toutes les cellules microgliales mutantes surexpriment la protéine cathepsine B par rapport aux cellules sauvages *Wt*. En conséquence, les résultats de RTqPCR montrent une augmentation de l'expression génique d'*Il-1 β* . Ces données nous indiquent que la cathepsine B serait impliquée dans l'induction de l'expression d'*Il-1 β* dans les cellules déficientes par l'activation de la voie de NF κ B. Ni et al., ont rapporté que NF κ B peut être maintenu activé grâce à la protéolyse d'I κ B α par la cathepsine B dans les auto-lysosomes des microglies activées (J. Ni et al. 2015).

Dans les conditions de culture en présence de LPS, l'expression de la cathepsine B et K diminue dans les cellules mutantes *Abcd1*^{-/-} et double mutantes *Abcd1/d2*^{-/-} en comparaison avec les cellules déficientes non-traitées. Contrairement aux cellules *Acox1*^{-/-}, chez qui le traitement LPS induit significativement l'expression de la cathepsine K. De plus, la détection de CATHK dans le milieu extracellulaire atteste que les cellules mutantes secrètent excessivement de la cathepsine K par rapport aux cellules sauvages. Il a été démontré que la dérégulation de

l'expression de CATHK peut altérer la signalisation Toll-like receptor 9 (TLR 9) dans les cellules dendritiques (Asagiri et al. 2008). De plus, l'induction de l'expression de la CATHK a été décrite lors de la différenciation des ostéoclastes (Puissant et Boonen 2016). Keegan et al., ont montré que l'expression et l'activation de CATHK est induite dans les cellules endothéliales aortiques humaines stimulées avec du TNF- α via l'activation de la voie de signalisation *c-jun N terminal kinase* (Keegan et al. 2012). Le protéine c-JUN est activé par phosphorylation lui permettant ainsi de se dimériser avec la protéine c-FOS et former le facteur de transcription AP-1. L'élément de réponse permettant la fixation d'AP-1 a été identifié et validé dans la région promotrice du gène *Ctsk* codant pour CATHK (Pang et al. 2007). Ainsi le traitement des cellules avec un inhibiteur de phosphorylation de I κ B α , est suffisant pour bloquer l'induction de la cathepsine K. Donc l'activation de NF κ B et AP-1 sont nécessaire pour activer l'expression du gène *Ctsk*, et donc l'expression de la protéine CATHK dans les cellules endothéliales, impliquée dans le remodelage de l'endothélium des vaisseaux sanguins qui est causé par l'inflammation chronique et le perturbation du flux sanguin (Keegan et al. 2016). Nos résultats de quantification d'expression génique de TNF α , et de quantification protéique de CATHK ont montré que l'expression de la protéase CATHK est induite, tandis que le gène TNF- α est sous-exprimé dans toutes les cellules mutantes. Il semblerait donc que la production de la Cathepsine K dans les cellules microgliales déficientes ne dépend pas particulièrement de l'activation du TNF α . Une autre étude mené par Sukhova et al., a montré que IFN γ induit la production et la sécrétion de la cathepsine K dans les cellules de muscle lisse (Sukhova et al. 1998). En revanche, la production et la sécrétion de la Cathepsine K a été induite dans toutes les cellules BV2 microgliales mutantes dans les deux conditions de culture, avec ou sans LPS, malgré la répression de l'expression génique de l'*Infy*. Ceci pourrait indiquer l'existence de différences spécifiques dans la réponse aux cytokines pro-inflammatoire en fonction du type cellulaire.

Il a été rapporté que l'autophagie survient en réponse au stress cellulaire induit par de l'hypoxie et l'inflammation (Gottlieb et Mentzer 2010). Parmi les protéines lysosomales participant à l'autophagie se trouve la protéine LAMP2 (*lysosome-associated membrane protein 2*), qui contribue à la maturation des vacuoles autophagiques (Tanaka et al. 2000; Eskelinen 2006). Elle est également impliquée dans le transport endosomal/lysosomal du cholestérol (Kk et al. 2007). La réduction de l'expression de LAMP2 augmente le taux des protéines oxydées dans les foies de souris âgées (A. M. Cuervo et Dice 2000; Ana Maria Cuervo

et Wong 2014; Takahashi et al. 2013). Plusieurs études ont démontré que la déficience en LAMP2 induit l'accumulation des vacuoles autophagiques et cause la maladie de Danon, caractérisée par une sévère myopathie des muscles squelettiques et cardiaques (Nishino et al. 2000; Maron et al. 2009). Les souris déficientes en LAMP2 développent une myopathie cardio-squelettique vacuolaire similaire à celle observée chez les individus avec la maladie de Danon (Tanaka et al. 2000). Dans nos résultats l'expression de LAMP2 a été significativement altérée particulièrement dans les cellules déficientes en *Abcd1*^{-/-} et non dans les autres cellules microgliales. L'autophagie joue un rôle vital pour rétablir la balance inflammatoire et maintenir l'homéostasie immunitaire (Ge et al. 2018). Elle peut aussi être impliquée dans la suppression de l'inflammation par la régulation de l'expression des cytokines pro-inflammatoires (Nakahira et al. 2011). L'autophagie est induite par l'IL-1, TNF- α , et IL-6, et elle est bloquée par les molécules anti-inflammatoires comme IL-10, et IL-4 (Ge et al. 2018; N.-Y. Lin et al. 2013). L'induction de l'expression de LAMP2 des cellules microgliales BV2 mutantes *Abcd1*^{-/-} et *Acox1*^{-/-} stimulées avec du LPS est peut-être liée à l'activation de la molécule TNF- α . Il a été rapporté que l'inhibition par le LPS de l'autophagie, dans les cellules mononuclées humaines du sang périphérique, entraîne une diminution de la sécrétion de TNF- α et IL-6, et une augmentation dans l'expression génique d'IL-1 β (Ge et al. 2018; Crişan et al. 2011). Alors que dans le cas de macrophages activés par le LPS, l'autophagie supprime l'expression de TNF- α LPS-dépendante, tandis que l'inhibition de l'autophagie rétablit l'expression TNF- α associée au traitement LPS (Pun et al. 2015). IL-1 β est capable de stimuler l'autophagie via la signalisation mitochondriale, qui exerce un effet protecteur sur les cellules. De plus, IL-1 α et IL-1 β peuvent déclencher la formation des autophagosomes, et induire l'autophagie faisant partie de la régulation négative rétroactive pour limiter la réponse inflammatoire (M. Zhang et al. 2015). Les résultats transcriptomiques de Raas et al. (non encore publiés) ont montré une dérégulation de l'expression de *Lamp2* dans les cellules mutantes. Nos résultats sur l'expression protéique de LAMP2 ne révèlent pas de variations évidentes dans l'expression de cette protéine lysosomale dans les cellules mutantes. La plupart des travaux publiés sur l'autophagie indiquent que celle-ci peut réguler et être régulée par les cytokines pro-inflammatoires. Ce qui suggère l'implication de TNF- α et IL-1 β dans la régulation de l'expression de LAMP2 dans les cellules microgliales déficientes. Chez le modèle murin de la sclérose en plaques, il est noté une augmentation du stress oxydatif et de l'inflammation et une diminution du LAMP2 (Lindberg et al. 2004). Dans différentes cellules gliales l'autophagie joue un rôle

important dans la régulation de la neuroinflammation dans le système nerveux central (Liang et Le 2015). La dérégulation de l'autophagie dans la microglie pourrait perturber le processus d'élimination des débris cellulaires et puis favoriser la neuroinflammation persistante (Liang et Le 2015).

Sur l'ensemble des immunoblots réalisés avec des extraits protéiques des cellules microgliales BV-2, la cathepsine B est exprimée plus sous sa forme active que sous sa forme précurseur. Les précurseurs de cathepsines subissent un processus de maturation protéolytique dans les lysosomes (Zaidi et al. 2008). Ceci nous laisse suggérer un changement de pH dans les lysosomes des cellules BV2 mutantes. Les cellules *Abcd1*^{-/-} et *Abcd1/d2*^{-/-} sécrètent abondamment la forme précurseur de la cathepsine K de 43kDa par rapport aux cellules sauvages, suivies, en terme de niveau de sécrétion, par les cellules *Abcd2*^{-/-} puis *Acox1*^{-/-}. Le taux de sécrétion de la procathepsine K augmente avec le traitement LPS. Dans les cellules de mammifères, les cystéines-protéases sont synthétisées sous leurs forme précurseur inactives, et peuvent être soit sécrétées comme proenzymes dans le milieu extracellulaire soit transportées via les récepteurs mannose-6-phosphate vers le compartiment lysosomal où elles subissent le processus de maturation et devenir des enzymes actives (Katunuma 1989). L'activation de la procathepsine K se passe dans des conditions de pH acide (Patel et al. 2018), elle doit soit être clivée par une autre protéase, ou doit subir un processus autocatalytique (Bossard et al. 1996; Brömme et al. 1996; McQueney et al. 1997). L'ensemble des données récoltées nous laisse suspecter une surproduction de la cathepsine K, ou un changement de pH lysosomal dans les cellules microgliales mutantes. Les travaux publiés par Godat et al., montre que l'activité de la cathepsine K peut être régulée par le peroxyde d'hydrogène (Godat et al. 2008). Ils ont trouvé que la molécule H₂O₂ est capable de perturber et inhiber le processus de maturation de la cathepsine K et inactiver sa forme mature en fonction du temps et la concentration utilisée dans le traitement. Comme indiqué précédemment, le déficit de gènes peroxysomaux dans les cellules microgliales induit du stress oxydatif associé à la génération des ROS tel que le peroxyde d'hydrogène. La sécrétion abondante de la forme inactive de la cathepsine K dans le milieu extracellulaire pourrait être due à la production excessive de H₂O₂ par les cellules déficientes. De plus, bien que l'activité des cathepsines soit contrôlée normalement par les inhibiteurs de cathepsines endogènes comme les cystatines (Abrahamson et al. 2003), le déséquilibre entre les expressions des cathepsines et des cystatines peut se produire dans des conditions physiopathologiques (Altiok et al. 2006).

d. **Impact des déficiences peroxysomales sur la phagocytose des cellules BV2 microgliales**

5. Phagocytose

5.1. Phagocytose des bactéries fluorescentes

L'impact des déficiences peroxysomales sur la fonction phagocytaire des cellules BV-2, a été envisageable vu que l'expression génique, protéique ainsi que l'activité enzymatique des protéases lysosomales ont été plus ou moins affectées. Une étude préliminaire réalisée pour connaître l'impact des déficiences peroxysomales sur l'expression des gènes clés assurant les fonctions vitales des cellules microgliales a montré un changement dans l'expression du gène *Trem2* (Raas, Saih, Gondcaille, Trompier, Hamon, Leoni, Caccia, Nasser, Jadot, Ménétrier, et al. 2019) chez les cellules BV-2 déficientes (*Acox1*^{-/-}, *Abcd1*^{-/-} et *Abcd1d2*^{-/-}) par rapport aux cellules BV-2 *Wt*, ce qui nous a amené à émettre l'hypothèse d'un profond changement dans les fonctions liées à l'inflammation et la phagocytose.

Afin d'investiguer les changements de la capacité phagocytaire des cellules microgliales BV-2 liée aux déficiences peroxysomales (*Acox1*^{-/-} et *Abcd1d2*^{-/-}), nous avons réalisé deux types d'expériences permettant de suivre l'efficacité de la phagocytose en comparant le nombre de bactéries *Salmonella Typhimurium* internalisées par les cellules BV-2 déficientes par rapport aux cellules contrôles BV2 *Wt*.

Cette technique de phagocytose des bactéries fluorescentes est plus qualitative que quantitative, nous a permis d'observer sous microscope à fluorescence les bactéries *Salmonella* phagocytées par les cellules BV2 microgliales après 3H et 24H d'infection.

Les images obtenues par microscope à fluorescence regroupées dans la **figure 37** montrent que les cellules déficientes en ACOX1 ont été capables de phagocyter plus de bactéries *STm* fluorescentes que les cellules *Wt*. Alors que pour les cellules déficientes en ABCD1D2 on voit que leur capacité phagocytaire paraît être affectée d'une manière notable, avec peu de bactéries fluorescentes internalisées. L'ensemble des observations relevées sont consistantes avec les résultats obtenus récemment en utilisant des billes fluorescentes YG carboxylate (1 µm diamètre, Polysciences - réf 15702) utilisées comme antigènes et qui démontrent également une

augmentation de phagocytose de billes fluorescentes par les cellules déficientes en ACOX1 et une diminution chez les cellules déficientes en ABCD1D2 par rapport aux cellules sauvages WT.

-24H d'infection

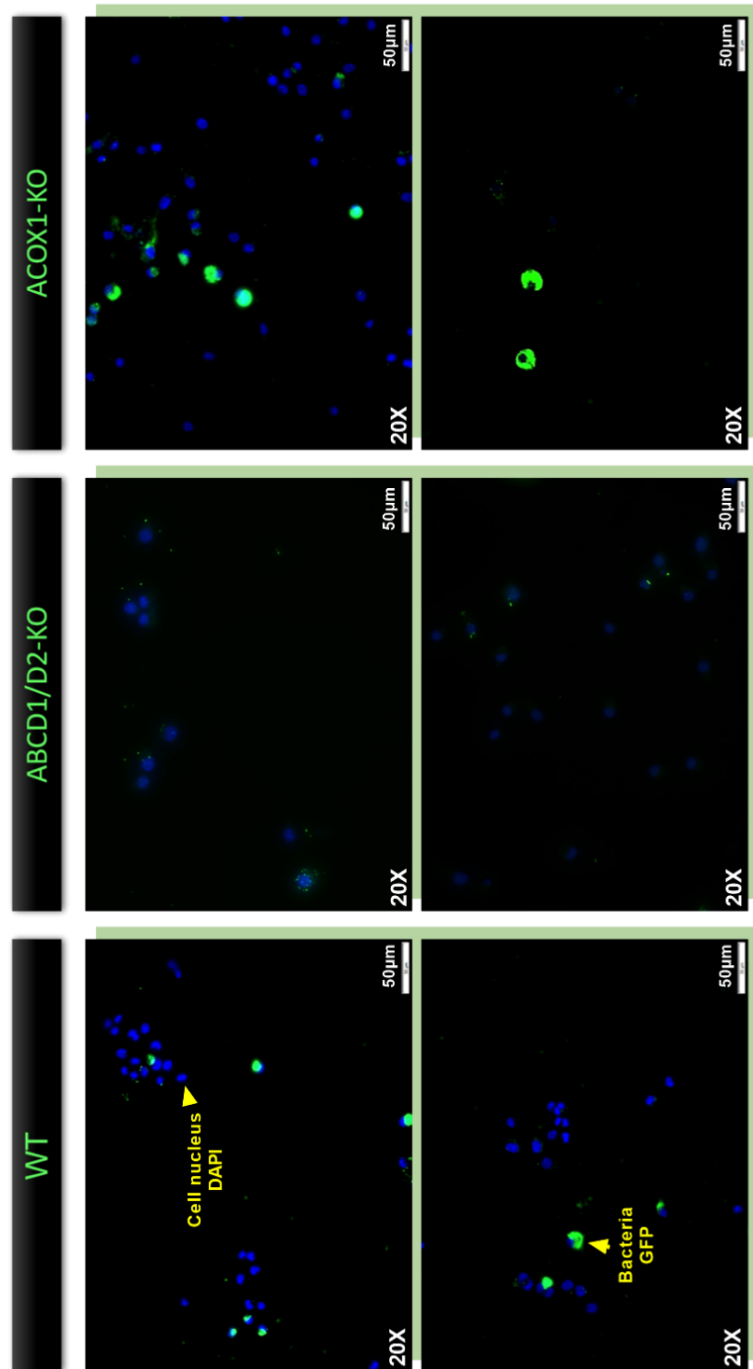


Figure 37: La capacité phagocytaire des cellules BV-2 microgliales (WT, $Acox1^{-/-}$ et $Abcd1d2^{-/-}$). Les Images obtenues par microscope à fluorescence (objectif X20) de l'infection de cellules BV-2 (WT, $Acox1^{-/-}$, $Abcd1d2^{-/-}$) par les bactéries STm-GFP mutantes après 24H d'infection. Les noyaux des cellules BV-2 sont marqués au DAPI à fluorescence bleue. La fluorescence verte vient des bactéries exprimant la protéine GFP fluorescente.

-3H d'infection

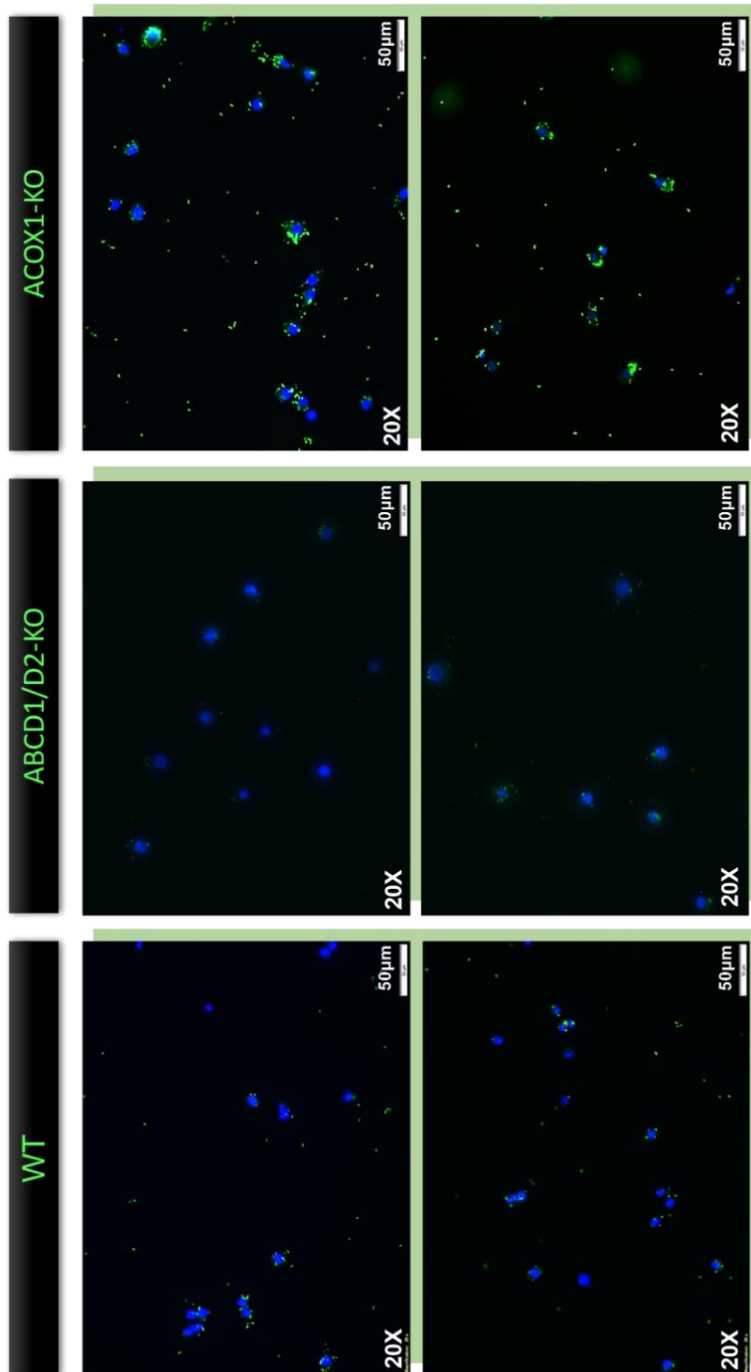


Figure 38: La capacité phagocytaire des cellules BV-2 microgliales (WT, $Acox1^{-/-}$ et $Abcd1d2^{-/-}$). Les Images obtenues par microscope à fluorescence (objectif X20) de l'infection de cellules BV-2 (WT, $Acox1^{-/-}$, $Abcd1d2^{-/-}$) par les bactéries STm-GFP mutantes après 3H d'infection. Les noyaux des cellules BV-2 sont marqués au DAPI à fluorescence bleue. La fluorescence verte vient des bactéries exprimant la protéine GFP fluorescente.

Les images obtenues après 24H d'infection des cellules BV2 microgliales par des bactéries mutantes exprimant la GFP (**Figure 37**), nous a montré l'hyperphagocytose des cellules BV2 déficientes en ACOX1 et l'hypo phagocytose exprimée par les cellules double mutantes *Abcd1/d2*^{-/-}. Dans les cellules *Acox1*^{-/-} on voit que la fluorescence verte des bactéries STm ressemble à un agrégat de fluorescence verte distinct associé chacun à un noyau cellulaire de couleur bleue du au marquage avec du DAPI.

Pour vérifier nos observations par rapport à la capacité phagocytaire des cellules BV2 microgliales des 3 lignées cellulaires, nous avons refait notre expérience mais avec un temps d'infection bactérienne différent.

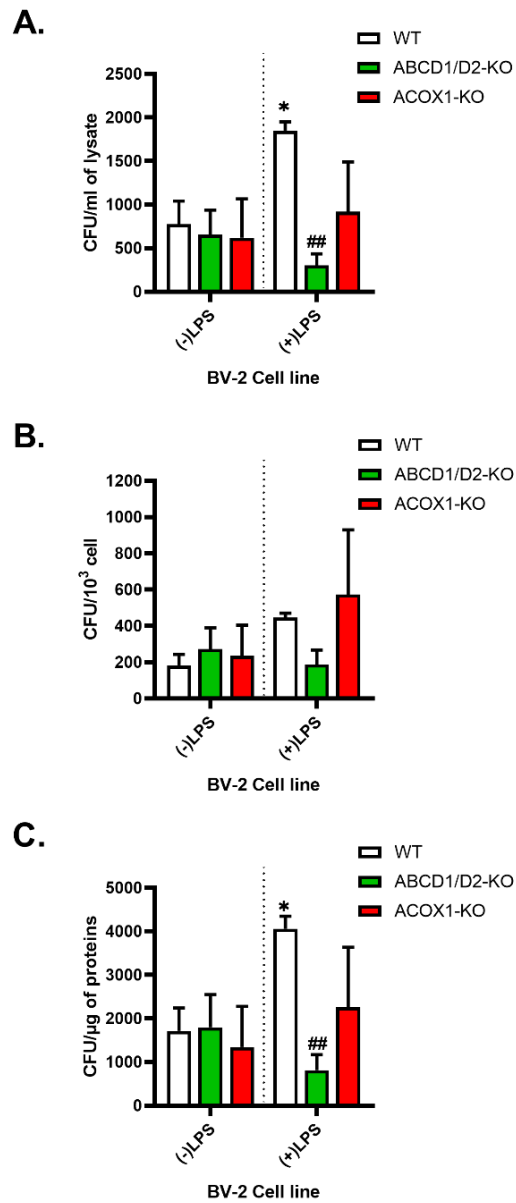
Après 3H d'infection bactérienne, les images prises des cellules BV2 microgliales infectées avec les *Salmonella Typhimurium* présentées dans **la figure 38** confirment nos observations faites sur les cellules microgliales après 24H d'infection. La présence des bactéries à fluorescence verte est plus abondante dans les cellules déficientes en *Acox1* que dans les cellules sauvages. Tandis que dans les cellules *Abcd1/d2*^{-/-} on voit à peine la fluorescence verte des bactéries STm.

5.2. Phagocytose des bactéries-méthode CFU

La méthode CFU qui permet de quantifier le nombre de bactéries viables internalisées par les cellules BV-2 montrent un résultat différent en termes de nombre de bactéries STm phagocytées par les trois lignées de cellules BV-2. Le nombre de colonies bactériennes est pratiquement identique 200CFU/1000 en comparant les 3 lignées de cellules BV-2. Alors qu'avec un traitement LPS (1µg/ml) pendant 24H, la phagocytose s'accroît dans les cellules BV-2 (*Wt* et *Acox1*^{-/-}) et le nombre de colonies augmente deux fois plus jusqu'à 500CFU/1000cellules BV-2. Ce résultat est en accord avec celui obtenu avec la phagocytose des billes fluorescentes. Mais, l'effet LPS sur les cellules BV-2 *Abcd1d2*^{-/-} a abaissé leur capacité de phagocytose à 187 CFU/1000 cellules BV-2, ce qui est différent des données recueillies avec les billes fluorescentes.

Il faut noter que pour confirmer l'ensemble des résultats obtenus et déterminer l'effet des déficiences peroxysomales sur la phagocytose des cellules microgliales BV-2, il est nécessaire de reproduire les deux expériences pour confirmer ou infirmer les résultats obtenus sur l'effet de

l'absence des gènes *Acox1* et *Abcd1d2* ainsi que l'effet LPS sur la fonction phagocytaire des 3 lignées cellulaires.



*Figure 39: Capacité phagocytaire des cellules BV2 microgliales sauvages et mutantes. Les graphiques montrent la moyenne de nombre d'unité formant une colonie (CFU) bactérienne de STm A. par ml de lysat cellulaire B. par millier de cellules BV-2 (Wt, *Acox1*^{-/-} et *Abcd1d2*^{-/-}) traitées ou non pendant 24H avec du LPS 1μg/ml et C. par μg de protéines (seules les plaques contenant de 30 à 300 colonies ont été prise en compte).*

v. *Impact sur la fonction phagocytaire des cellules microgliales*

Dans la littérature, plusieurs études sur les cellules microgliales se focalisent sur la sécrétion des molécules pro/anti inflammatoires cytokines, chimiokines et facteurs de croissances, mais peu abordent leur fonction de phagocytaire. La phagocytose est l'une des fonctions principales assurée par les cellules microgliales, qui permet l'élimination des cellules apoptotiques et les débris de myéline afin de maintenir l'homéostasie cérébrale (Gehrmann et al. 1995; Neumann et al. 2009). L'activité phagocytaire de la microglie ne fonctionne que grâce à la présence de récepteurs spécifiques exprimés sur la surface cellulaire (TLRs, TREM2, Récepteur Fc, Récepteur au mannose) (Veerhuis et al. 2011; Lucin et al. 2009), et les voies de signalisation qui contribuent à la reconnaissance et l'engloutissement des particules pathogènes (Fu et al. 2014). Les récepteurs TLRs reconnaissent les structures moléculaires conservées de microbes comme les lipopolysaccharides, et déclenchent la réponse immunitaire. Il a été rapporté que les TLRs régulent le processus de phagocytose via les voies de signalisation MyD88 (Doyle et al. 2004; L. Kong et al. 2008). Nos résultats présentés plus haut sur l'expression génique de *Myd88*, et sur la phagocytose des bactéries STm montrent que le traitement des cellules microgliales avec du LPS augmente l'expression de *Myd88* et la phagocytose des bactéries STm des cellules *Wt* et *Acox1*^{-/-}. Cependant, la stimulation des cellules doubles déficientes *Abcd1/d2*^{-/-} avec du LPS a diminué le niveau d'expression de *Myd88*, et a réduit significativement la capacité phagocytaire des cellules *Abcd1/d2*^{-/-}. Ces résultats suggèrent que la phagocytose des bactéries STm après un traitement LPS des cellules *Wt* et *Acox1*^{-/-} active les récepteurs TLRs qui induisent la voie de signalisation Myd88. La caractérisation préliminaire des cellules microgliales modèles de déficiences peroxysomales réalisée par Raas et al., a révélé la présence d'un changement dans l'expression des gènes de phagosome (*Trem2*, *Tyrobp* et *Mrc1*) (Raas, Gondcaille, et al. 2019; Raas, Saih, et al. 2019). Ces données posent la question sur l'efficacité de phagocytose des cellules mutantes par rapport aux cellules sauvages. L'activation des récepteurs TREM2 inhibent la sécrétion des facteurs pro-inflammatoires tels que les cytokines et les ROS (Napoli et al, 2010; Klesney-Tait et al. 2006). L'altération de l'expression du gène *Trem2* est impliquée dans la pathogenèse de plusieurs maladies neurodégénératives (Yeh et al. 2017; G. C. Brown et al. 2014). La capacité phagocytaire des cellules microgliales a été premièrement évaluée par son pouvoir à engloutir les billes fluorescentes. Les résultats (non encore publié de Raas et al.), ont montré que les cellules *Acox1*^{-/-}

expriment une hyper-phagocytose par rapport aux cellules *Abcd1/d2*^{-/-} qui phagocytent moins de billes fluorescentes par rapport aux cellules sauvages. De plus, l'analyse par cytométrie en flux a confirmé ces observations faites sous microscope à fluorescence, indiquant la présence abondante et significativement élevée des billes fluorescentes dans les cellules déficientes en *Acox1*^{-/-} en comparaison avec les cellules sauvages. Alors que dans les cellules doubles déficientes *Abcd1/d2*^{-/-} les billes fluorescents étaient significativement moins phagocytées. Il n'est pas toujours claire si la phagocytose assurée par la microglie joue un rôle bénéfique ou néfaste dans le dysfonctionnement cérébral, malgré que plusieurs travaux soulignent l'importance de l'élimination des débris, nécessaire pour la reconstruction et la réorganisation du réseau neuronal suite à une lésion cérébrale (Sierra et al. 2010; Ito et al. 2007).

Notre étude visant à évaluer la phagocytose des cellules microgliales, vient pour confirmer ce qui était rapporté par Raas et al., et affirmer l'hypothèse de la dérégulation de la phagocytose dans les cellules microgliales BV-2 déficientes. Nous avons testé dans ce cas la phagocytose des cellules microgliales sauvages et mutantes en utilisant plutôt des bactéries de l'espèce *Salmonella Typhimurium* (*STm*). Les gènes *Mrc1* et *Fcgr2b* de phagosome sont induits dans les cellules *Acox1*^{-/-}, et réprimés dans les cellules doubles mutantes *Abcd1/d2*^{-/-}. Dans une autre étude conduite par Weinhofer et al., il a été mis en évidence une diminution du niveau d'expression du récepteur mannose *Mrc1*, marqueur de polarisation M2 dans les macrophages des patients souffrants d'adrénoleucodystrophie cérébrale (Weinhofer et al. 2018). Ceci peut expliquer les résultats obtenus à la suite de l'exposition des cellules aux billes fluorescentes ou aux bactéries *STm*. L'augmentation de la phagocytose par les microglies pour éliminer les cellules mortes et les débris de myéline a été jugée bénéfique et importante pour la restauration des fonctions cérébrales (Rotshenker 2003). Dans une revue publié par Smith (Smith 1999), il a été rapporté que la capacité phagocytaire de la microglie peut être altérée par les médiateurs inflammatoires tels que IFN- γ , TNF- α , IL-4, et IL-10. L'incubation des cellules BV-2 avec des cytokines anti-inflammatoires dans des conditions de culture pro-inflammatoires, augmente leurs capacités phagocytaires. L'inhibition de la voie de signalisation NF κ B par les cytokines anti-inflammatoires permet d'éliminer cet effet inhibiteur des cytokines pro-inflammatoires exercé sur la fonction phagocytaire des cellules microgliales BV-2 (Koenigsknecht-Talboo et al. 2005; Inoue et al. 2004). Les cellules doubles mutantes *Abcd1/d2*^{-/-} traitées avec du LPS, montrent une diminution de phagocytose avec une augmentation de l'expression des deux gènes pro-inflammatoires *Il-6* et *Il-*

8. L'activation des médiateurs pro-inflammatoires peut provoquer un effet inhibiteur sur la capacité phagocytaire des cellules microgliales. Les tests de CFU et de phagocytose avec les bactéries fluorescentes ont donné des résultats opposés. Il a été démontré dans une étude de Roberts et al., que la fluorescence de GFP peut être affectée par le pH acide du milieu (Roberts et al. 2016). Ce fait peut fournir une explication des résultats contradictoires obtenus par les deux types de tests de phagocytose. La technique de CFU indique qu'il n'existe presque aucune différence dans la fonction de phagocytose entre les cellules sauvages et mutantes. Tandis que, les images prises sous microscope à fluorescence des cellules microgliales sauvages et mutantes a montré une hyperphagocytose des cellules *Acox1*^{-/-}, et une hypophagocytose des cellules *Abcd1/d2*^{-/-} bactéries *STm* mutantes. Par ailleurs, Il a été rapporté par Michelucci et al., que IFN γ inhibe la phagocytose microgliale, alors qu'IL-10 l'active (Michelucci et al. 2009). Par contre d'autres travaux (Haga et al. 2016) et (Gaikwad et al. 2009) rapportent que IFN γ augmente la capacité phagocytaire des microglies, et IL-4 l'inhibe. De plus, Neniskyte et al., ont montré que la cytokine pro-inflammatoire TNF- α stimule la phagocytose microgliale des billes et des neurones (Neniskyte et al. 2014). L'ensemble des expériences de transcriptomique et de western blot effectuées indiquent que les molécules participantes à l'autophagie ont été également altérées par l'absence des gènes peroxysomaux. Avec une augmentation dans l'expression génique et protéique des protéines d'autophagie ATG13 et LC3-II dans les cellules microgliales BV-2 déficientes. La dérégulation de l'autophagie dans la microglie peut aussi affecter la phagocytose et l'inflammation qui contribuent à la physiopathogenèse des maladies neurodégénératives (Plaza-Zabala et al. 2017). Le matériel extracellulaire phagocyté est ensuite transporté vers les lysosomes pour sa dégradation. L'étude récente établie par Campagno et al., révèle la présence d'un mécanisme faisant le lien entre les rôles endolysosomal et de l'inflammation, qui peut être une explication rationnelle de l'augmentation de la réponse inflammatoire et la surexpression des enzymes lysosomales démontrées dans les cellules microgliales BV-2 mutantes. Ajouter à cela, le récepteur extracellulaire de l'ATP (P2X₇) est capable de moduler les fonctions lysosomale, autophagique et phagocytaire dans les cellules microgliales (Campagno et Mitchell 2021). Le récepteur P2X₇ est connu pour son implication dans l'activation de la voie de signalisation NLRP3. La stimulation du récepteur d'ATP induit de l'autophagie et augmente le niveau d'expression de LC3-II, et entraîne une fuite lysosomale traduite par une augmentation de la cathepsine B cytoplasmique. La cathepsin B active l'inflammasome NLRP3 qui permet le clivage de la caspase-1 et la maturation puis la

sécrétion de IL-1 β (Campagno et Mitchell 2021). La dérégulation de l'expression génique des médiateurs d'inflammation et d'autophagie, et de l'expression protéique et les activités d'enzymes lysosomales, sont des indicateurs majeurs de l'altération de la fonction phagocytaire des cellules microgliales déficientes. Des investigations supplémentaires sur les récepteurs et les voies de signalisation impliquées dans la phagocytose pourront apporter un éclairage sur les mécanismes mis en jeu et reliant le déficit de la β -oxydation peroxysomale des acides gras à l'altération de la phagocytose microgliale.

B. Les effets de l'huile de graine de cactus sur les fonctions peroxysomales et l'inflammation au niveau hépatique et cérébral

Le déséquilibre Redox cause du stress cellulaire qui peut provoquer une dérégulation du métabolisme cellulaire se traduisant à terme par une altération tissulaire et un dysfonctionnement des organes. Le traitement de souris avec des endotoxines bactériennes (LPS) induit un stress oxydatif et une inflammation, permettant ainsi de mimer les conditions d'une septicémie (réf). L'étude présentée ici avait pour objectif d'évaluer l'effet protecteur de l'huile de graines de cactus (CSO) contre le stress oxydatif et l'inflammation induits par le LPS dans le foie et le cerveau de souris. Il s'agissait d'explorer cet effet préventif de la CSO à court-terme, quatre heures après injection intraveineuse du LPS. Nous avons donc étudié l'effet à court terme du LPS sur les fonctions peroxysomales au niveau cérébrale et au niveau hépatique et l'état inflammatoire chez des souris ayant reçu pendant 28 jours un régime enrichi ou non en CSO. L'effet protecteur potentiel du CSO contre le LPS a été comparé à deux huiles comestibles courantes d'olive (OO) et de colza (CO). La capacité antioxydante dans le cerveau et le foie a été évaluée en mesurant l'expression des gènes codant pour des protéines pro-inflammatoires ou pour des enzymes peroxysomales impliquées dans la β -oxydation des acides gras ou dans les activités antioxydantes.

Protective Effect of Nopal Cactus (*Opuntia ficus-indica*) Seed Oil against Short-Term Lipopolysaccharides-Induced Inflammation and Peroxisomal Functions Dysregulation in Mouse Brain and Liver

Mounia Tahri-Joutey ^{1,2}, Fatima-Ezzahra Saih ^{1,2}, Riad El Kebbjaj ^{1,3}, Catherine Gondcaille ², Joseph Vamecq ⁴, Norbert Latruffe ², Gérard Lizard ², Stéphane Savary ², Boubker Nasser ¹, Mustapha Cherkaoui-Malki ^{2,*} and Pierre Andreoletti ²

Citation: Tahri-Joutey, M.; Saih, F.-E.; El Kebbjaj, R.; Gondcaille, C.; Vamecq, J.; Latruffe, N.; Lizard, G.; Savary, S.; Nasser, B.; Cherkaoui-Malki, M.; et al. Protective Effect of Nopal Cactus (*Opuntia ficus-indica*) Seed Oil against Short-Term Lipopolysaccharides-Induced Inflammation and Peroxisomal Functions Dysregulation in Mouse Brain and Liver. *Int. J. Mol. Sci.* **2022**, *23*, x. <https://doi.org/10.3390/xxxxx>

Academic Editor(s):

Received: date

Accepted: date

Published: date

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2022 by the authors. Submitted for possible open access publication under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

- ¹ Laboratoire Biochimie, Neurosciences, Ressources Naturelles et Environnement, Faculté des Sciences et Techniques, Université Hassan I, BP577, 26000 Settat, Morocco ; mouniajoutey@gmail.com (M.T.-J.); f.z.saih@hotmail.com (F.-E.S.); elkebbajriad@gmail.com (R.E.K.)
 - ² Laboratoire Bio-PeroxiL EA7270, University Bourgogne Franche-Comté, 6 Bd Gabriel, 21000 Dijon, France ; catherine.gondcaille@u-bourgogne.fr (C.G.); norbert.latruffe@u-bourgogne.fr (N.L.); gerard.lizard@u-bourgogne.fr (G.L.); stsavary@u-bourgogne.fr (S.S.)
 - ³ Laboratory of Health Sciences and Technologies, Higher Institute of Health Sciences, Hassan First University, Settat 26000, Morocco
 - ⁴ INSERM and HMNO, CBP, CHRU Lille, 59000 Lille and RADEME EA 7364, Faculté de Médecine, Université de Lille 2, 59045 Lille, France ; joseph.vamecq@inserm.fr
- * Correspondence: malki@u-bourgogne.fr (M.C.-M.); +33-380-39-62-37 (M.C.-M.);

Abstract: Exposure to endotoxins (lipopolysaccharides, LPS) may lead to a potent inflammatory cytokine response and a severe impairment of metabolism, causing tissue injury. The protective effect provided by cactus seed oil (CSO), from *Opuntia ficus-indica*, was evaluated against LPS-induced inflammation, dysregulation of peroxisomal antioxidant, and β -oxidation activities in the brain and the liver. In both tissues, a short-term LPS exposure increased the proinflammatory interleukine-1 β (*Il-1 β*), inducible Nitroxide synthase (*iNos*), and Interleukine-6 (*Il-6*). In the brain, CSO action reduced only LPS-induced *iNos* expression, while in the liver, CSO attenuated mainly the hepatic *Il-1 β* and *Il-6*. Regarding the peroxisomal antioxidative functions, CSO treatment (as Olive oil (OO) or Colza oil (CO) treatment) induced the hepatic peroxisomal *Cat* gene. Paradoxically, we showed that CSO, as well as OO or CO, treatment can timely induce catalase activity or prevent its induction by LPS, respectively, in both brain and liver tissues. On the other hand, CSO (as CO) pretreatment prevented the LPS-associated *Acox1* gene and activity decreases in the liver. Collectively, CSO showed efficient neuroprotective and hepato-protective effects against LPS, by maintaining the brain peroxisomal antioxidant enzyme activities of catalase and glutathione peroxidase, and by restoring hepatic peroxisomal antioxidant and β -oxidative capacities.

Keywords: ACOX1; Catalase; Cactus seed oil; GPx; *Il-1 β* ; *Il-6*; *iNos*; lipopolysaccharides; peroxisome; SOD1

1. Introduction

Sepsis is associated with a high mortality rate and is defined by severe organ dysfunctions, necessitating urgent and intensive care (Sharshar et al. 2004; Mantzaris, Tsolaki, et Zakyntinos 2017). Exposure to endotoxins (lipopolysaccharides, LPS), originating from bacterial membranes, may lead to an acute inflammatory cytokine response accompanied with a burst of reactive oxygen and a severe impairment of lipid metabolism, causing tissue injury (Sriskandan et Altmann 2008; Spolarics 1998; Fransen et Lismont 2018). Several studies have demonstrated that the destruction of the blood–brain barrier by LPS is involved in the development of several brain diseases, as for sepsis-associated encephalopathy (Sweeney et al. 2019). The increased blood–brain barrier permeability by LPS has been correlated to tight and adherence junctions' death and pericyte detachment (Nishioku et al. 2009; X. Cheng et al. 2018), leading to the enhanced transport of pro-inflammatory cytokines (Quan et Banks 2007; Peng et al. 2021). The management of this acute sepsis syndrome depends on the body's capacity to cope with the deleterious imbalance between the inflammatory cytokine burst, the important dysregulation of lipid metabolism, and the increased production of reactive oxygen species (ROS) (Vamecq et al. 2018; Ghzaïel et al. 2021). Remarkably, peroxisome, as a cell compartment, englobes concomitantly both oxidase enzymes, generating ROS, and a set of enzymes able to metabolize H₂O₂ and other ROS species (Fransen et Lismont 2018). Among peroxisomal functions, the β -oxidation of very-long-chain fatty acids (VLCFA) is a critical pathway in the whole lipid metabolism. Indeed, VLCFA thioesters cross the peroxisomal membrane through ABC transporters called ABCD1 or ABCD2. Then, these fatty acyl-CoAs are handled by acyl-CoA oxidase 1 (ACOX1), the first and rate-limiting enzyme of peroxisomal β -oxidation. This reaction generates an enoyl-CoA and a hydrogen peroxide (H₂O₂) molecule, which is degraded by the peroxisomal catalase (Vamecq et al. 2018). In addition, peroxisome contains a set of other ROS-scavenging enzymes, including epoxide hydrolase, glutathione peroxidase, peroxiredoxin I, peroxisomal membrane protein 20, and Cu-Zn superoxide dismutase (SOD) (Schrader et Fahimi 2006b; Fransen et al. 2012). Importantly, the counterweight between peroxisomal β -oxidation and antioxidative activities notably contributes to cellular ROS homeostasis. Deficit affecting the peroxisome biogenesis or the specific peroxisomal activities may be linked with progressive neuronal demyelination, leading to the development of peroxisomal neurodegenerative diseases (Tawbeh, Gondcaille, et Trompier 2021; Uzor, McCullough, et Tsvetkov 2020). Several leukodystrophies are associated with the defect in the peroxisomal β -oxidation system, including a deficiency in VLCFA degradation. Accordingly, the defect in ABCD1 peroxisomal VLCFA transport is linked to X-linked adrenoleukodystrophy. The absence of fatty acyl-CoA β -oxidation is associated with ACOX1 deficiency disorder (Vamecq et al. 2018; Tawbeh, Gondcaille, et Trompier 2021). On the other hand, in rat liver, LPS exposure disturbs both fatty acid and phospholipid distribution in

the peroxisomal membrane, as well as peroxisomal proteins expression (M. Khan, Contreras, et Singh 2000). Moreover, in rat C6 glial cells, LPS fully repressed ACOX1 expression and the oxidation of VLCFAs (M. Khan, Contreras, et Singh 2000). In addition, our group has shown the decreased expression of genes involved in hepatic peroxisomal fatty acid oxidation in LPS-treated mice (El Kamouni et al. 2017).

We and other research teams have reported the chemical composition of cactus seed oil (CSO), which contains 62% linoleic acid (OO: 9.95% and CO: 19%), 21% oleic acid (OO: 76% and CO: 63%), and 12% palmitic acid (OO: 9% and CO: 4.5%), as particular fatty acids; 75.6 (mg/100 g oil) β -sitosterol (OO: 85 and CO: 44.5 mg/100 g oil), as a main phytosterol; and 68.4% γ -tocopherols (OO: 4.6% and CO: 69%) as major vitamin E components (Al-Naqeb et al. 2021; Chougui et al. 2013b; Nounah et al. 2020b; Ennouri et al. 2006b; El Kharrassi et al. 2018; Berraouan et al. 2014b; Kadda et al. 2022). The analysis of CSO by Chougui et al. (Chougui et al. 2013b) has shown a highest content of polyphenols, flavonoids, and tannins in CSO than in the cactus fruit pulp. Furthermore, a recent detailed chemical analysis by Nounah et al. (Nounah et al. 2020b) revealed the presence of a large amount of phenolic compounds in CSO, which are known for their antioxidant and anti-inflammatory properties (Schaffer et al. 2005; Enza Maria Galati et al. 2003b). Like CSO, cactus peel oil is also enriched in essential fatty acids and liposoluble antioxidants (Enza Maria Galati et al. 2003b). Moreover, alkaloids, indicaxanthin, and various polyphenols and flavonoids have also been isolated from the cactus (Butera et al. 2002), as well as polysaccharides that are abundant in cladode extracts, harboring antidiabetic and antiglycation properties (Enza Maria Galati et al. 2003b). Our interest in CSO and argan oil revealed that two of their phytosterols (i.e., schottenol and spinasterol) activate the gene expression of two nuclear receptors, liver X receptors (LXR) α and β , and their target genes ABCA1 and ABCG1. This suggests that these two phytosterols play a protective role by modulating cholesterol metabolism in an LXR-dependent manner (El Kharrassi et al. 2014a). On the other hand, several reports have documented the health benefit of cactus *Ofi* compounds, showing their anticancer (E. M. Galati et al. 2005), antioxidant (Enza Maria Galati et al. 2003b; Dok-Go et al. 2003b; Stintzing et Carle 2005), antiproliferative (Naselli et al. 2014), antiulcerogenic (Enza Maria Galati et al. 2003b), hepatoprotective (D. Brahmi et al. 2011; Madrigal-Santillán et al. 2014; J. W. Kim et al. 2017; Abbas et al. 2022), and neuroprotective (Dok-Go et al. 2003b; F. E. Saih et al. 2017; Gambino et al. 2018; J.-H. Kim et al. 2006b) effects.

Investigation on the protective effect of CSO on the brain and liver dysfunctions during sepsis has not been evaluated yet. Here, we investigate the short-term effect of LPS on brain and liver peroxisomal functions and inflammatory status in mice. The potential protective effect of CSO against LPS was compared to two common edible oils from olive (OO) and colza (CO). Furthermore, OO is well used in the Mediterranean diet, while CO is the most consumed oil in Europe [23]. The antioxidant capacity in the brain and liver was assessed by measuring the expression of proinflammatory genes as well as of the peroxisomal functions, including the fatty acid β -oxidation and antioxidants enzymes.

2. Results

In the present work, we attempted to evaluate the protective effect of CSO on the brain and liver in a short-term 4 h post-LPS injection. The effects of CSO and two other standard edible oils, olive and colza, on peroxisomal antioxidative and β -oxidative functions and cellular inflammation markers in both brain and liver were compared. Two groups of mice received each for 28 days a standard chow supplemented or not with 6% (*w/w*) of one of the three compared oils (CSO, OO, or CO). Four hours before euthanasia, mice from the first group received an injection of 100 μ g LPS via tail vein, while the control group received instead, an injection of PBS.

2.1. Inflammatory Biomarkers

The transcript levels of the proinflammatory marker IL-1 β were evaluated in the brain and the liver (Figure 1A,D). Of note, in both brain and liver tissues the basal expression level of IL-1 β was not affected by any oil treatment alone (Figure 1A,D), while the LPS treatment increased significantly both brain and liver IL-1 β mRNA levels (Figure 1A,D). This LPS transcriptional response was partially attenuated by OO or CO pretreatment (Figure 1A,D). However, the CSO pretreatment had an attenuating effect only in the brain of LPS-treated mice, but not in the liver (Figure 1A,D). At the protein level, IL-1 β was largely induced by LPS in the brain and the liver (Figure 2A,C). However, the processing of the pro-IL-1 β form (33 kDa) to its active forms (28 and 17 kDa) was detectable only in the liver (Figure 2C). Thus, CSO treatment showed significant attenuated hepatic levels of pro-IL-1 β and its processed active forms (Figure 2C,D). iNos gene expression was shown to be upregulated in an IL-1 β -dependent manner (S. J. Burke et al. 2013). CSO administration had an opposite effect on iNos expression between the brain and liver, showing a tendency to decrease brain iNos expression and a significant increase in the hepatic iNos mRNA level (Figure 1B,E). The OO treatment resulted in a significant downregulation of iNos transcript levels only in the brain (Figure 1B,E). LPS induced the iNos mRNA expression in the liver and at a lesser extent in the brain. Nonetheless, only CSO or OO pretreatment was able to abrogate, specifically in the brain, this LPS-dependent induction (Figure 1B,E). The brain and liver iNOS protein expression showed no significant variations regarding LPS and/or oils treatments (Figure 3A–D). With respect to oil treatments, we did not observe the modification of IL-6 expression in the brain (Figure 1C). However, we noticed a slight but significant increase of IL-6 mRNA level in the liver upon OO or CO treatment (Figure 1F). Our data showed that CSO treatment regulated the expression of IL-1 β , iNos, and IL-6 in a tissue-dependent manner.

On the other hand, the expression of the anti-inflammatory IL-10 and IL-4 genes has been evaluated. Only the IL-10 mRNA expression has been strongly induced by LPS in the brain and the liver tissues (Figure 4A,C). Both OO or CO supplementation showed an opposite effect, inducing IL-10 and decreasing IL-4 mRNA levels in the brain (Figure 4A,B), while CSO treatment induced only the brain IL-4 expression (Figure 4B). CSO (as OO or CO) attenuated specifically the LPS-dependent induction of IL-10 gene expression in the brain and the liver (Figure 4A,C).

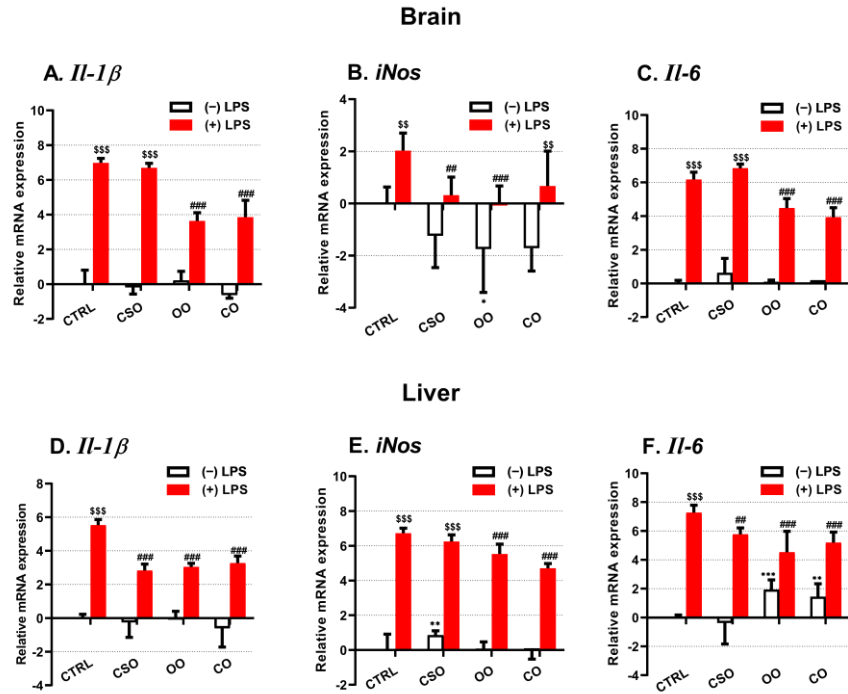


Figure 1. Effect of cactus seed oil, olive oil, or colza oil treatment on gene expression of the proinflammatory markers *Il-1β* (A,D), *iNos* (B,E), and *Il-6* (C,F), in the brain and liver, respectively. Male C57BL/6 mice received for 28 days a standard diet (control (CTRL)), a diet enriched with 6% (*w/w*) CSO, OO, or CO, and intravenous injection of LPS (100 μ g) four hours antemortem. First, total RNA was isolated from mice brains or livers, and then the expression level of genes of interest was quantified by real-time RT-qPCR. All values are means \pm SD ($n = 4-6$), statistical significance of higher mean signal (***) $p \leq 0.001$, ** $p \leq 0.01$, * $p \leq 0.05$ compared to control, (###) $p \leq 0.01$, ## $p \leq 0.01$ compared to LPS, and (\$\$\$) $p \leq 0.001$, \$\$ $p \leq 0.01$ compared to the different treatments with or without LPS administration. Statistics were executed using two-way ANOVA followed by Tukey test for multiple comparisons.

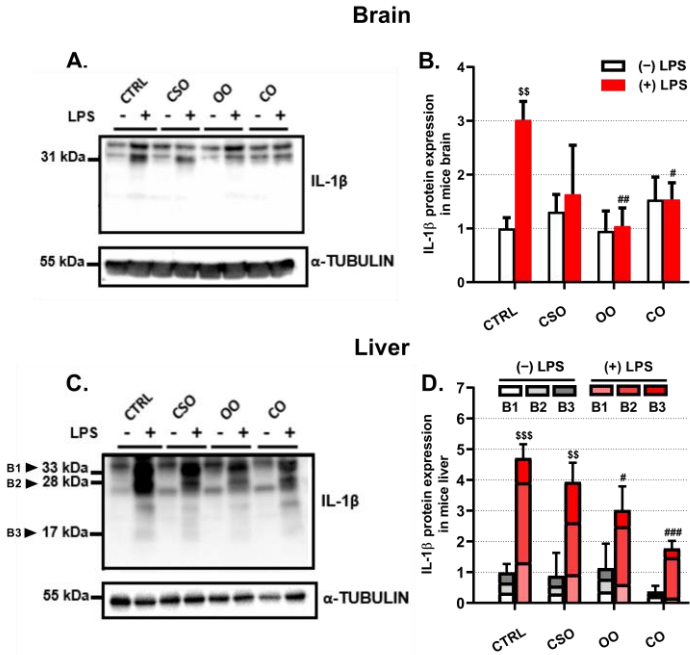


Figure 2. Effect of cactus seed oil, olive oil, or colza oil treatment on protein expression of the proinflammatory marker IL-1 β (A–D), in the brain (A,B) and liver (C,D), respectively. Male C57BL/6 mice received for 28 days a standard diet (control (CTRL)), a diet enriched with 6% (*w/w*) CSO, OO, or CO, and intravenous injection of LPS (100 μ g) four hours antemortem. Brain and liver homogenates were separated in PAGE-SDS electrophoresis and subjected to immunoblotting as described in Material and Methods section. Immunoblots were performed in triplicate and here we showed a representative blot. The three processed IL-1 β bands (B1: 33 kDa; B2: 28 kDa; B3:17 kDa) intensities were analyzed by densitometry and standardized to α -tubulin (55 kDa) expression level in brain (B) and in liver (D). All values are means \pm SD ($n = 3$) of 3 independent replicates. Statistical significance of higher mean signal strength compared to control, (### $p \leq 0.01$, ## $p \leq 0.01$) compared to LPS, and (\$\$\$ $p \leq 0.001$, \$\$ $p \leq 0.01$) compared to the different treatments with or without LPS administration. Statistics were executed using two-way ANOVA followed by Tukey test for multiple comparisons.

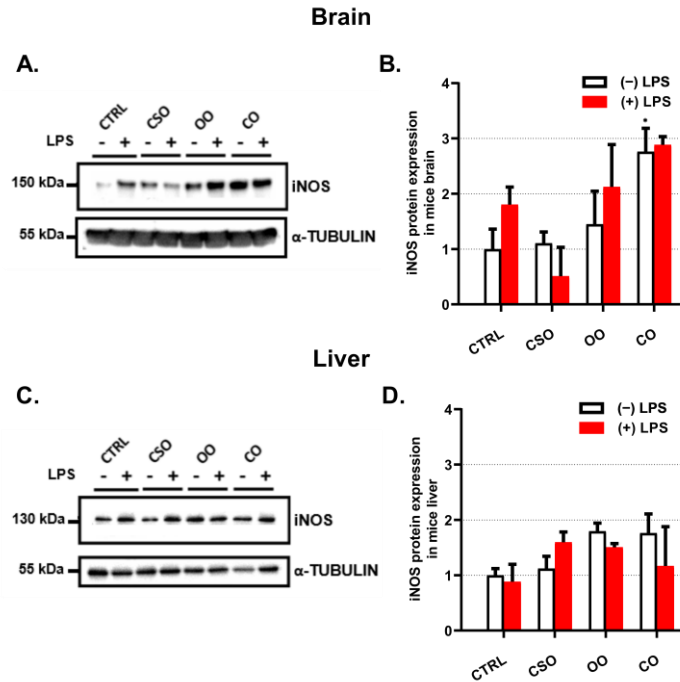


Figure 3. Effect of cactus seed oil, olive oil, or colza oil treatment on protein expression of the iNOS in the brain (A) and liver (C), respectively. Male C57BL/6 mice received for 28 days a standard diet (control (CTRL)), a diet enriched with 6% (*w/w*) CSO, OO, or CO, and intravenous injection of LPS (100 μ g) four hours antemortem. Brain and liver homogenates were separated in PAGE-SDS electrophoresis and subjected to immunoblotting as described in Material and Methods section. Immunoblots were performed in triplicate and here we showed a representative blot. The iNOS 130 kDa band intensities were analyzed by densitometry and standardized to α -tubulin (55 kDa) expression level in brain (B) and in liver (D). All values are means \pm SD ($n = 3$) of 3 independent replicates. Statistical significance of higher mean signal strength ($* p \leq 0.05$) compared to control, compared to LPS, and compared to the different treatments with or without LPS administration. Statistics were executed using two-way ANOVA followed by Tukey test for multiple comparisons.

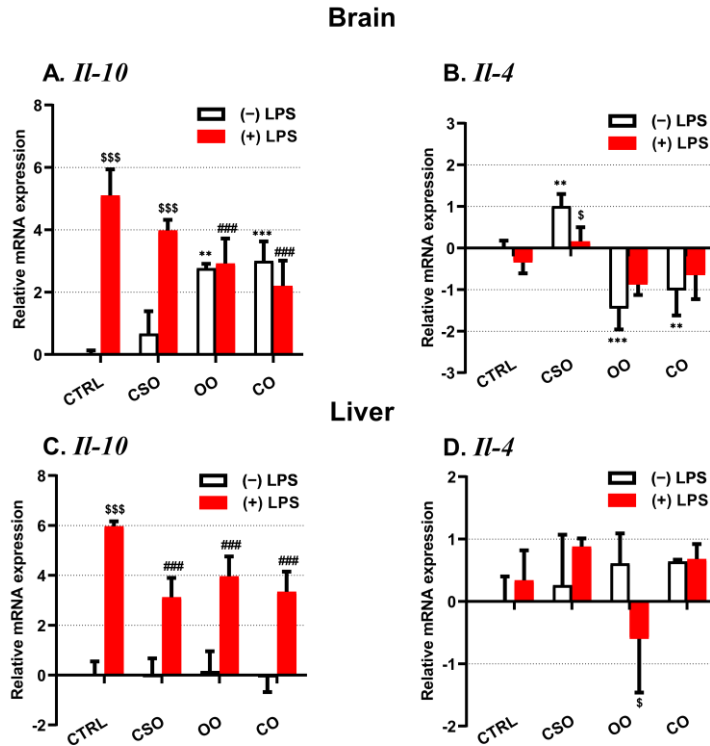


Figure 4. Effect of cactus seed oil, olive oil, or colza oil treatment on gene expression of the anti-inflammatory markers Il-10 (A,C) and Il-4 (B,D), in the brain and liver, respectively. Male C57BL/6 mice received for 28 days a standard diet (control (CTRL)), a diet enriched with 6% (*w/w*) CSO, OO, or CO, and intravenous injection of LPS (100 μ g) four hours antemortem. First, total RNA was isolated from mice brains or livers, and then the expression level of genes of interest was quantified by real-time RT-qPCR. All values are means \pm SD ($n = 4-6$), statistical significance of higher mean signal (** $p \leq 0.001$. ** $p \leq 0.01$) compared to control, (### $p \leq 0.01$. # $p \leq 0.05$) compared to LPS, and (\$\$\$ $p \leq 0.001$. \$ $p \leq 0.05$) compared to the different treatments with or without LPS administration. Statistics were executed using two-way ANOVA followed by Tukey test for multiple comparisons.

2.2. Brain and Liver Gene Expression of Peroxisomal Protein-Encoding Genes

Next, we evaluated LPS and oil treatment effects on the expression of three peroxisomal genes encoding ACOX1, CAT, and SOD1. The brain Acox1 mRNA expression did not show significant changes after CSO administration alone, while a significant decrease was observed following OO or CO treatment (Figure 5A). The short-term LPS injection had no effect on the brain Acox1 mRNA expression. However, in the CSO-LPS or CO-LPS treated mice, the level of brain Acox1 transcripts was significantly decreased (Figure 5A). In the liver, only CO treatment revealed a significant downregulation of Acox1 mRNA (Figure 5D). In response to LPS administration, the liver Acox1 mRNA level was significantly diminished in the LPS group compared with the control group (Figure 5D). Either CSO or CO pretreatment showed a protective effect against LPS injection in the liver (Figure 2D).

In the brain, Cat mRNA expression was not changed by any oil treatment in the absence or presence of LPS administration, excluding CO-LPS, which showed a significant decreasing level (Figure 5B). However, in

the liver, a significant increase was shown in CSO-treated mice, or after treatment with OO or CO. As in the brain, LPS administration had no effect on Cat mRNA expression, while OO- or CO-pretreated mice receiving LPS revealed a downregulation of Cat mRNA level (Figure 5E). The brain Sod1 mRNA level was not induced by LPS injection, and no other changes were noted in all oil-pretreated mice receiving LPS or not (Figure 5C). However, in the liver, only OO treatment showed a significant decrease in Sod1 transcripts level, while LPS-induced expression of Sod1 was attenuated by CSO, OO, or CO pretreatment (Figure 5F).

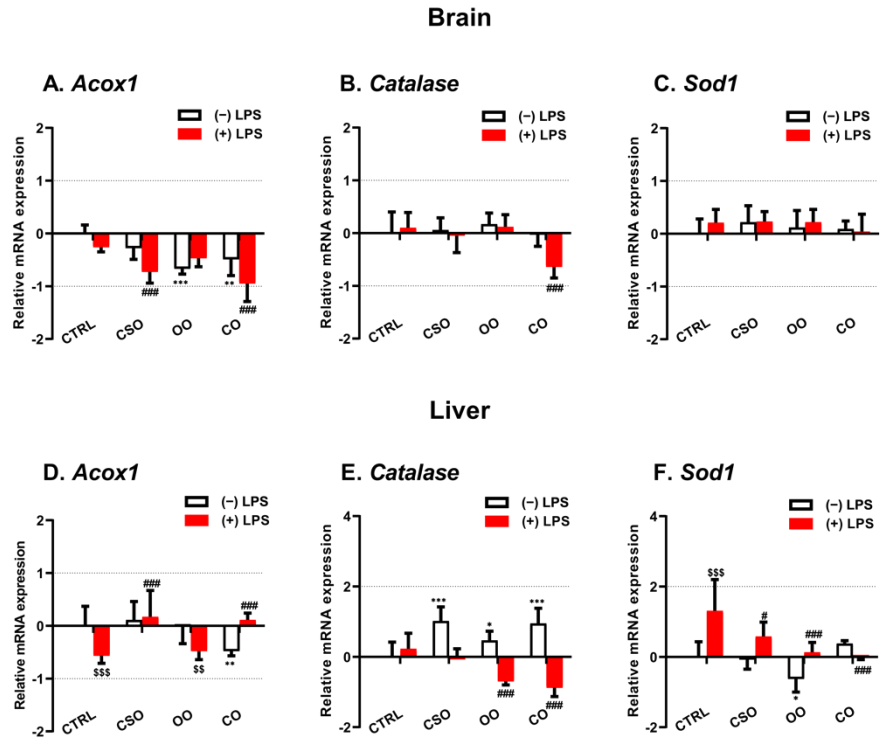


Figure 5. Effect of cactus seed oil, olive oil, or colza oil treatment on gene expression of Acox1 (A,D), Cat (B,E), and Sod1 (C,F) in brain and liver, respectively. Male C57BL/6 mice received for 28 days a standard diet (control (CTRL)), a diet enriched with 6% (*w/w*) CSO, OO, or CO, and intravenous injection of LPS (100 µg) four hours antemortem. First, total RNA was isolated from mice brains and livers, and then the expression level of genes of interest was quantified by real-time RT-qPCR. All values are means ± SD (n = 3), statistical significance of higher mean signal (***) $p \leq 0.001$. ** $p \leq 0.01$. * $p \leq 0.05$ compared to control, (### $p \leq 0.01$, # $p \leq 0.05$) compared to LPS, and (\$\$\$ $p \leq 0.001$) compared to the different treatments with or without LPS administration. Statistics were executed using two-way ANOVA followed by Tukey test for multiple comparisons.

2.3. Brain and Liver Expressions of Peroxisomal Proteins

ACOX1 is the first rate-limiting enzyme of peroxisomal fatty acyl-CoA β-oxidation, which produces enoyl-CoA and H₂O₂ as by-product of this reaction. CAT is a major peroxisomal protein, which degrades hydrogen peroxide. ACOX1 and CAT protein contents were assessed by immunoblotting.

2.3.1. Catalase Protein Expression

In the brain, CAT protein levels showed no significant change after oil treatment or LPS administration. However, CO pretreatment in the absence or the presence of LPS diminished the catalase content (Figure 6A,B). Remarkably, in the liver, OO treatment induced significantly hepatic CAT levels (Figure 6C,D), while the CAT amount was reduced by LPS administration (Figure 6C,D).

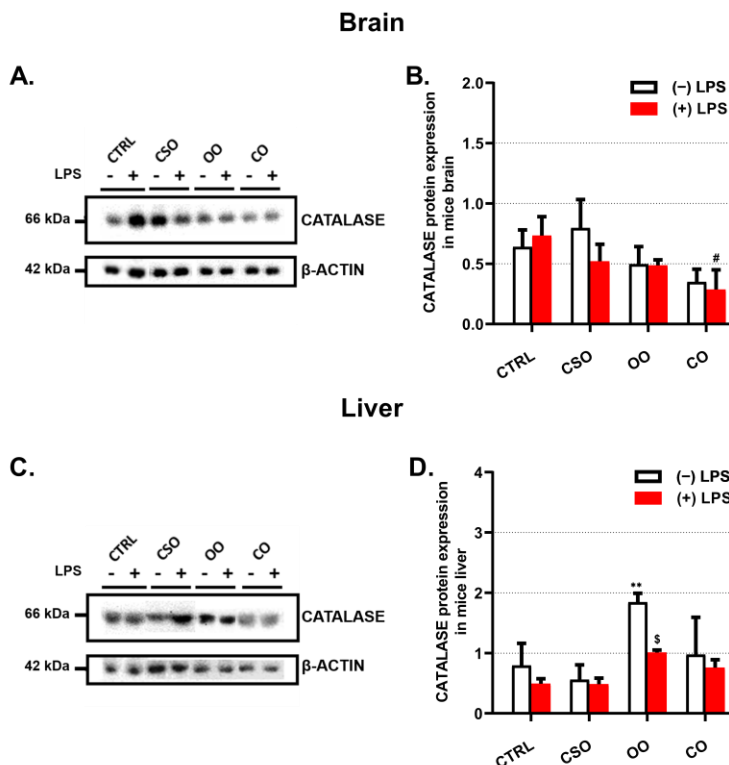


Figure 6. Effect of cactus seed oil, olive oil, or colza oil treatment on the expression of peroxisomal CAT in brain (A) and in liver (C). Male C57BL/6 mice received for 28 days a standard diet (control (CTRL)), a diet enriched with 6% (*w/w*) CSO, OO, or CO, and intravenous injection of LPS (100 μ g) four hours antemortem. Brain and liver homogenates were separated in PAGE-SDS electrophoresis and subjected to immunoblotting as described in Material and Methods section. Immunoblots were performed in triplicate and here we showed a representative blot. The CAT 66 kDa band intensities were analyzed by densitometry and standardized to β -actine (42 kDa) expression level in brain (B) and in liver (D). All values are means \pm SD ($n = 3$) of 6 independent replicates for CTRL, LPS, CSO, and CSO+LPS, and 3 replicates for OO, OO+LPS, CO, and CO+LPS; statistical significance of higher mean signal strength (** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$) compared to control, (# $p \leq 0.05$) compared to LPS, and (\$ $p \leq 0.05$) compared to the different treatments with or without LPS administration. Statistics were executed using two-way ANOVA followed by Tukey test for multiple comparisons.

2.3.2. ACOX1 Protein Expression

ACOX1, a 72 kDa polypeptide, is imported into peroxisomes and incompletely processed into 51 and 21 kDa protein products. ACOX1 functions as a dimer, composed of only 72 kDa polypeptides or a combination

of 72, 51, and 21 kDa polypeptides (D. Oaxaca-Castillo et al. 2007). Regarding the brain tissue, LPS showed a non-significant decrease in the expression of ACOX1 content, while the CSO pretreatment restored the expression of ACOX1 to the same level as the control one (Figure 7A,B). Neither OO nor CO significantly changed the content of brain ACOX1 when compared to the control (Figure 7A,B). On the other hand, the hepatic ACOX1 level was reduced by LPS as well as by CSO treatment alone (Figure 7C,D).

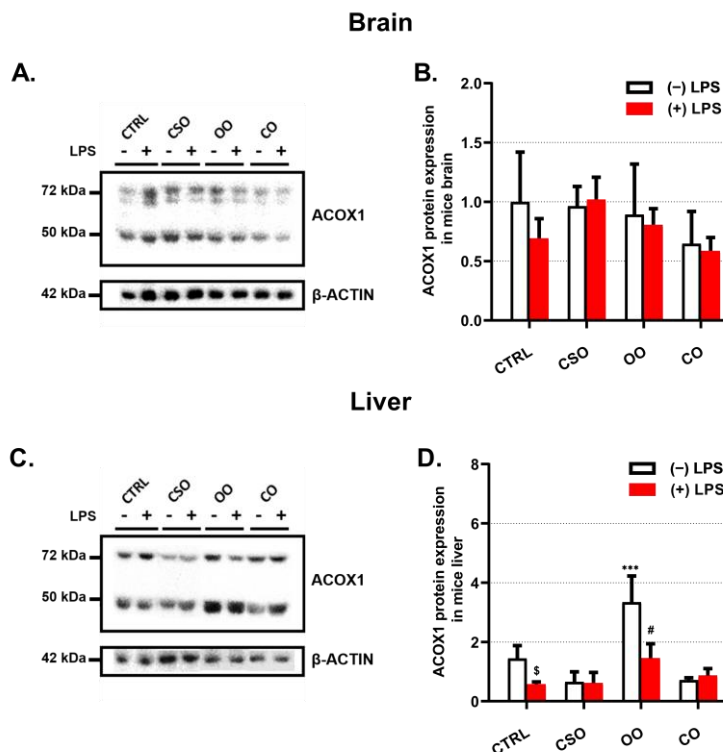


Figure 7. Effect of cactus seed oil, olive oil, or colza oil treatment on the expression of peroxisomal ACOX1 in brain (A) and in liver (C). Male C57BL/6 mice received for 28 days a standard diet (control (CTRL)), a diet enriched with 6% (*w/w*) CSO, OO, or CO, and intravenous injection of LPS (100 μ g) four hours antemortem. Brain and liver homogenates were separated in PAGE-SDS electrophoresis and subjected to immunoblotting as described in Material and Methods section. Immunoblots were performed in triplicate and here we showed a representative blot. The ACOX1 72 and 52 kDa band intensities were analyzed by densitometry and standardized to β -actine (42 kDa) expression level in brain (B) and in liver (D). All values are means \pm SD ($n = 3$) of 6 independent replicates for CTRL, LPS, CSO, and CSO+LPS, and 3 replicates for OO, OO+LPS, CO, and CO+LPS; statistical significance of higher mean signal strength (***) $p \leq 0.001$ compared to control, (# $p \leq 0.05$) compared to LPS, and (\$) $p \leq 0.05$ compared to the different treatments with or without LPS administration. Statistics were executed using two-way ANOVA followed by Tukey test for multiple comparisons.

As for CAT, OO treatment increased liver ACOX1 content and similarly in OO-LPS mice when compared to their corresponding controls (Figure 7C,D).

2.4. Brain and Liver Peroxisomal Enzymes Activities

The catalytic activities of two peroxisomal antioxidant enzymes, GPx and CAT, were measured in both the brain and liver from the different groups of mice. In both brain and liver tissues, LPS had no effect on the GPx activity level, while pretreatment with CSO reduced GPx activity in LPS-CSO mice (Figure 8A,C). Similar results were obtained with OO or CO pretreatment in the mice brain (Figure 8A). Interestingly, in the brain, the CAT activity was increased whatever the oil treatment. LPS significantly increased the activity of CAT and pretreatment with oil did not change the LPS effect (Figure 8B). By contrast, in the liver, LPS induced catalase activity (Figure 8D). The administration of LPS to oil-pretreated mice did not attenuate the induced CAT activity, when compared to the LPS-treated control. However, CSO pretreatment significantly increased the hepatic CAT activity (Figure 8D). Despite the sensitivity of the fluorometric method, the ACOX1 enzymatic activity measurement in brain homogenates was below the detectable threshold. Nonetheless, the measurements of liver ACOX1 activity reveal a negative effect of LPS administration (Figure 8E). Neither CSO or OO oil was able to significantly affect the level of hepatic ACOX1 activity, except CO oil treatment that reduced the activity level of ACOX1. By contrast, when mice were pretreated with CSO, OO, or CO, we observed almost a restoration of ACOX1 activity to its control level (Figure 5E), suggesting that CSO oil possesses similar properties as olive oil.

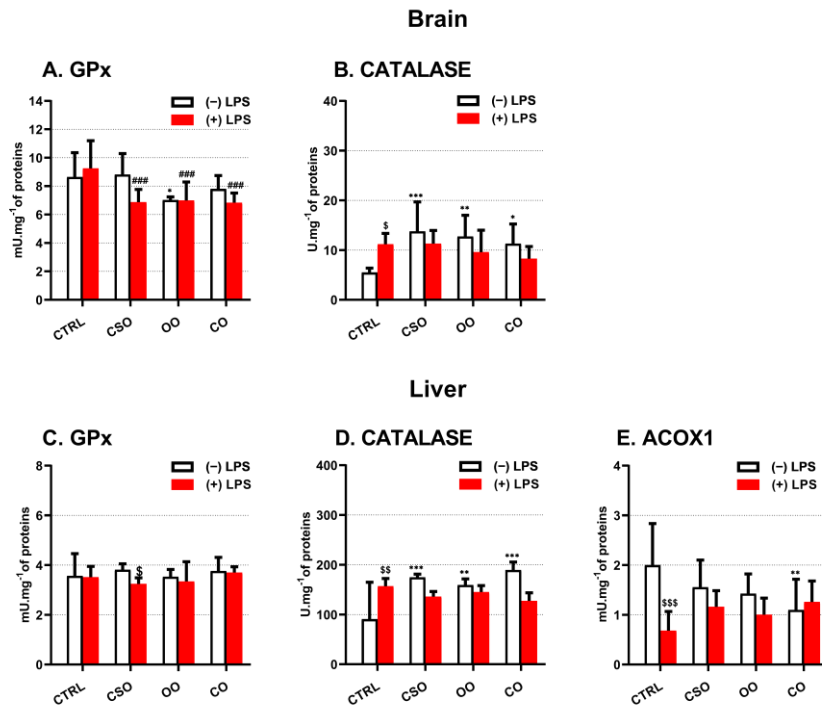


Figure 8. Effect of cactus seed oil, olive oil, or colza oil treatment on the peroxisomal enzymes activities of brain and liver GPx (A,C) and CAT (B,D), respectively, and on liver ACOX1 (E). C57BL/6 mice received for 28 days a standard diet (control (CTRL)), a diet enriched with 6% (*w/w*) CSO, OO, or CO, and intravenous injection of LPS (100 μ g) four hours antemortem. Brain and liver homogenates were prepared as described in Material and methods section. Results are expressed in (U \cdot mg⁻¹ = one μ mol of substrate transformed/minute/mg of proteins). All values are means \pm SD (n = 6),

statistical significance of higher mean signal strength (** $p \leq 0.001$. ** $p \leq 0.01$. * $p \leq 0.05$) compared to control, (### $p \leq 0.01$) compared to LPS, and (\$\$\$ $p \leq 0.001$ and \$\$\$ $p \leq 0.01$, \$ $p \leq 0.05$) compared to the different treatments with or without LPS administration. Statistics were executed using two-way ANOVA followed by Tukey test for multiple comparisons.

3. Discussion

A recent report from the Food and Agriculture Organization of the United Nations highlighted the growing interest across the world in cactus pear (*Opuntia ficus-indica*: Ofi) for its multiple purposes [38]. The interest in Ofi keeps growing not only because of its exceptional adaptation to arid and semi-arid climates in tropical and subtropical regions and its characteristics that provide resilience to restore degraded land, but also because Ofi is now considered as a source of functional foods, which can provide phytochemicals of nutraceutical interest [14,39]. Previous studies have collected compelling evidence of the protective properties of CSO from Ofi and particularly from other *Opuntia* species against chronic diseases such as cancer and diabetes [19,28,40]. However, the potential protective effect of CSO against LPS-induced peroxisome dysfunction and inflammation in brain and liver tissues has not been investigated so far. Here, the present study affords evidence that a CSO-supplemented diet has a protective effect against the deleterious endotoxic LPS shock in mouse brain and liver, regarding the inflammatory status and peroxisomal antioxidative and fatty acid β -oxidation pathways.

The evaluation of the inflammatory status after a four-hour LPS injection showed a strong increase in the proinflammatory *Il-1 β* , *iNos*, and *Il-6* gene expressions in both the brain and the liver tissues. In addition, we observed in the liver that the LPS-induced expression of pro-IL-1 β (33 kDa) was processed to its 17 kDa active form. Here, we showed that CSO prevented LPS-induced inflammation with differential responses between brain and liver. In the brain, CSO action reduced only LPS-induced *iNos* gene expression. However, the short treatment by LPS (i.e., 4 h) revealed an absence of significant changes in iNOS protein expression. The iNOS protein expression was reported to be a late event not observed before 12 h of LPS treatment (Xaus et al. 2000). In the liver, CSO treatment attenuated mainly *Il-1 β* and *Il-6* gene expression and proIL-1 β protein expression as well as its processed active forms, particularly the 17 kDa form (Creagh, Conroy, et Martin 2003). Previously, Lee et al. (M. H. Lee et al. 2006) reported that the ethanolic extract of *Ofi var. saboten* stem reduced *iNos* expression in the LPS-activated murine brain microglial BV-2 cell line. In addition, the *Ofi* extract also inhibited the degradation of I κ B- α in BV-2 cells, resulting in a cytoplasmic sequestration of the nuclear factor NF- κ B, which is responsible for *iNos* gene upregulation (M. H. Lee et al. 2006). Furthermore, cactus polysaccharides can prevent NO-synthase induced activity by oxygen and glucose deprivation in rat brain slices (X. Huang et al. 2008). Our results suggest that CSO can also act in vivo against LPS-induced mouse brain *iNos*, possibly by preventing then the microglial-associated neuroinflammation (Raas, Saih, Gondcaille, Trompier, Hamon, Leoni, Caccia, Nasser, Jadot, Menetrier, et al. 2019).

The inhibitory effect of CSO on LPS-induced liver *Il-1 β* and *Il-6* expression is in accordance with data reported by Kang et al. (Kang et al. 2016) and Aboura et al. (Aboura et al. 2017) showing that extracts of *Ofi* seeds or *Ofi* cladode infusion attenuated *Il-1 β* and *Il-6* expressions in high-fat diet-induced hepatic steatosis and inflammation, respectively. Interestingly, a study conducted by Attanzio et al. (Attanzio et al. 2018) in healthy human volunteers receiving a diet supplemented with cactus *Ofi* pear fruit pulp for 28 days revealed a reduction in pro-inflammatory markers, including *Il-1 β* . Furthermore, other in vitro investigations underlined the anti-inflammatory effect of *Ofi* extracts on human chondrocyte (Panico et al. 2007) or murine macrophages (Hwang et Lim 2017).

As reported by Henry et al. (Henry et al. 2009), we showed that both the proinflammatory IL-1b and the anti-inflammatory IL-10 were induced by short-term LPS injection. CSO reduced the LPS-dependent expression of IL-1b (only in the liver) and IL-10. In addition, CSO induced slightly but significantly IL-4 expression in the brain. The IL-10 expression abrogates monocytes/macrophage-derived proinflammatory cytokines (i.e., TNF- α and IL-6) (Fiorentino et al. 1991). Accordingly, PPAR δ and LXRs activations promote the deactivation of macrophage through increasing IL-10 production, resulting in the suppression of inflammation (Chawla 2010). Accordingly, we previously reported that CSO extract can modulate microglial LXRs expression. This may illustrate the benefit related to CSO supplementation, particularly for the brain.

Another marked effect of CSO treatment (as OO or CO treatment) was the induction of the hepatic peroxisomal *Cat* gene. However, either OO or CO pretreatment downregulated *Cat* mRNA expression in the presence of LPS. Venkatesan et al. (Venkatesan et al. 2007) reported that the induction of ROS downregulates catalase expression in mesangial cells through PI3 kinase/Akt signaling via the Forkhead box O1 transcription factor. Intriguingly, in our hands, this negative regulation depends on the concomitant administration of both OO (or CO) and LPS. By contrast, CSO pretreatment prevented such LPS-associated negative effects. On the other hand, the strong LPS induction of the hepatic peroxisomal Cu-Zn superoxide dismutase encoding gene, *Sod1*, was largely abrogated by either CSO, OO, or CO pretreatment. Although SOD represents the only family-enzyme able to specifically transform anion superoxide (O_2^-) into O_2 and H_2O_2 , several enzymes detoxify H_2O_2 , including catalase, glutathione peroxidases, and peroxiredoxins (Lei et al. 2016; Lismont, Revenco, et Fransen 2019). Both *Cat* and *Sod1* genes are controlled transcriptionally by FOXO1 and Nrf2 transcription factors (Gorrini, Harris, et Mak 2013). However, either *Cat* or *Sod1* mRNAs can be targeted by a specific miRNA, which may promote a differential regulation of their gene expressions (Carbonell et Gomes 2020). Paradoxically, we showed that CSO, as well as OO or CO, treatment (or pretreatment in LPS-oil groups) can timely induce catalase activity or prevent its induction by LPS, respectively, in both brain and liver tissues. The modulation of catalase activity can also be explained by the posttranslational modifications of its polypeptide. Accordingly, it has been shown that CAT phosphorylation at Ser167 by protein kinase C delta (Rafikov et al. 2014) or at both Tyr231 and Tyr386 by Abelson tyrosine-protein kinases ABL1 and ABL2 (Cao, Leng, et Kufe 2003)

increases catalase activity, while CAT activity is decreased by nitrosylation of Cys377 (Ghosh et al. 2006) or S-thiolation (Y. Sun et Oberley 1989).

The LPS downregulation of the *Acox1* gene expression was almost similar in brain and liver, respectively. However, either oil treatment alone or in the presence of LPS accentuates such downregulation in the brain. By contrast, CSO and CO pretreatment prevented such LPS-associated *Acox1* decreases in the liver. Of note, we have previously shown that the metabolic context may account for the differential cell response. Additionally, the preventive effect of certain oils, such as argan and olive oils, is dependent on the inflammatory status. LPS treatment leads, in a cytokines-dependent manner, to the increase of oxidative stress, the downregulation of peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) α activity, and peroxisomal dysfunction in developing rat oligodendrocytes (Paintlia et al. 2008). In this context, the N-acetylcysteine, a strong antioxidant, restores PPAR α activation and its peroxisomal target genes (i.e., *Abcd3* and *Acox1*) (Paintlia et al. 2008). A decline in peroxisomal ACOX1 and CAT activities, involved in the β -oxidation and the antioxidative pathways, respectively, has been reported during aging (Vamecq et al. 2018; Périchon et al. 1998). The key role of peroxisomal function in aging, and related inflammation processes, is conserved from single-eukaryotic cells to higher vertebrates such as humans (Di Cara et al. 2019). In addition, peroxisomes have recently been described as pivotal players in the regulation of immune functions and inflammation during development and infection (Di Cara et al. 2019). Thus, preserving peroxisomal functions by CSO supplementation could also protect against inflammation and oxidative stress. The recovery of the *Acox1* gene expression by CSO in LPS-treated mice could be attributed to the remarkable composition of CSO in tocopherols and in PUFA, which are present at high levels in CSO when compared to OO and argan oil (El Kharrassi et al. 2018; El Mannoubi et al. 2009). The *Acox1* induction by PPAR α -dependent PUFA activation has been thoroughly documented (Vamecq et al. 2018; Forman, Chen, et Evans 1997). Accordingly, we have previously demonstrated that argan oil regulates liver fatty acid oxidation pathways through the activation of the nuclear receptors PPAR α , ERR α , and their coactivator, PGC-1 α (El Kebbaj et al. 2015). Interestingly, the LXR nuclear receptors, designed as integrators of metabolic and inflammatory signaling (Zelcer et Tontonoz 2006), can be modulated by CSO phytosterols (El Kharrassi et al. 2014a). Furthermore, sitosterol, the main phytosterol present in CSO or OO, elicited an anti-inflammatory effect through the downregulation of several components of the TLR4 pathway (Valerio et al. 2013).

4. Conclusions

Collectively, in the present study we showed that CSO possesses protective effects against short-term LPS-induced brain and liver metabolic stress by restoring the peroxisomal antioxidant and fatty acid β -oxidation functions. Thus, the CSO hepato-protective response is efficient in the short term (i.e., 4 h) by restoring hepatic peroxisomal antioxidant and β -oxidative capacities. For the first time, we identified that CSO also has a neuroprotective effect against sepsis, maintaining the peroxisomal antioxidant enzyme activities of catalase and GPx. In the future, a combination of lipidomic and transcriptomic analysis would clarify the

metabolic signaling pathways involved in the CSO neuro- and hepatoprotective actions against LPS. Additionally, it would be interesting to explore the potential effects of individual CSO components, such as tocopherol and polyphenol derivatives. This may document the potential beneficial role of CSO in lowering the deleterious effects of sepsis and as a new therapeutic option with less adverse effects than synthetic compounds.

5. Material and Methods

5.1. Chemicals and Reagents

RNeasy Mini kit and QIAzol reagent (Qiagen, Courtaboeuf, France); iScript cDNA Synthesis Kit (Bio-Rad, Marnes-la-Coquette, France); Takyon ROX SYBR 2X MasterMix dTTP blue (UF-RSMT-B0701, Eurogentec, Angers, France); Pierce™ BCA kit (Thermo Fisher Scientific, Illkirch, France). Applied Biosystem Step One QPCR machine (Thermo Fisher Scientific, Illkirch, France), Potter Elvehjem homogenizer (Dominique Dutscher, Issy-les-Moulineaux, France), Anti-ACOX1 (BioPeroxIL laboratory, Dijon, France), and anti-catalase (ab76024, Abcam, Paris, France). SuperSignal™ West Femto Maximum Sensitivity Substrate (ECL) Solutions (Thermo Fisher Scientific, Illkirch, France). Other chemicals were purchased from Sig-ma-Aldrich (Saint-Quentin-Fallavier, France).

5.2. Origin, Extraction, and Composition of Oils

Cactus seed oil preparation: prickly pear fruits were obtained from the Cooperative of Sabbar Rhamna (Skhour Rhamna, Morocco). Seeds and juice were separated by an industrial prickly pear juice extracting machine (Philips Viva HR1832/00, Mumbai, India). Juice was stored for another use at -20°C after measuring its pH, whereas seeds were washed thoroughly with water, air dried, and then used to extract seed oil by using a cold-press machine (Longer machinery, LGYL-80A, Henan, China). CSO, obtained from Driss Mistahi, was stored in the darkness. Olive oil (OO) (*Olea europaea* L. cv. Moroccan picholine) was obtained from the Aklim region, latitude: $34^{\circ}55'45''$ N; longitude: $2^{\circ}26'7''$ W, Berkane, Morocco. Colza oil (CO) (*Brassica napus* subsp. *Napus*) was obtained from a commercial supermarket.

5.3. Mice Treatments

C57BL/6 J male mice (12–16 weeks old) were purchased from Pasteur medical Laboratory in Casablanca, Morocco. Mice were used under the recommendations of the Organization for Economic Co-Operation and Development (OECD). All animal experiments were carried out according to ethical rules of the University of Hassan I and according to the National Institutes of Health guide for the care and use of Laboratory Animals (NIH publication No. 85-23, revised 1985). All mice were housed under light-dark (12 h–12 h) cycles, relative humidity (45–65%), at a temperature of $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$, and fed with standard diet and water ad libitum. Three weeks after acclimatization, the mice were randomly divided to eight groups (5 mice/group), each group receiving for 28 days a standard diet added or not with a vegetal oil: 2 control groups fed with a standard diet; 2 cactus seed oil groups fed with a standard diet supplemented with 6% (*w/w*) CSO; 2 olive oil groups fed with a standard diet supplemented with 6% (*w/w*) OO; and 2 colza

oil groups who received a standard diet supplemented with 6% (*w/w*) CO. We solubilized each oil in acetone (1:4 v/v). This mixture was added to diet pellets and then evaporated overnight. Four hours before euthanasia and during the fed state, one group from the two groups (control (+LPS), AO (AO + LPS); OO (OO + LPS) and CO (CO + LPS)), received an injection (5 mg/kg) via tail vein of 100 µg of LPS from *Escherichia coli* O111:B4 (Sigma, Saint-Quentin-Fallavier, France) prepared in sterile phosphate-buffered saline (PBS), or an equal volume of PBS alone (El Kamouni et al. 2017). The LPS serotype of *Escherichia coli* O111:B4 has been already used in a short-term treatment of C57BL/6 J mice according to other and our previous studies (El Kamouni et al. 2017; El Kebhaj et al. 2015; L. Qin et al. 2007a; Masocha 2009). Brain and liver tissues were harvested immediately after euthanasia and frozen in an ethanol-dry ice bath and stored at -80 °C.

5.4. Measurement of Enzymatic Activities

Catalase and GPx activities were measured as described by Essadek et al. (2022). Peroxisomal acyl-CoA oxidase (ACOX1) activity was estimated by the fluorometric assay using palmitoyl-CoA as a substrate as described previously [43].

5.5. Evaluation of Gene Expression by Quantitative RT-qPCR

We used the RNeasy Mini kit (Qiagen, Courtaboeuf, France) to isolate total RNA from brain and liver tissues by following the manufacturer's instructions. The concentration of total RNA was performed by spectrophotometry at 260 nm using a TrayCell (Hellma, Paris, France). An amount of 100 ng of total RNA was used for the reverse transcription reaction to generate cDNA by the iScript cDNA Synthesis Kit (Bio-Rad). Quantitative PCR analysis for each specific gene was performed in triplicate, using the Takyon ROX SYBR 2X MasterMix dTTP blue (Eurogentec, Angers, France), on an Applied Biosystem Step One QPCR machine (Life Science Technologies, Saint-Aubin, France). The primers sequences are given in Table 1. Cycling conditions were as the following: activation of DNA polymerase at 95 °C for 10 min, followed by 40 cycles of amplification at 95 °C for 15 s, 60 °C for 30 s, and 72 °C for 30 s. A melting curve analysis was performed at the end of each reaction to test the absence of non-specific products. The quantification of gene expression was calculated using cycle threshold (Ct) values and standardized by the 36B4 reference gene. The relative expression of genes was determined by the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method. Results are shown as graphs of relative expression data (fold induction) with fold positive values representing the up-regulation, fold negative values the down-regulation, and 0 as no variation of the expression (Remans et al. 2014).

Table 1. Sequences of the primers used for qPCR.

Gene Name	Primer Sequences
<i>Acox1-F</i>	5'TCGAAGCCAGCGTTACGAG3'
<i>Acox1-R</i>	5'GGTCTGCGATGCCAAATTCC3'
<i>Catalase-F</i>	5'AGCGACCAGATGAAGCAGTG3'

<i>Catalase-R</i>	5'TCCGCTCTCTGTCAAAGTGTG3'
<i>Il-1β-F</i>	5'GAGATTGAGCTGTCTGCTCA 3'
<i>Il-1β-R</i>	5'AAGGAGAACCAAGCAACGAC 3'
<i>Il-4-F</i>	5'CCATATCCACGGATGCGACAA3'
<i>Il-4-R</i>	5'CCTCGTTCAAAATGCCGATGAT3'
<i>Il-6-F</i>	5'GTTCTCTGGAAATCGTGGGA3'
<i>Il-6-R</i>	5'TGTACTCCAGGTAGCTATGG3'
<i>Il-10-F</i>	5'GCTGGACAACATACTGCTAACC3'
<i>Il-10-R</i>	5'CCCAAGTAACCCTTAAAGTCCTG3'
<i>iNos-F</i>	5'CCTAGTCAACTGCAAGAGAA3'
<i>iNos-R</i>	5'TTTCAGGTCACCTTTGGTAGG3'
<i>Sod1-F</i>	5'AACCAGTTGTGTTGTCAGGAC3'
<i>Sod1-R</i>	5'CCACCATGTTTCTTAGAGTGAGG3'
<i>36b4-F</i>	5'CGACCTGGAAGTCCAACACTAC3'
<i>36b4-R</i>	5'ATCTGCTGCATCTGCTTG3'

5.6. Immunoblotting

The lysis of mice tissues (brain or liver) was accomplished in 4% (*w/v*) or 10% (*w/v*) RIPA buffer (50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 150 mM NaCl, 1% NP-40, 0.1% SDS, 0.5% sodium deoxycholate), using a potter Elvehjem homogenizer (Dominique Deutscher, Issy-les-Moulineaux, France). The obtained lysates were centrifuged at 10,000× *g* for 10 min at 4 °C, and the supernatants were used for protein content measurement by the Bicinchoninic Acid Solution (ThermoFisher Scientific, Illkirch-Graffenstaden, France). We diluted fifty µg of proteins (*v/v*) in the loading buffer (125 mM Tris-HCl, pH 6.8, 4% SDS, 20% glycerol, 14% mercaptoethanol, and 0.003% Bromophenol blue) and heated samples at 96 °C for 5 min, then they were separated on a 10% or 12% SDS-PAGE and transferred onto PVDF membrane. The non-specific binding sites were blocked with 5% nonfat milk in TBST (10 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 0.1% Tween 20, pH 8) for 1 h at room temperature. Incubation of the membrane with the primary antibody diluted in 1% milk TBST was performed over-night at 4 °C (anti-catalase, (ab76024, Abcam, Paris, France), dilution 1/2000; anti-β-actin, (A544, Sigma-Aldrich, Saint-Quentin-Fallavier, France), dilution 1/5000; anti-ACOX1 was made by BioPeroxIL laboratory (Dijon, France), dilution 1/200). The membranes were washed 3 times for 10 min in PBST and incubated for 1 h with a secondary appropriate horseradish peroxidase-conjugated antibody diluted in 1% milk TBST (dilution 1/10000) at room temperature. After three washes in TPBS for 10 min, the bands were developed by chemiluminescence using the Supersignal West Femto Maximum Sensitivity Substrate (ThermoFisher Scientific, Illkirch-

Graffenstaden, France) and a Chemidoc XRS+ device (Bio-Rad, Marnes-la-Coquette, France). The Image Lab software (Bio-Rad) was used for quantification.

5.7. Statistics

All experimental values are expressed as the average of mean \pm standard deviation. The error bars presented on the figures correspond to the standard deviation. Statistic significances were calculated by two-way ANOVA and Tukey's multiple comparisons test, with a significance level of $p \leq 0.05$.

Supplementary Materials:

Author Contributions: M.T.-J. designed the experiments and performed the experiments and data analyses. F.-E.S. and R.E.K. participated in mice treatments and enzymatic activity measurements. C.G., N.L., G.L., and S.S. participated in data analysis and discussion. P.A., J.V., M.C.-M., and B.N. designed the experiments, analyzed the data, and wrote the paper. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by the Ministère de l'Enseignement et de la Recherche and the CNRST, Mounia Tahri-Joutey, PhD excellence grant, number: 17UHP2019, Morocco). The Action Intégrée of the Comité Mixte Inter-universitaire Franco-Marocain (n° TBK 19/92 n° Campus France: 41501RJ) from the PHC Toubkal program, Ministère des Affaires Étrangères, the Ministère de l'enseignement et de la Recherche. The authors would like to acknowledge networking support by the COST Action CA 16112 Nu-tRedOx (Personalized Nutrition in aging society: redox control of major age-related diseases), supported by COST (European Cooperation in Science and Technology).

Institutional Review Board Statement: The animal study protocol was approved by the Ethics Committee of the faculty of medicine of Hassan II University (14-11-2019) for studies involving animals.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Sharshar, T.; Annane, D.; de la Grandmaison, G.L.; Brouland, J.P.; Hopkinson, N.S.; Françoise, G. The Neuropathology of Septic Shock. *Brain Pathol.* **2004**, *14*, 21–33. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3639.2004.tb00494.x>.
2. Mantzaris, K.; Tsolaki, V.; Zakyntinos, E. Role of Oxidative Stress and Mitochondrial Dysfunction in Sepsis and Potential Therapies. *Oxid. Med. Cell. Longev.* **2017**, *2017*, 5985209. <https://doi.org/10.1155/2017/5985209>.
3. Sriskandan, S.; Altmann, D.M. The Immunology of Sepsis. *J. Pathol.* **2008**, *214*, 211–223. <https://doi.org/10.1002/path.2274>.
4. Spolarics, Z. Endotoxemia, Pentose Cycle, and the Oxidant/Antioxidant Balance in the Hepatic Sinusoid. *J. Leukoc. Biol.* **1998**, *63*, 534–541. <https://doi.org/10.1002/jlb.63.5.534>.
5. Fransen, M.; Lismont, C. Peroxisomes and Cellular Oxidant/Antioxidant Balance: Protein Redox Modifications and Impact on Inter-Organelle Communication. *Subcell Biochem.* **2018**, *89*, 435–461. https://doi.org/10.1007/978-981-13-2233-4_19.
6. Sweeney, M.D.; Zhao, Z.; Montagne, A.; Nelson, A.R.; Zlokovic, B.V. Blood-Brain Barrier: From Physiology to Disease and Back. *Physiol. Rev.* **2019**, *99*, 21–78. <https://doi.org/10.1152/physrev.00050.2017>.
7. Nishioku, T.; Dohgu, S.; Takata, F.; Eto, T.; Ishikawa, N.; Kodama, K.B.; Nakagawa, S.; Yamauchi, A.; Kataoka, Y. Detachment of Brain Pericytes from the Basal Lamina Is Involved in Disruption of the Blood-Brain Barrier Caused by Lipopolysaccharide-Induced Sepsis in Mice. *Cell. Mol. Neurobiol.* **2009**, *29*, 309–316. <https://doi.org/10.1007/s10571-008-9322-x>.
8. Cheng, X.; Yang, Y.-L.; Yang, H.; Wang, Y.-H.; Du, G.-H. Kaempferol Alleviates LPS-Induced Neuroinflammation and BBB Dysfunction in Mice via Inhibiting HMGB1 Release and Down-Regulating TLR4/MyD88 Pathway. *Int. Immunopharmacol.* **2018**, *56*, 29–35. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2018.01.002>.
9. Quan, N.; Banks, W.A. Brain-Immune Communication Pathways. *Brain Behav. Immun.* **2007**, *21*, 727–735. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2007.05.005>.
10. Peng, X.; Luo, Z.; He, S.; Zhang, L.; Li, Y. Blood-Brain Barrier Disruption by Lipopolysaccharide and Sepsis-Associated Encephalopathy. *Front. Cell Infect. Microbiol.* **2021**, *11*, 768108. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2021.768108>.

11. Vamecq, J.; Andreoletti, P.; El Kebbjaj, R.; Saih, F.-E.; Latruffe, N.; El Kebbjaj, M.H.S.; Lizard, G.; Nasser, B.; Cherkaoui-Malki, M. 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. *Oxid. Med. Cell. Longev.* **2018**, *2018*, 6986984. <https://doi.org/10.1155/2018/6986984>.
12. Ghzaïel, I.; Zarrouk, A.; Nury, T.; Libergoli, M.; Florio, F.; Hammouda, S.; Ménétrier, F.; Avoscan, L.; Yammine, A.; Samadi, M.; et al. Antioxidant Properties and Cytoprotective Effect of Pistacia Lentiscus L. Seed Oil against 7 β -Hydroxycholesterol-Induced Toxicity in C2C12 Myoblasts: Reduction in Oxidative Stress, Mitochondrial and Peroxisomal Dysfunctions and Attenuation of Cell Death. *Antioxidants* **2021**, *10*, 1772. <https://doi.org/10.3390/antiox10111772>.
13. Schrader, M.; Fahimi, H.D. Peroxisomes and Oxidative Stress. *Biochim. Biophys. Acta* **2006**, *1763*, 1755–1766. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2006.09.006>.
14. Fransen, M.; Nordgren, M.; Wang, B.; Apanasets, O. Role of Peroxisomes in ROS/RNS-Metabolism: Implications for Human Disease. *Biochim. Biophys. Acta* **2012**, *1822*, 1363–1373. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2011.12.001>.
15. Tawbeh, A.; Gondcaille, C.; Trompier, D. Peroxisomal ABC Transporters: An Update. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, 6093. <https://doi.org/10.3390/ijms22116093>.
16. Uzor, N.-E.; McCullough, L.D.; Tsvetkov, A.S. Peroxisomal Dysfunction in Neurological Diseases and Brain Aging. *Front. Cell. Neurosci.* **2020**, *14*, 44. <https://doi.org/10.3389/fncel.2020.00044>.
17. 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. <https://doi.org/10.1177/09680519000060010601>.
18. El Kamouni, S.; El Kebbjaj, R.; Andreoletti, P.; El Ktaïbi, A.; Rharrassi, I.; Essamadi, A.; El Kebbjaj, M.S.; Mandard, S.; Latruffe, N.; Vamecq, J.; et al. Protective Effect of Argan and Olive Oils against Lps-Induced Oxidative Stress and Inflammation in Mice Livers. *Int. J. Mol. Sci.* **2017**, *18*, 2181. <https://doi.org/10.3390/ijms18102181>.
19. Al-Naqeb, G.; Fiori, L.; Ciolli, M.; Aprea, E. Prickly Pear Seed Oil Extraction, Chemical Characterization and Potential Health Benefits. *Molecules* **2021**, *26*, 5018. <https://doi.org/10.3390/molecules26165018>.
20. Chougui, N.; Tamendjari, A.; Hamidj, W.; Hallal, S.; Barras, A.; Richard, T.; Larbat, R. Oil Composition and Characterisation of Phenolic Compounds of Opuntia Ficus-Indica Seeds. *Food Chem.* **2013**, *139*, 796–803. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.01.054>.
21. Nounah, I.; Chbani, M.; Matthäus, B.; Charrouf, Z.; Hajib, A.; Willenberg, I. Profile of Volatile Aroma-Active Compounds of Cactus Seed Oil (Opuntia Ficus-Indica) from Different Locations in Morocco and Their Fate during Seed Roasting. *Foods* **2020**, *9*, 1280. <https://doi.org/10.3390/foods9091280>.
22. Ennouri, M.; Fetoui, H.; Bourret, E.; Zeghal, N.; Attia, H. Evaluation of Some Biological Parameters of Opuntia Ficus Indica. 1. Influence of a Seed Oil Supplemented Diet on Rats. *Bioresour. Technol.* **2006**, *97*, 1382–1386. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2005.07.010>.
23. El Kharrassi, Y.; Maata, N.; Mazri, M.A.; El Kamouni, S.; Talbi, M.; El Kebbjaj, R.; Moustaid, K.; Essamadi, A.K.; Andreoletti, P.; El Mzouri, E.H.; et al. Chemical and Phytochemical Characterizations of Argan Oil (Argania Spinosa L. Skeels), Olive Oil (Olea Europaea L. Cv. Moroccan Picholine), Cactus Pear (Opuntia Megacantha Salm-Dyck) Seed Oil and Cactus Cladode Essential Oil. *J. Food Meas. Charact.* **2018**, *12*, 747–754. <https://doi.org/10.1007/s11694-017-9688-x>.
24. Berraouan, A.; Ziyat, A.; Mekhfi, H.; Legssyer, A.; Sindic, M.; Aziz, M.; Bnouham, M. Evaluation of Antidiabetic Properties of Cactus Pear Seed Oil in Rats. *Pharm. Biol.* **2014**, *52*, 1286–1290. <https://doi.org/10.3109/13880209.2014.890230>.
25. Kadda, S.; Belabed, A.; Loukili, E.H.; Hammouti, B.; Fadlaoui, S. Temperature and Extraction Methods Effects on Yields, Fatty Acids, and Tocopherols of Prickly Pear (Opuntia Ficus-Indica L.) Seed Oil of Eastern Region of Morocco. *Env. Sci. Pollut. Res. Int.* **2022**, *29*, 158–166. <https://doi.org/10.1007/s11356-021-16752-8>.
26. Schaffer, S.; Schmitt-Schillig, S.; Müller, W.E.; Eckert, G.P. Antioxidant Properties of Mediterranean Food Plant Extracts: Geographical Differences. *J. Physiol. Pharm.* **2005**, *56* Suppl. S1:115–124.
27. Galati, E.M.; Mondello, M.R.; Giuffrida, D.; Dugo, G.; Miceli, N.; Pergolizzi, S.; Taviano, M.F. Chemical Characterization and Biological Effects of Sicilian Opuntia Ficus Indica (L.) Mill. Fruit Juice: Antioxidant and Antiulcerogenic Activity. *J. Agric. Food Chem.* **2003**, *51*, 4903–4908. <https://doi.org/10.1021/jf030123d>.
28. Butera, D.; Tesoriere, L.; Di Gaudio, F.; Bongiorno, A.; Allegra, M.; Pintaudi, A.M.; Kohen, R.; Livrea, M.A. Antioxidant Activities of Sicilian Prickly Pear (Opuntia Ficus Indica) Fruit Extracts and Reducing Properties of Its Betalains: Betanin and Indicaxanthin. *J. Agric. Food Chem.* **2002**, *50*, 6895–6901. <https://doi.org/10.1021/jf025696p>.
29. El Kharrassi, Y.; Samadi, M.; Lopez, T.; Nury, T.; El Kebbjaj, R.; Andreoletti, P.; El Hajj, H.I.; Vamecq, J.; Moustaid, K.; Latruffe, N.; et al. Biological Activities of Schottenol and Spinasterol, Two Natural Phytosterols Present in Argan Oil and in Cactus Pear Seed Oil, on Murine Microglial BV2 Cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2014**, *446*, 798–804. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2014.02.074>.
30. Galati, E.M.; Mondello, M.R.; Lauriano, E.R.; Taviano, M.F.; Galluzzo, M.; Miceli, N. Opuntia Ficus Indica (L.) Mill. Fruit Juice Protects Liver from Carbon Tetrachloride-Induced Injury. *Phytother. Res.* **2005**, *19*, 796–800. <https://doi.org/10.1002/ptr.1741>.
31. Dok-Go, H.; Lee, K.H.; Kim, H.J.; Lee, E.H.; Lee, J.; Song, Y.S.; Lee, Y.-H.; Jin, C.; Lee, Y.S.; Cho, J. Neuroprotective Effects of Antioxidative Flavonoids, Quercetin, (+)-Dihydroquercetin and Quercetin 3-Methyl Ether, Isolated from Opuntia Ficus-Indica Var. Saboten. *Brain Res.* **2003**, *965*, 130–136. [https://doi.org/10.1016/s0006-8993\(02\)04150-1](https://doi.org/10.1016/s0006-8993(02)04150-1).
32. 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. <https://doi.org/10.1002/mnfr.200400071>.

33. Naselli, F.; Tesoriere, L.; Caradonna, F.; Bellavia, D.; Attanzio, A.; Gentile, C.; Livrea, M.A. Anti-Proliferative and pro-Apoptotic Activity of Whole Extract and Isolated Indicaxanthin from *Opuntia Ficus-Indica* Associated with Re-Activation of the Onco-Suppressor P16(INK4a) Gene in Human Colorectal Carcinoma (Caco-2) Cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2014**, *450*, 652–658. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2014.06.029>.
34. Brahmī, D.; Bouaziz, C.; Ayed, Y.; Ben Mansour, H.; Zourgui, L.; Bacha, H. Chemopreventive Effect of Cactus *Opuntia Ficus Indica* on Oxidative Stress and Genotoxicity of Aflatoxin B1. *Nutr. Metab.* **2011**, *8*, 73. <https://doi.org/10.1186/1743-7075-8-73>.
35. Madrigal-Santillán, E.; Madrigal-Bujaidar, E.; Álvarez-González, I.; Sumaya-Martínez, M.T.; Gutiérrez-Salinas, J.; Bautista, M.; Morales-González, Á.; García-Luna y González-Rubio, M.; Aguilar-Faisal, J.L.; Morales-González, J.A. Review of Natural Products with Hepatoprotective Effects. *World J. Gastroenterol.* **2014**, *20*, 14787–14804. <https://doi.org/10.3748/wjg.v20.i40.14787>.
36. Kim, J.W.; Kim, T.B.; Kim, H.W.; Park, S.W.; Kim, H.P.; Sung, S.H. Hepatoprotective Flavonoids in *Opuntia Ficus-Indica* Fruits by Reducing Oxidative Stress in Primary Rat Hepatocytes. *Pharm. Mag.* **2017**, *13*, 472–476. https://doi.org/10.4103/pm.pm_232_16.
37. Abbas, E.Y.; Ezzat, M.I.; El Hefnawy, H.M.; Abdel-Sattar, E. An Overview and Update on the Chemical Composition and Potential Health Benefits of *Opuntia Ficus-Indica* (L.) Miller. *J. Food Biochem.* **2022**, *46*, e14310. <https://doi.org/10.1111/jfbc.14310>.
38. Saih, F.E.; Andreoletti, P.; Mandard, S.; Latruffe, N.; El Kebbj, M.S.; Lizard, G.; Nasser, B.; Cherkaoui-Malki, M. Protective Effect of Cactus Cladode Extracts on Peroxisomal Functions in Microglial BV-2 Cells Activated by Different Lipopolysaccharides. *Molecules* **2017**, *22*, 102. <https://doi.org/ARTN10210.3390/molecules22010102>.
39. Gambino, G.; Allegra, M.; Sardo, P.; Attanzio, A.; Tesoriere, L.; Livrea, M.A.; Ferraro, G.; Carletti, F. Brain Distribution and Modulation of Neuronal Excitability by Indicaxanthin From *Opuntia Ficus Indica* Administered at Nutritionally-Relevant Amounts. *Front. Aging Neurosci.* **2018**, *10*, 133. <https://doi.org/10.3389/fnagi.2018.00133>.
40. 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. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2005.09.017>.
41. Burke, S.J.; Updegraff, B.L.; Bellich, R.M.; Goff, M.R.; Lu, D.; Minkin, S.C.; Karlstad, M.D.; Collier, J.J. Regulation of iNOS Gene Transcription by IL-1 β and IFN- γ Requires a Coactivator Exchange Mechanism. *Mol. Endocrinol.* **2013**, *27*, 1724–1742. <https://doi.org/10.1210/me.2013-1159>.
42. 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. [https://doi.org/S0006-291X\(07\)01215-6](https://doi.org/S0006-291X(07)01215-6) [pii] 10.1016/j.bbrc.2007.06.059.
43. Xaus, J.; Comalada, M.; Valledor, A.F.; Lloberas, J.; López-Soriano, F.; Argilés, J.M.; Bogdan, C.; Celada, A. LPS Induces Apoptosis in Macrophages Mostly through the Autocrine Production of TNF-Alpha. *Blood* **2000**, *95*, 3823–3831.
44. Creagh, E.M.; Conroy, H.; Martin, S.J. Caspase-Activation Pathways in Apoptosis and Immunity. *Immunol. Rev.* **2003**, *193*, 10–21. <https://doi.org/10.1034/j.1600-065x.2003.00048.x>.
45. 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. <https://doi.org/10.1002/ptr.1942>.
46. Huang, X.; Li, Q.; Zhang, Y.; Lü, Q.; Guo, L.; Huang, L.; He, Z. Neuroprotective Effects of Cactus Polysaccharide on Oxygen and Glucose Deprivation Induced Damage in Rat Brain Slices. *Cell. Mol. Neurobiol.* **2008**, *28*, 559–568. <https://doi.org/10.1007/s10571-007-9184-7>.
47. Raas, Q.; Saih, F.E.; Gondcaille, C.; Trompier, D.; Hamon, Y.; Leoni, V.; Caccia, C.; Nasser, B.; Jadot, M.; Menetrier, F.; et al. A Microglial Cell Model for Acyl-CoA Oxidase 1 Deficiency. *Biochim. Biophys. Acta Mol. Cell Biol. Lipids* **2019**, *1864*, 567–576. <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2018.10.005>.
48. Kang, J.-W.; Shin, J.-K.; Koh, E.-J.; Ryu, H.; Kim, H.J.; Lee, S.-M. *Opuntia Ficus-Indica* Seed Attenuates Hepatic Steatosis and Promotes M2 Macrophage Polarization in High-Fat Diet-Fed Mice. *Nutr. Res.* **2016**, *36*, 369–379. <https://doi.org/10.1016/j.nutres.2015.12.007>.
49. Aboura, I.; Nani, A.; Belarbi, M.; Murtaza, B.; Fluckiger, A.; Dumont, A.; Benammar, C.; Tounsi, M.S.; Ghiringhelli, F.; Riolland, M.; et al. Protective Effects of Polyphenol-Rich Infusions from Carob (*Ceratonia Siliqua*) Leaves and Cladodes of *Opuntia Ficus-Indica* against Inflammation Associated with Diet-Induced Obesity and DSS-Induced Colitis in Swiss Mice. *Biomed. Pharm.* **2017**, *96*, 1022–1035. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2017.11.125>.
50. Attanzio, A.; Tesoriere, L.; Vasto, S.; Pintaudi, A.M.; Livrea, M.A.; Allegra, M. Short-Term Cactus Pear [*Opuntia Ficus-Indica* (L.) Mill] Fruit Supplementation Ameliorates the Inflammatory Profile and Is Associated with Improved Antioxidant Status among Healthy Humans. *Food Nutr. Res.* **2018**, *62*. <https://doi.org/10.29219/fnr.v62.1262>.
51. Panico, A.M.; Cardile, V.; Garufi, F.; Puglia, C.; Bonina, F.; Ronsisvalle, S. Effect of Hyaluronic Acid and Polysaccharides from *Opuntia Ficus Indica* (L.) Cladodes on the Metabolism of Human Chondrocyte Cultures. *J. Ethnopharmacol.* **2007**, *111*, 315–321. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2006.11.020>.
52. Hwang, J.-H.; Lim, S.-B. Immunostimulatory Activity of *Opuntia Ficus-Indica* Var. *Saboten* Cladodes Fermented by *Lactobacillus Plantarum* and *Bacillus Subtilis* in RAW 264.7 Macrophages. *J. Med. Food* **2017**, *20*, 131–139. <https://doi.org/10.1089/jmf.2016.3831>.

53. Henry, C.J.; Huang, Y.; Wynne, A.M.; Godbout, J.P. Peripheral Lipopolysaccharide (LPS) Challenge Promotes Microglial Hyperactivity in Aged Mice That Is Associated with Exaggerated Induction of Both pro-Inflammatory IL-1 β and Anti-Inflammatory IL-10 Cytokines. *Brain Behav. Immun.* **2009**, *23*, 309–317. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2008.09.002>.
54. Fiorentino, D.F.; Zlotnik, A.; Mosmann, T.R.; Howard, M.; O'Garra, A. IL-10 Inhibits Cytokine Production by Activated Macrophages. *J. Immunol.* **1991**, *147*, 3815–3822.
55. Chawla, A. Control of Macrophage Activation and Function by PPARs. *Circ. Res.* **2010**, *106*, 1559–1569. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.110.216523>.
56. Venkatesan, B.; Mahimainathan, L.; Das, F.; Ghosh-Choudhury, N.; Ghosh Choudhury, G. Downregulation of Catalase by Reactive Oxygen Species via PI 3 Kinase/Akt Signaling in Mesangial Cells. *J. Cell. Physiol.* **2007**, *211*, 457–467. <https://doi.org/10.1002/jcp.20953>.
57. Lei, X.G.; Zhu, J.-H.; Cheng, W.-H.; Bao, Y.; Ho, Y.-S.; Reddi, A.R.; Holmgren, A.; Arnér, E.S.J. Paradoxical Roles of Antioxidant Enzymes: Basic Mechanisms and Health Implications. *Physiol. Rev.* **2016**, *96*, 307–364. <https://doi.org/10.1152/physrev.00010.2014>.
58. Lismont, C.; Revenco, I.; Franssen, M. Peroxisomal Hydrogen Peroxide Metabolism and Signaling in Health and Disease. *Int. J. Mol. Sci.* **2019**, *20*, E3673. <https://doi.org/10.3390/ijms20153673>.
59. Gorrini, C.; Harris, I.S.; Mak, T.W. Modulation of Oxidative Stress as an Anticancer Strategy. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2013**, *12*, 931–947. <https://doi.org/10.1038/nrd4002>.
60. Carbonell, T.; Gomes, A.V. MicroRNAs in the Regulation of Cellular Redox Status and Its Implications in Myocardial Ischemia-Reperfusion Injury. *Redox Biol.* **2020**, *36*, 101607. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2020.101607>.
61. Rafikov, R.; Kumar, S.; Aggarwal, S.; Hou, Y.; Kangath, A.; Pardo, D.; Fineman, J.R.; Black, S.M. Endothelin-1 Stimulates Catalase Activity through the PKC δ -Mediated Phosphorylation of Serine 167. *Free Radic. Biol. Med.* **2014**, *67*, 255–264. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2013.10.814>.
62. Cao, C.; Leng, Y.; Kufe, D. Catalase Activity Is Regulated by C-Abl and Arg in the Oxidative Stress Response. *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 29667–29675. <https://doi.org/10.1074/jbc.M301292200>.
63. Ghosh, S.; Janocha, A.J.; Aronica, M.A.; Swaidani, S.; Comhair, S.A.A.; Xu, W.; Zheng, L.; Kaveti, S.; Kinter, M.; Hazen, S.L.; et al. Nitrotyrosine Proteome Survey in Asthma Identifies Oxidative Mechanism of Catalase Inactivation. *J. Immunol.* **2006**, *176*, 5587–5597. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.176.9.5587>.
64. Sun, Y.; Oberley, L.W. The Inhibition of Catalase by Glutathione. *Free Radic. Biol. Med.* **1989**, *7*, 595–602. [https://doi.org/10.1016/0891-5849\(89\)90140-8](https://doi.org/10.1016/0891-5849(89)90140-8).
65. 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. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2007.05199.x>.
66. Périchon, R.; Bourre, J.M.; Kelly, J.F.; Roth, G.S. The Role of Peroxisomes in Aging. *Cell. Mol. Life Sci.* **1998**, *54*, 641–652. <https://doi.org/10.1007/s000180050192>.
67. Di Cara, F.; Andreoletti, P.; Trompier, D.; Vejux, A.; Bülow, M.H.; Sellin, J.; Lizard, G.; Cherkaoui-Malki, M.; Savary, S. Peroxisomes in Immune Response and Inflammation. *Int. J. Mol. Sci.* **2019**, *20*, 3877. <https://doi.org/10.3390/ijms20163877>.
68. El Mannoubi, I.; Barrek, S.; Skanji, T.; Casabianca, H.; Zarrouk, H. Characterization of Opuntia Ficus Indica Seed Oil from Tunisia. *Chem. Nat. Compd.* **2009**, *45*, 616–620. <https://doi.org/10.1007/s10600-009-9448-1>.
69. Forman, B.M.; Chen, J.; Evans, R.M. Hypolipidemic Drugs, Polyunsaturated Fatty Acids, and Eicosanoids Are Ligands for Peroxisome Proliferator-Activated Receptors Alpha and Delta. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1997**, *94*, 4312–4317. <https://doi.org/10.1073/pnas.94.9.4312>.
70. 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 α (PGC-1 α), Peroxisome Proliferator-Activated Receptor α (PPAR α) and Estrogen r. *Biochim. Open* **2015**, *1*, 51–59. <https://doi.org/10.1016/j.biopen.2015.10.002>.
71. Zelcer, N.; Tontonoz, P. Liver X Receptors as Integrators of Metabolic and Inflammatory Signaling. *J. Clin. Investig.* **2006**, *116*, 607–614. <https://doi.org/10.1172/JCI27883>.
72. Valerio, M.S.; Minderman, H.; Mace, T.; Awad, A.B. β -Sitosterol Modulates TLR4 Receptor Expression and Intracellular MyD88-Dependent Pathway Activation in J774A.1 Murine Macrophages. *Cell Immunol* **2013**, *285*, 76–83. <https://doi.org/10.1016/j.cellimm.2013.08.007>.
73. Qin, L.; Wu, X.; Block, M.L.; Liu, Y.; Breese, G.R.; Hong, J.-S.; Knapp, D.J.; Crews, F.T. Systemic LPS Causes Chronic Neuroinflammation and Progressive Neurodegeneration. *Glia* **2007**, *55*, 453–462. <https://doi.org/10.1002/glia.20467>.
74. Masocha, W. Systemic Lipopolysaccharide (LPS)-Induced Microglial Activation Results in Different Temporal Reduction of CD200 and CD200 Receptor Gene Expression in the Brain. *J. Neuroimmunol.* **2009**, *214*, 78–82. <https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2009.06.022>.
75. Remans, T.; Keunen, E.; Bex, G.J.; Smeets, K.; Vangronsveld, J.; Cuypers, A. Reliable Gene Expression Analysis by Reverse Transcription-Quantitative PCR: Reporting and Minimizing the Uncertainty in Data Accuracy. *Plant Cell* **2014**, *26*, 3829–3837. <https://doi.org/10.1105/tpc.114.130641>.

vi. *L'effet neuro- et hépato-protecteur de l'huile de graine de cactus contre l'inflammation aigüe et le stress oxydatif induits par LPS dans le cerveau et foie de souris*

La figue de barbarie “*Opuntia sp.*” est consommée sous forme de fruits frais et la plupart des informations trouvées dans la littérature concernent le jus et les cladodes du cactus, mais peu rapportent la valeur nutritive de l'huile de graines de cactus (Ennouri et al. 2006a). La première utilisation du cactus Nopal « *Opuntia* » pour le traitement du diabète pour son pouvoir hypoglycémique a suscité un grand intérêt chez les chercheurs. Et depuis, le cactus fait l'objet de nombreuses études pour tester ces bienfaits et ces propriétés potentiellement thérapeutiques sur la santé humaine (Ibañez-Camacho et Roman-Ramos 1979). Dans une étude conduite par Koubaa et al., (Koubaa et al. 2017), il a été montré que l'huile de graine d'*Opuntia stricta* possède des activités antioxydantes capables d'inhiber la formation du DPPH. Le même résultat a été rapporté par Chaalal et al. (Chaalal, Touati, et Louaileche 2012) suite à l'évaluation de figue de barbarie de l'espèce *Opuntia ficus indica*. Ceci signifierait que l'huile de graine de cactus est un puissant donneur d'électrons et pourrait réagir avec les radicaux libres pour les convertir en produits plus stables. Dans notre étude, nous avons démontré que l'huile de graine de cactus (CSO) peut protéger le foie et le cerveau de souris contre l'inflammation aigüe et le stress oxydatif induit par le LPS. En plus, le travail conduit par Khémiri et al., (Khémiri et Bitri 2019) montre que les acides gras insaturés et les triacylglycérols contenus dans l'huile de graine de cactus contribuent à la reconstruction et la réparation de la bicouche lipidique de la membrane cellulaire de la muqueuse gastrique durant le processus de guérison de l'ulcère gastrique de rat induit par de l'éthanol absolu. Le LPS est une endotoxine bactérienne capable de déclencher une neuroinflammation chronique (L. Qin et al. 2007b) et du stress oxydatif, générant ainsi des espèces réactives d'oxygène associées à la formation des produits de peroxydation lipidique tels que les MDA et l'épuisement des systèmes de défense cellulaire antioxydants enzymatiques et non enzymatiques tels que SOD1, CAT et GPx (Guzmán-Gómez et al. 2018). Suite aux dosages enzymatiques *in vitro* de la catalase, GPx et ACOX1, faites sur les homogénats de foie et de cerveau de souris prétraités avec l'huile de graine de cactus, l'analyse de résultats révèlent le pouvoir de la CSO de restaurer les capacités peroxysomales antioxydantes et de β -oxydation hépatiques et cérébrales. Le potentiel antioxydant

de CSO pourrait être dû à sa richesse en composés bioactifs tels que les polyphénols, l'acide gallique, flavonoïdes, caroténoïdes, chlorophylles et des tocophérols de la vitamine E. En effet, plusieurs études ont attribué les potentiels antioxydants de ces composés contre les effets nocifs des radicaux libres qui induisent des états physiopathologiques tels que les maladies cardiovasculaires et le diabète, ainsi que dans les troubles neurodégénératifs comme les démences et la maladie de Parkinson (Jenner 2003) (Bouic 2001). Vinayaga Moorthi et al., ont trouvé que la vitamine E protège la sensibilité de l'insuline et l'équilibre redox des cellules musculaires de rat exposées au stress oxydatif (Vinayaga Moorthi et al. 2006).

L'inflammation, bien qu'elle soit un mécanisme de défense immunitaire de l'organisme, constitue un élément commun déclencheur de plusieurs maladies inflammatoires (Linlin Chen et al. 2018). Une inflammation persistante et incontrôlée entraîne le développement de plusieurs maladies chroniques (Bennett et al. 2018). Dans notre étude, l'induction de l'inflammation était de court terme grâce à une injection du LPS dans la veine caudale de souris. Banks et Robinson dans une étude faite en 2010, ont montré que l'absorption du LPS par le cerveau est si faible, et que la plupart des effets du LPS administré par voie périphérique sont probablement médiés par les récepteurs du LPS situé à l'extérieur de la barrière hémato-encéphalique. Il y a que 0,025% d'une dose intraveineuse qui arrive à franchir le parenchyme cérébral (Banks et Robinson 2010). Cependant, notre étude montre que 4H après de l'administration de LPS aux souris, entraîne une stimulation importante des voies d'inflammation causant une activation de l'expression des gènes de cytokines pro-inflammatoires tels que l'*Il-1 β* , *Il-6* et *iNos* dans le cerveau et le foie de souris. Le prétraitement avec de la CSO atténue cette activation révélant un pouvoir anti-inflammatoire. L'activité anti-inflammatoire est souvent attribuée aux stérols de plantes et plus particulièrement au β -sitostérol, connu pour son pouvoir inhibiteur des agents pro-inflammatoires comme IL-6 et TNF- α dans les monocytes (Bouic 2001) (Aldini et al. 2014). De plus, les expériences réalisées par Bardaa et al. (Bardaa et al. 2020) sur les rats ont démontré l'effet de l'huile de cactus sur l'inflammation aigüe induite par les carraghénanes (des polysaccharides soufrés extraits d'algues rouges). De plus, ces résultats ont montré que l'huile de cactus a pu réduire les signes cliniques d'inflammation, à savoir : l'infiltration des cellules inflammatoires, la congestion vasculaire et la réduction de marqueurs biochimiques tels que la CRP (C-reactive protein) et le fibrinogène.

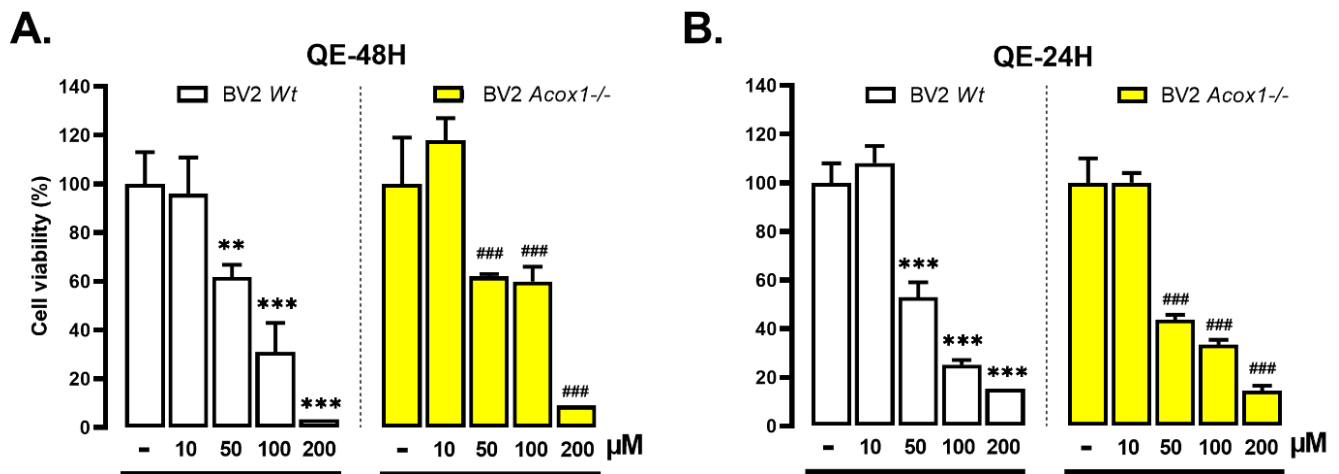
L'équipe de Bouhrim et al. (Bouhrim et al. 2020) a testé également l'effet *in vivo* de l'huile de graine d'*Opuntia dillenii* (obtenu au Maroc) et a démontré que cette huile contient un taux de composés phénoliques très élevé et une activité antioxydante remarquable qui permet de renforcer l'activité antioxydante dans les cellules bêta-pancréatiques (Berraouan et al. 2015). Il faut noter également que cette activité antioxydante dépend de la dose de CSO utilisée pour traitement (Bouhrim et al. 2020). Ce résultat est en accord avec plusieurs études effectuées sur la figue de barbarie (Ghazi et al. 2015) (Wei et al. 2009) (Özcan et Al Juhaimi 2011). Une autre étude a été réalisée *in vitro* sur les cellules microgliales BV2 de souris activées par différentes endotoxines microbiennes (F.-E. Saih et al. 2017). Dans cette étude, le traitement des cellules BV2, stimulées avec du LPS, par les extraits de cladodes d'*Opuntia ficus indica* a montré clairement sa capacité antioxydante dans la modulation de l'activité de la catalase peroxysomale et ses propriétés anti-inflammatoires, accompagnées par une réduction de la production de NO par les cellules microgliales activées. Ce résultat *in vitro* renforce nos résultats révélant ainsi la présence d'un effet neuroprotecteur de l'huile de graine de cactus sur le cerveau de souris ayant reçu du LPS. La CSO contient plus de 62% d'acide linoléique, un acide gras polyinsaturé. La présence de différents composés bioactifs dans l'huile de graines de cactus y compris des PUFA peut suggérer leur capacité à activer des récepteurs nucléaires comme PPAR α . En effet, il est bien établi que les PUFA sont des activateurs PPAR α . Dans ce sens, l'activation du PPAR α est capable d'atténuer la neuroinflammation chez les souris adultes après une injection intracérébrale de LPS (G. Wang et Namura 2011).

C. Effets de molécules naturelles issues du cactus sur l'inflammation et sur les fonctions peroxysomales

1. Test de Cytotoxicité MTT

Cette partie du travail de thèse a été consacrée à explorer le pouvoir protecteur et modulateur des molécules naturelles issues de cactus contre l'inflammation et le dysfonctionnement lysosomal générées par les déficiences peroxysomales et/ou le traitement LPS. Toutes les données montrées précédemment caractérisant les modèles microgliales ont révélé les altérations provoquées à plusieurs niveaux cellulaires et causés par l'absence des gènes peroxysomales.

Avant de commencer notre étude sur les effets anti-inflammatoires et anti-oxydants des dérivés de cactus c'était nécessaire de tester la cytotoxicité de ces derniers sur les cellules microgliales BV2 sauvages et mutantes, afin d'évaluer correctement l'effet biologique des molécules sur les cellules dans des conditions favorables de croissance.



*Figure 40 : Effets de la quercétine (QE) sur la viabilité cellulaire. Les cellules microgliales BV-2 WT et Acox1^{-/-} ont été traitées avec diverses concentrations de quercétine (10, 50, 100 et 200 µM) pendant 48H (A) et 24H (B), et la viabilité des cellules a été mesurée par FDA test. Les données représentent la moyenne (± SD) et sont représentatifs de quatre mesures correspondantes à 4 puits (**p < 0,01 vs contrôle Wt, ###p < 0,01 vs contrôle Acox1^{-/-})*

On a effectué deux types de test de viabilité cellulaire, le FDA et MTT tests. Dans un premier temps, on a choisi quatre concentrations différentes de traitement, allant de 10 à 200µM. Les cellules ont étéensemencées dans des plaques de 96 puits (7000 cellules/puits), puis traitées pendant 24H ou 48H par le dérivé de cactus.

Après traitement des cellules *Wt* et déficientes en *Acox1*, pendant 48H ou 24H avec la molécule de quercétine à différentes concentrations (**Figure 40**), les résultats ont montré que la viabilité cellulaire diminue à partir d'une concentration de traitement de 50µM avec un pourcentage de 50% de cellules vivantes, et on se retrouve avec 5 à 10% de cellules vivantes à une concentration de 200µM.

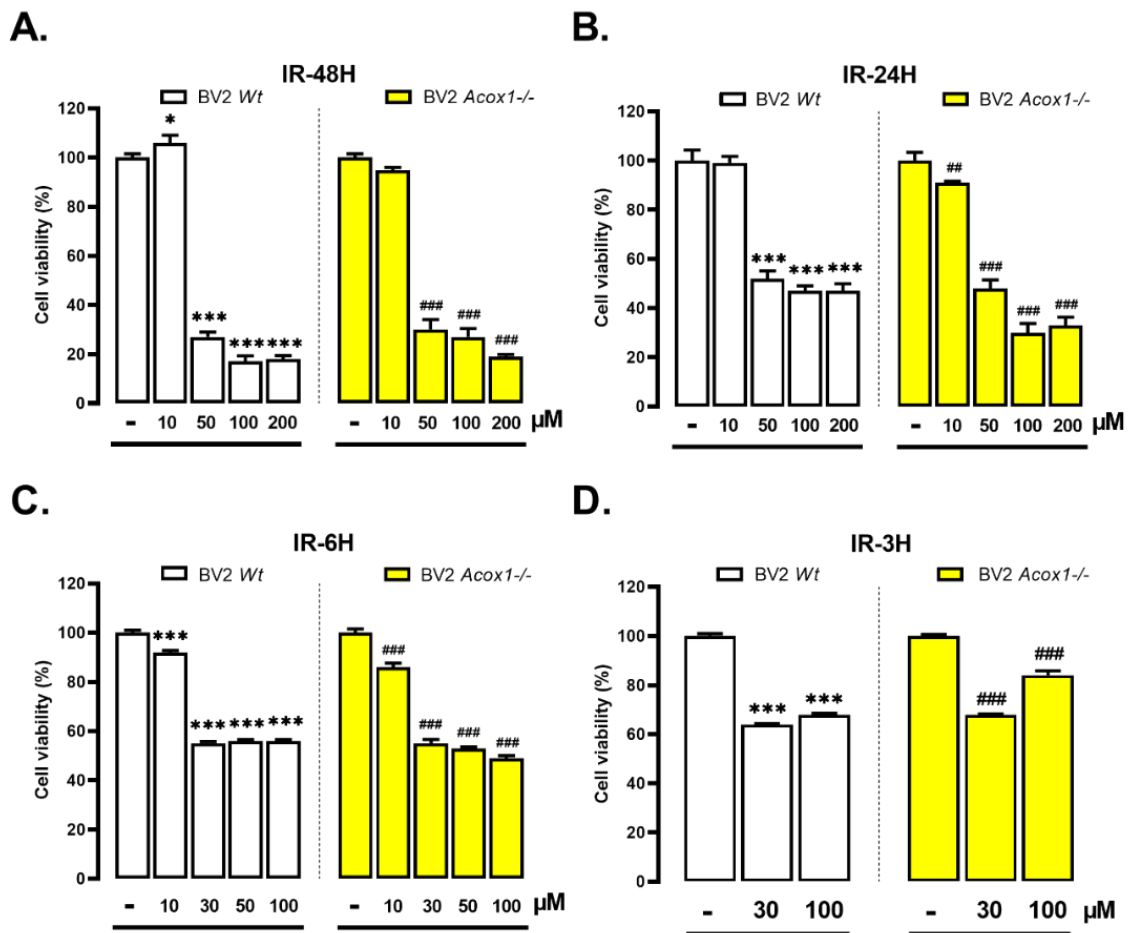


Figure 41: Effets de l'isorhamnetine (IR) sur la viabilité cellulaire. Les cellules microgliales BV-2 WT et *Acox1*^{-/-} ont été traitées avec diverses concentrations d'isorhamnetine (10, 50, 100 et 200 μ M) pendant 48H (A) et 24H (B), à des concentrations de (10, 30, 50 et 100 μ M) pendant 6H (C), et à des concentrations de (30 et 100 μ M) pendant 3H (D) la viabilité des cellules a été mesurée par MTT test. Les données représentent la moyenne (\pm SD) et sont représentatifs de quatre mesures correspondantes à 4 puits (***p* < 0,01 vs contrôle Wt, ##*p* < 0,01 vs contrôle *Acox1*^{-/-}).

Tandis que le traitement avec la molécule isorhamnetine pendant 48H a provoqué une importante cytotoxicité chez les cellules Wt et *Acox1*^{-/-} (**Figure 41**), et à une concentration de 50 μ M, on perd presque 80% de cellules par puits. Afin de déterminer la concentration adéquate pour le traitement de cellules pour les prochaines expériences, on a modifié la durée et la concentration du traitement. A 3H du traitement avec 30 μ M d'isorhamnetine a permis de garder 60% de cellules vivantes. L'effet du traitement d'isorhamnetine sur les cellules sauvages et mutante est similaire, la mutation au niveau de gène *Acox1* ne modifie pas la sensibilité des cellules face au traitement à l'isorhamnetine. La relation dose-effet est bien remarqué suite au traitement des cellules avec des concentrations croissantes de quercétine et d'isorhamnetine.

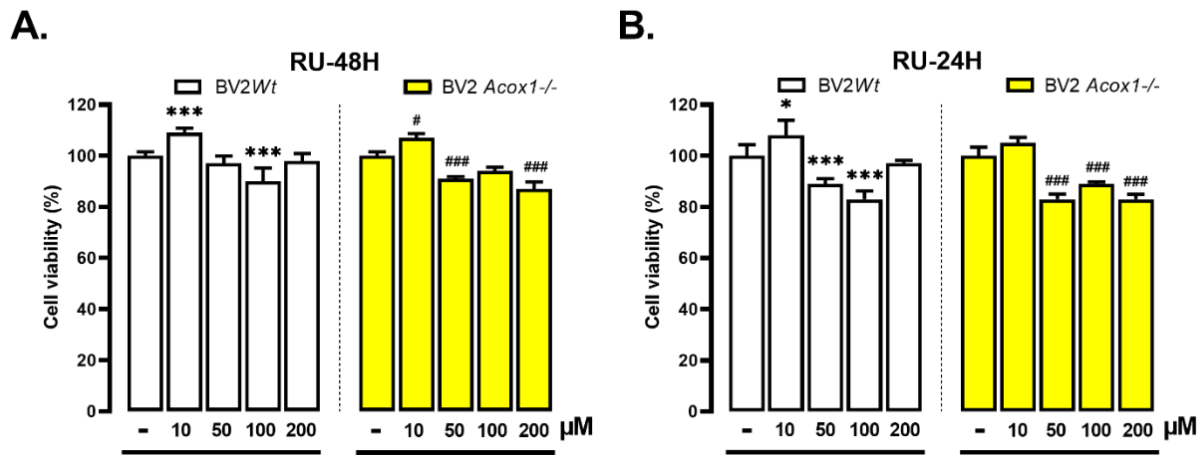
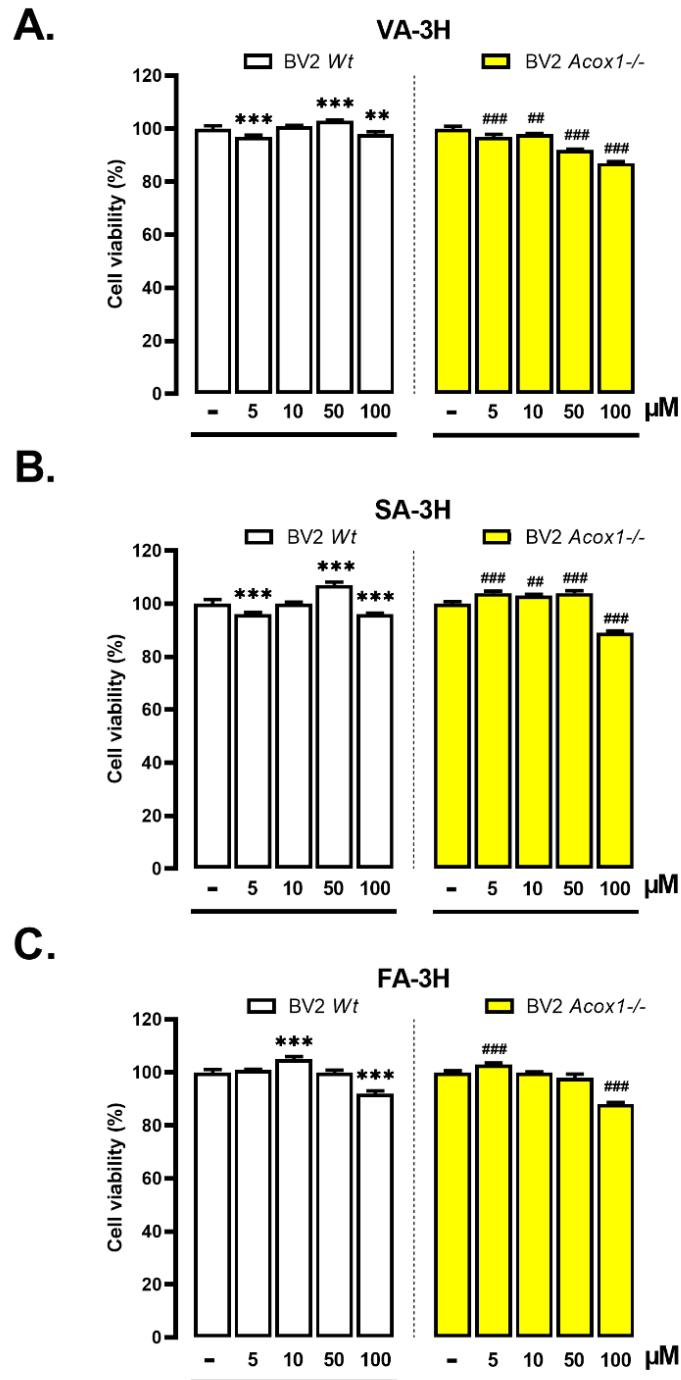


Figure 42: Effets de l'isorhamnetine-O-rutinoside (RU) sur la viabilité cellulaire. Les cellules microgliales BV-2 WT et *Acox1*^{-/-} ont été traitées avec diverses concentrations d'isorhamnetine-O-rutinoside (10, 50, 100 et 200 μ M) pendant 48H (A) et 24H (B), la viabilité des cellules a été mesurée par MTT test. Les données représentent la moyenne (\pm SD) et sont représentatifs de quatre mesures correspondantes à 4 puits (***p* < 0,01 vs contrôle Wt, ##*p* < 0,01 vs contrôle *Acox1*^{-/-}).

Le traitement avec la molécule d'isorhamnetine-O- rutinoside à différentes concentrations, ne provoque aucune cytotoxicité cellulaire pour la durée de 48H et 24H de traitement. On observe une faible diminution de taux de viabilité cellulaire chez les cellules sauvages et mutantes mais qui ne dépasse pas un taux de 15% (**Figure 42**). Pour la molécule RU, on n'avait pas besoin de tester des faibles concentrations ou de réduire la durée de traitement vu qu'elle n'affecte pas la viabilité cellulaire même à des concentrations très élevées de traitement.



*Figure 43: Effets de composés phénoliques sur la viabilité cellulaire. Les cellules microgliales BV-2 WT et Acox1 -/- ont été traitées avec diverses concentrations de Vanilline (VA) (A), Syringaldehyde (SA) (B) et Ferulaldehyde (FA) (C) (10, 50, 100 et 200 μ M) pendant 3H, la viabilité des cellules a été mesurée par MTT test. Les données représentent la moyenne (\pm SD) et sont représentatifs de quatre mesures correspondantes à 4 puits (** $p < 0,01$ vs contrôle Wt, ## $p < 0,01$ vs contrôle Acox1-/-).*

Trois heures de traitement avec les trois composés phénoliques à différentes concentrations n'induit aucune cytotoxicité comme le montre les résultats présentés dans la **figure 43, (A, B et C)**, le taux de viabilité cellulaire reste constant pour les deux lignées cellulaires sauvages et mutantes quelle que soit la dose du traitement avec les composés phénoliques. Comme le composé RU, les composés phénoliques, VA, SA et FA ne montrent aucun effet sur la viabilité cellulaire après 3H de traitement.

Après avoir effectué les tests de viabilité cellulaire sur les cellules sauvages et mutantes des six dérivés de cactus, QE, IR, RU, VA, SA et FA, l'ensemble des données nous a aidé à déterminer les concentrations et durée de traitement qui vont permettre la croissance favorable des cellules et en même temps l'évaluation correcte des effets anti-oxydants et anti-inflammatoires des différentes molécules issues de cactus. Dans notre étude, on a choisi de prétraiter nos cellules pendant 3H à des concentrations de 30 et 100 μ M pour toutes les molécules.

2. Dosage de NO

Parmi tous les tests destinés à évaluer l'état oxydatif au niveau cellulaire, on trouve le dosage de NO. La présence excessive de la molécule de NO dans le milieu de culture cellulaire, est un indicateur majeur du stress oxydatif. Ici, l'effet de traitement avec les molécules issues de cactus (flavonoïdes et phénols) sur le stress oxydatif, a été déterminé par le dosage de NO présent dans les milieux de culture cellulaire des cellules microgliales BV-2 sauvages et mutantes stimulées avec du LPS pendant 24H. Nous avons prétraité les cellules avec 30 et 100 μ M des composés issus de cactus pendant 3 h, suivi d'une stimulation d'inflammation avec 1 μ g/ml de LPS pendant 24 h.

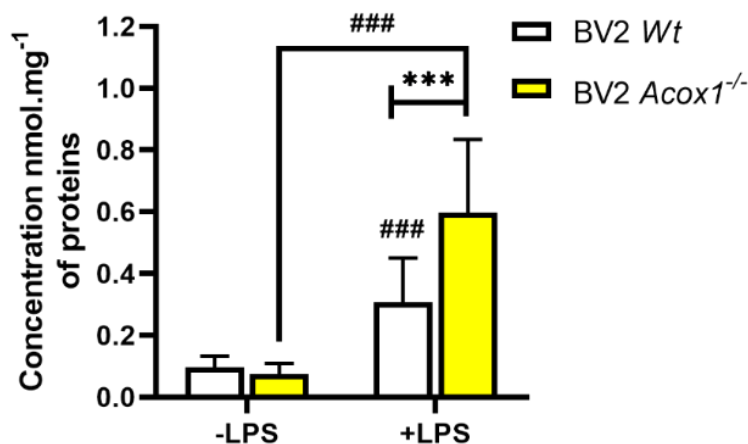


Figure 44: Effets du traitement LPS sur la production de NO par les cellules microgliales. Les cellules microgliales BV-2 Wt et Acox1^{-/-} ont été incubées avec du LPS (1µg/ml) pendant 24H. La production de NO a été détectée en utilisant le test de Griess. Les données représentent la moyenne (± SD) de trois puits répliqués et sont représentatifs de trois expériences indépendantes (**p < 0,01 vs contrôle (Wt/Acox1^{-/-}), ###p < 0,01 vs traitement LPS (Wt/Acox1^{-/-}).

Comme montré dans **la Figure 44**, l'effet LPS est bien notable dans les résultats. Dans les deux lignées cellulaires Wt et mutantes, LPS a permis d'augmenter significativement la production de NO dans le milieu extracellulaire. Nos résultats confirment que l'endotoxine bactérienne entraîne une induction du stress oxydatif qui permet par conséquent la production excessive du NO par les cellules microgliales. Cet effet s'amplifie significativement dans les cellules mutantes en comparaison avec les cellules sauvages. La mutation au niveau du gène Acox1, exacerbe la production de NO en présence d'un stimulus d'inflammation.

La figure 45 présentée ci-dessous, met en évidence l'effet inhibiteur des composés issus de cactus sur la production de NO dans les cellules microgliales BV-2 traitées avec du LPS. La quercétine augmente la production de NO par les cellules sauvages Wt. Cependant, une légère diminution de la concentration de l'oxyde nitrique est observée dans le milieu de culture des cellules Wt traitées avec du LPS (**Figure 45, A**). Tandis que l'effet de la quercétine sur les cellules mutantes déficientes en Acox1 est plus remarquable en comparaison avec les cellules control traitées avec le LPS seul, surtout avec le prétraitement de 100µM, qui permet d'atténuer significativement la production du NO (**Figure 45, B**). La molécule d'isorhamnetine montre

pareillement une capacité de réduction du niveau de production de NO dans le milieu de culture des cellules mutantes, qui devient comparable à celui des cellules sauvages.

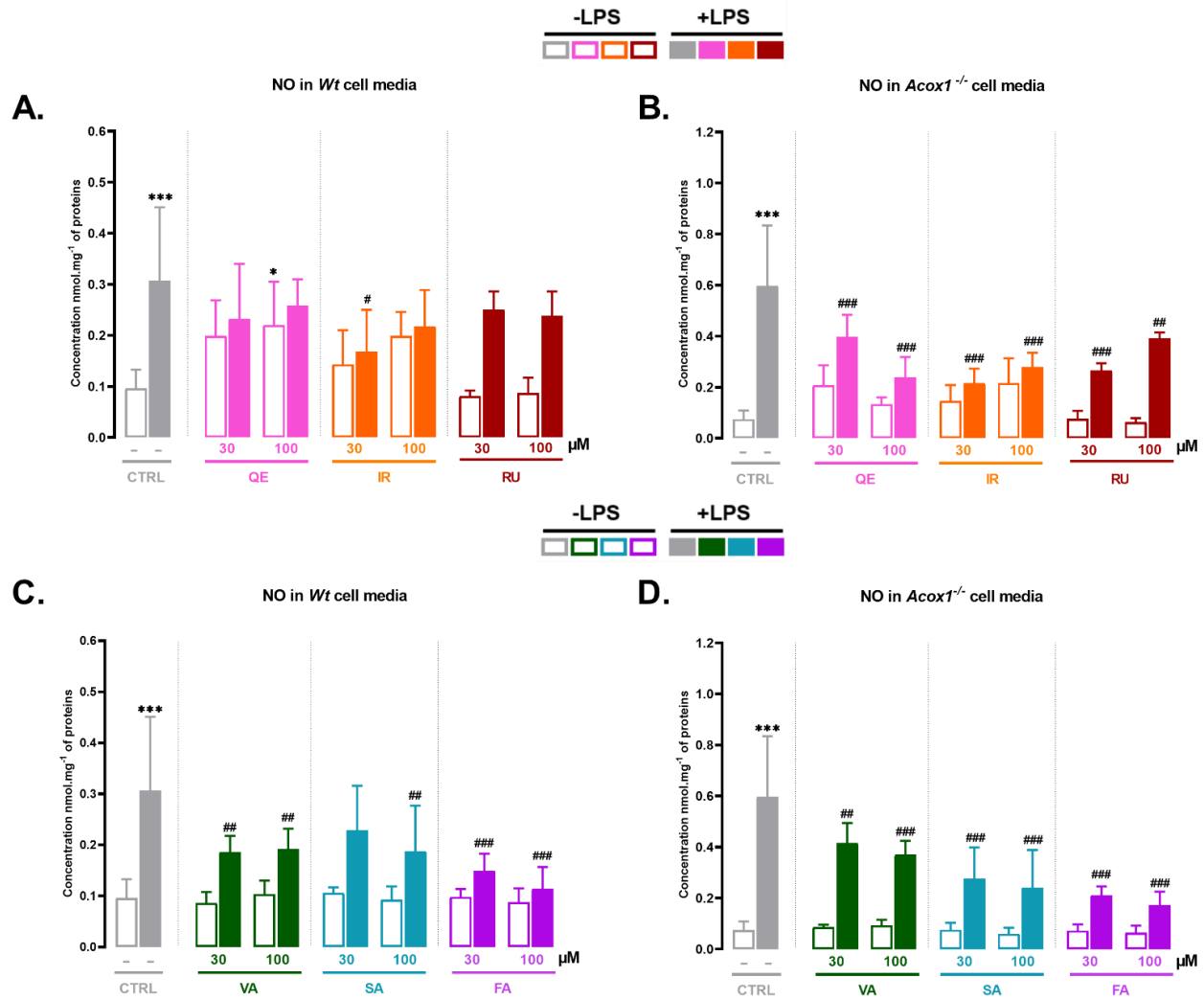


Figure 45: Effets des molécules flavonoïdes (QE, IR, RU) et phénols (VA, SA, FA) sur la production de NO. Les cellules microgliales BV-2 Wt et Acox1 ont été prétraitées avec diverses concentrations de flavonoïdes ou de composés phénoliques (30–100 μ M) pendant 3H puis incubées avec du LPS (1 μ g/ml) pendant 24H. La production de NO a été détectée en utilisant le test de Griess. Les données représentent la moyenne (\pm SD) de trois puits répliqués et sont représentatifs de trois expériences indépendantes (**p < 0,01 vs contrôle (Wt/Acox1^{-/-}), ###p < 0,01 vs traitement LPS (Wt/Acox1^{-/-}).

Le prétraitement pendant 3H avec l'isorhamnetine-O-rutinoside abaisse significativement la production du NO par les cellules mutantes stimulées par du LPS pendant 24H, contrairement aux cellules sauvages, l'impact du prétraitement RU est moins important sur la génération du NO (**Figure 45, A, B**). La quercétine, l'isorhamnetine et l'isorhamnetine-O-rutinoside ont atténué significativement la sécrétion de NO en présence du stress oxydatif induit par les lipopolysaccharides. Cet effet est plus notable chez les cellules mutantes que les cellules sauvages.

Alors que, le prétraitement avec les composés phénoliques Vanilline, Syringaldehyde et Ferulaldehyde a diminué considérablement la production de NO dans le milieu de culture par les cellules sauvages et mutantes stimulées par du LPS (**Figure 45, C, D**). L'action inhibitrice sur la production de l'oxyde nitrique s'exprime notablement avec le traitement Ferulaldehyde. On remarque également que l'effet est lié non seulement à la molécule mais aussi à la concentration du composé phénolique, 100µM affaiblie notablement la production du NO en comparaison avec 30µM du composé. Les dérivés de cactus ne provoquent aucune modification dans le taux de production de NO par les cellules *Wt* et mutantes en absence de traitement LPS. L'absence d'effet du traitement seul sur le taux de NO dans le milieu de culture des cellules montre que les composés phénoliques n'induisent aucun stress oxydatif sur les cellules microgliales BV2. (**Figure 45, C, D**)

3. Effet sur l'expression des gènes

Pour investiguer l'effet anti-oxydant et anti-inflammatoire des dérivés de cactus sur les cellules microgliales *Wt* et déficientes en *Acox1*^{-/-} au niveau moléculaire. On a commencé par explorer le niveau d'expression de quelques gènes peroxysomaux (*Abcd3*, *Catalase*, *Hsd17b4*, *Pex11b*, *Ppara* α , *Ppara* β , *Ppar* γ , *Sod1*) et d'inflammation (*Tnfa*, *Il-1* β , *iNos*, *Il-4*).

3.1. Gènes peroxysomaux

Le gène *Abcd3* fait partie de la superfamille des transporteurs ABC (ATP-binding cassette). Les protéines ABC transportent diverses molécules à travers les membranes extra- et intra-

cellulaires. Cette protéine fait partie de la sous-famille ALD, qui est impliquée dans l'importation peroxysomale d'acides gras et/ou d'acyl-CoA gras dans l'organite.

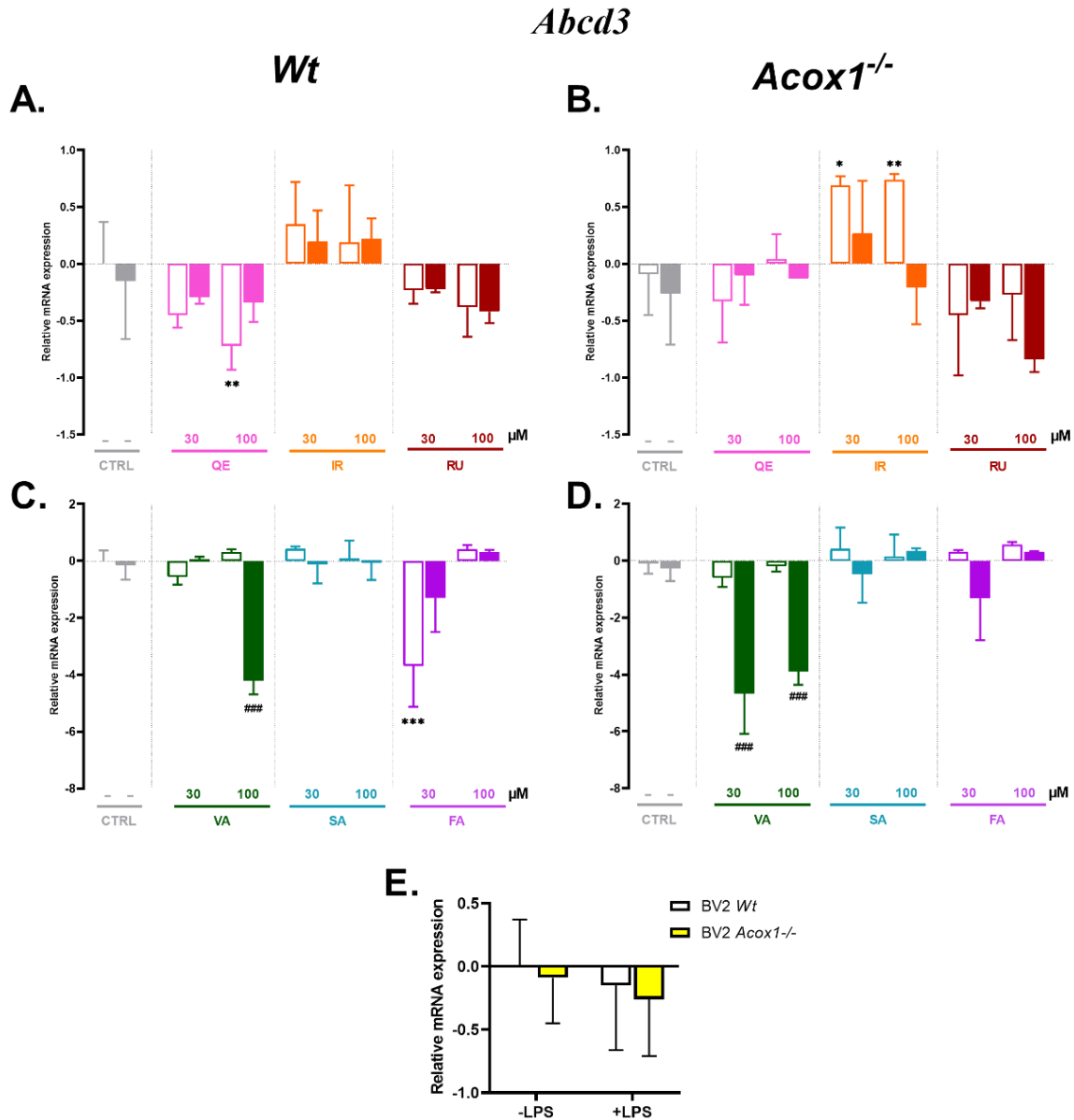


Figure 46: Effets des flavonoïdes (QE, IR, RU) et composés phénoliques (VA, SA, FA) sur l'expression génique du gène peroxysomal Abcd3. Les cellules microgliales BV-2 Wt et Acox1^{-/-} ont été prétraitées pendant 3H avec différentes concentrations (30–100 μM) de Flavonoïdes et composés phénoliques puis stimulées avec du LPS (1μg/ml) pendant 24h. Après avoir retiré le milieu, l'ARN a été isolé. Le niveau d'expression des ARNm du gène Abcd3, a été déterminé par analyse qPCR. Les résultats sont

*représentatifs de trois expériences indépendantes (**p < 0,01 vs contrôle (Wt/Acox1-/-), ##p < 0,01 vs traitement LPS (Wt/Acox1-/-).*

La protéine membranaire des peroxyosomes ABCD3 joue un rôle important dans la biogenèse des peroxyosomes. Ici dans notre étude on regarde l'expression génique d'*Abcd3*, pour voir si la mutation du gène *Acox1*^{-/-} peut modifier le niveau d'expression d'autres gènes peroxyosomaux dans les cellules microgliales BV2, et si le traitement avec les différents composés issus de cactus peut affecter les gènes peroxyosomaux dans des conditions de cultures normales et de stress cellulaire induit par LPS.

La **figure 46, graphe E**, montre que l'absence du gène *Acox1*, et le traitement avec du LPS pendant 24H, diminuent légèrement l'expression du gène *Abcd3*. Le prétraitement avec la quercétine réduit le niveau d'expression génique par rapport au contrôle (**figure 46, A, B**). Le même effet est observé avec la molécule Isorhamnetine-O-rutinoside, on remarque une diminution d'expression du gène *Abcd3* qui s'amointri plus avec le traitement LPS (**figure 46, A, B**). Contrairement à l'isorhamnetine qui a permis d'augmenter l'expression du gène *Abcd3*. Cette induction est significative dans les cellules mutantes et n'est pas liée à la dose d'isorhamnetine utilisée pour le traitement (**figure 46, B**).

La vanilline a réprimé l'expression du gène *Abcd3*, ce résultat n'était pas similaire dans les deux lignées cellulaires (**figure 46, C, D**). Pour les cellules sauvages, le niveau d'expression du gène n'a pas changé en comparaison avec les groupes contrôles (**figure 46, C**), seulement à la dose 100µM de prétraitement qu'on voit une diminution considérable de l'expression du gène *Abcd3* des cellules sauvages traitées avec du LPS. Alors que pour les cellules mutantes, les deux doses du prétraitement avec la vanilline ont pu affecter significativement l'expression du gène peroxyosomale. Tandis que, la molécule Syringaldehyde (SA) n'a causé aucun changement dans l'expression du gène *Abcd3* chez les cellules sauvages et mutantes par rapport aux groupes contrôle. Quant au Ferulaldehyde (FA), la molécule a pu réduire significativement l'expression du gène *Abcd3* des cellules *Wt* à 30µM de prétraitement et pas des cellules mutantes, alors qu'on ne voit pas de différence d'expression à 100µM pour les deux lignées cellulaires, traitées et non traitées avec du LPS (**figure 46, C, D**).

Catalase

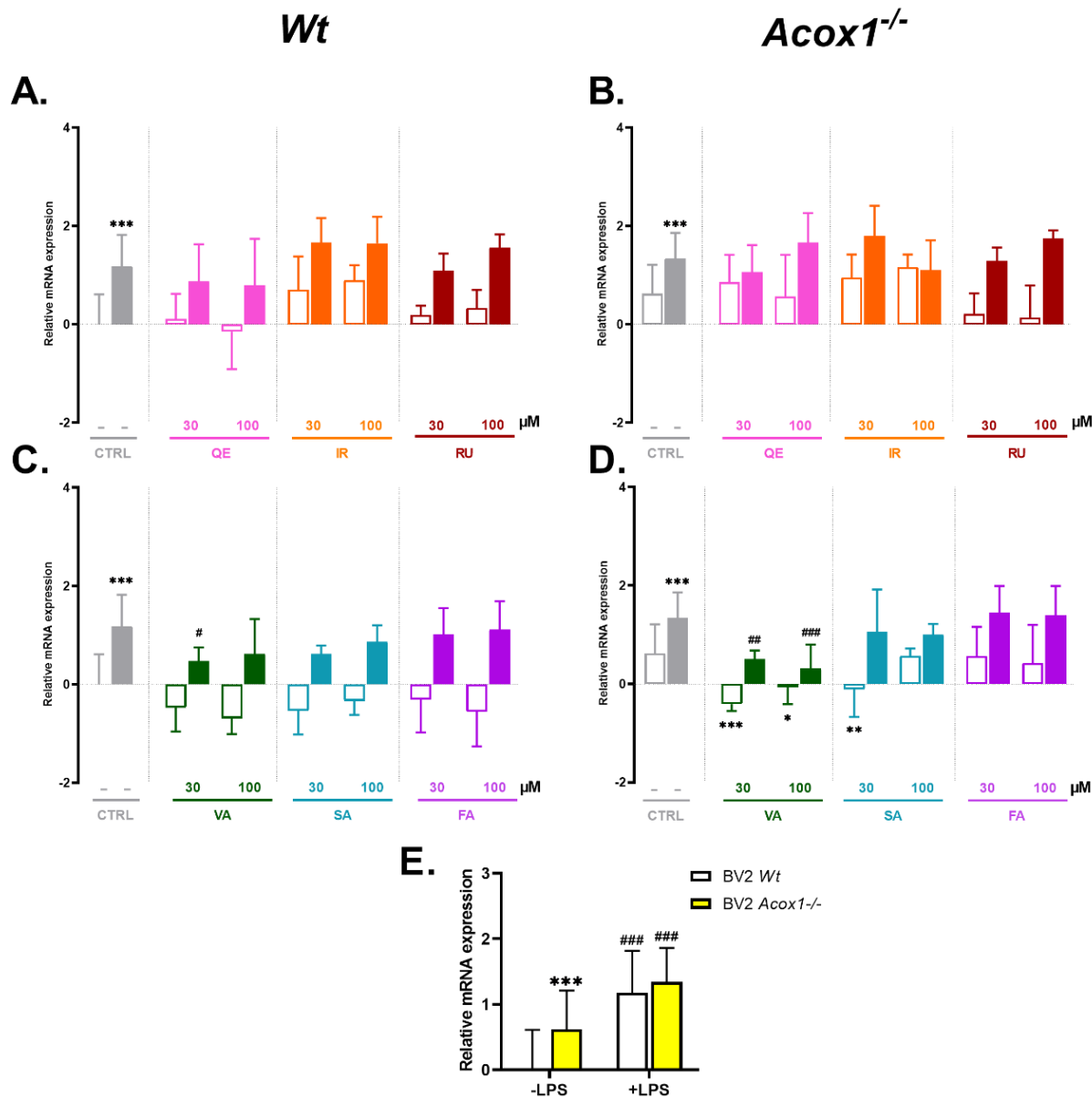


Figure 47: Effets des flavonoïdes (QE, IR, RU) et composés phénoliques (VA, SA, FA) sur l'expression génique du gène peroxysomal Catalase. Les cellules microgliales BV-2 Wt et Acox1^{-/-} ont été prétraitées pendant 3H avec différentes concentrations (30–100 μM) de Flavonoïdes et composés phénoliques puis stimulées avec du LPS (1μg/ml) pendant 24h. Après avoir retiré le milieu, l'ARN a été isolé. Le niveau d'expression des ARNm du gène Catalase, a été déterminé par analyse qPCR. Les résultats sont représentatifs de trois expériences indépendantes (**p < 0,01 vs contrôle (Wt/Acox1^{-/-}), ###p < 0,01 vs traitement LPS (Wt/Acox1^{-/-}).

En plus du gène *Abcd3*, on a étudié l'expression du gène de la catalase, qui code pour l'enzyme de la catalase qui prévient les dommages oxydatifs cellulaires en dégradant le peroxyde d'hydrogène en eau et en oxygène avec une grande efficacité.

Ici dans la **figure 47, graphe E**, on voit bien l'impact de la mutation au niveau du gène *Acox1* sur l'expression du gène de la catalase, qui provoque une augmentation significative de celui-ci, cet effet s'accroît avec le traitement LPS pour les deux lignées cellulaires.

Le prétraitement avec de la quercétine, ne modifie pas significativement l'expression de la catalase (**figure 47, A, B**). Le même effet est observé pour l'isorhamnetine et l'isorhamnetine-O-rutinoside. Tandis que les composés phénoliques, ont pu affecter significativement l'expression de la catalase (**figure 47, C, D**). On remarque que les deux doses de prétraitement avec la vanilline, Syringaldehyde et la Ferulaldehyde ont diminué significativement l'expression de la catalase des deux lignées cellulaires *Wt* et *Acox1*^{-/-}. L'augmentation de l'expression de la catalase induite par LPS, a été atténuée par les prétraitements avec la vanilline et la Syringaldehyde (**figure 46, C, D**). Contrairement à la Ferulaldehyde, qui n'a pas changé le niveau d'expression de la catalase par rapport aux groupes contrôles comme montré dans la **figure 47, C et D**.

Dans le but d'investiguer les conséquences de l'absence du gène *Acox1*^{-/-} ainsi que les traitements avec les dérivés de cactus sur la fonction peroxysomale et les événements moléculaires et métaboliques cellulaires, on a choisi d'étudier également le niveau d'expression du gène *Hsd17b4* (**figure 48**). La protéine codée par ce gène est une enzyme bifonctionnelle impliquée dans la voie de β -oxydation peroxysomale des acides gras. Il agit également comme catalyseur pour la formation d'intermédiaires 3-cétoacyl-CoA à partir d'acides gras à chaîne linéaire et à chaîne ramifiée 2-méthyle.

Comme on voit dans la **figure 48, graphe E**, l'effet LPS est peu remarquable sur l'expression du gène codant pour l'enzyme bifonctionnelle des peroxysomes. Le prétraitement des cellules sauvages avec la quercétine à une dose de 100 μ M a diminué significativement l'expression du gène *Hsd17b4* (**figure 48, A**). Contrairement aux cellules *Wt*, le traitement des cellules déficientes en *Acox1* avec la quercétine a augmenté l'expression du gène *Hsd17b4*, mais aucun effet significatif sur les cellules stimulées avec du LPS (**figure 48, B**). Quant à l'Isorhamnetine, à une concentration de 100 μ M, a pu réduire considérablement l'expression du *Hsd17b4*, cet effet n'est pas observable chez les cellules mutantes (**figure 48, A, B**).

Hsd17b4

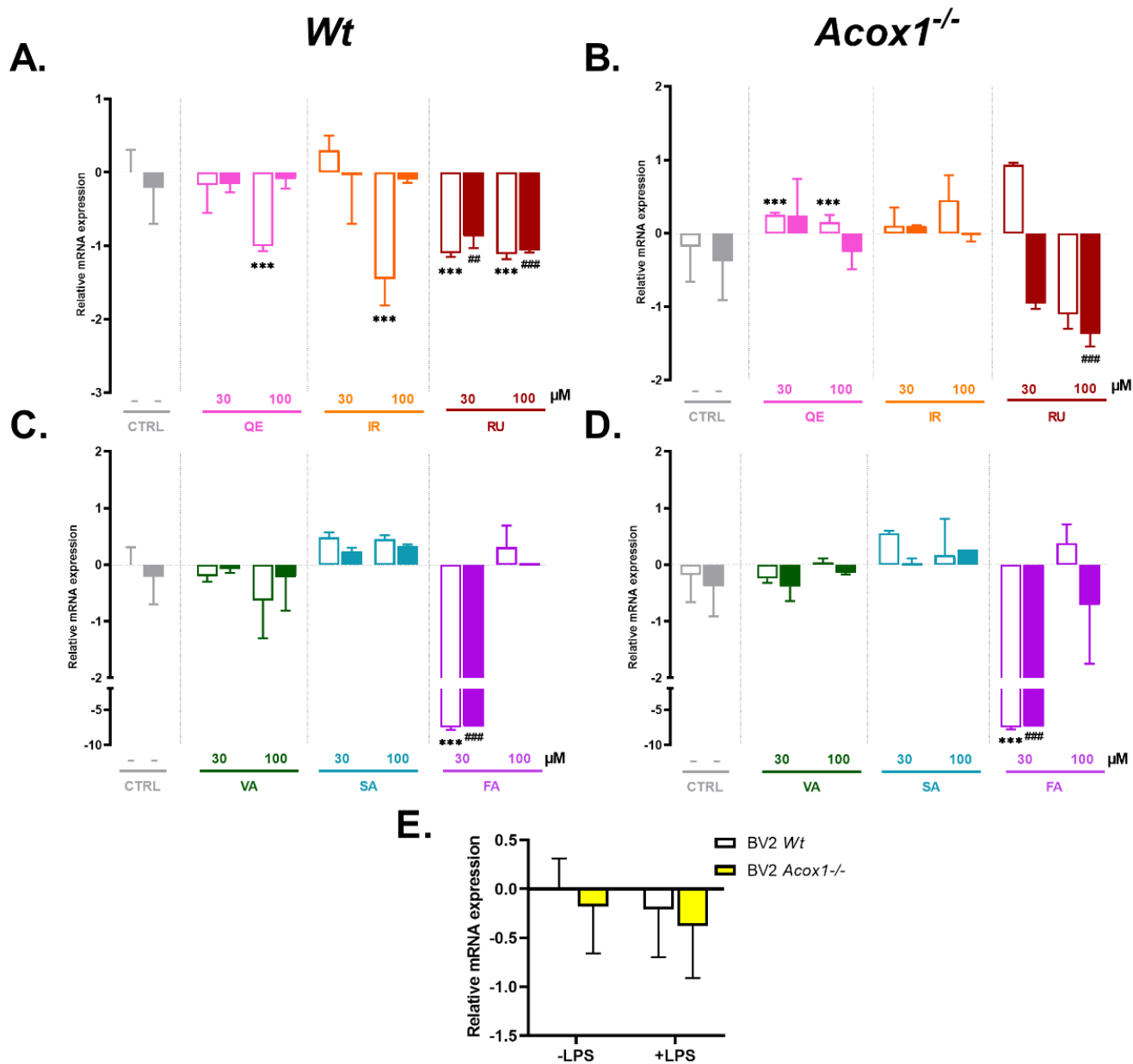


Figure 48: Effets des flavonoïdes (QE, IR, RU) et composés phénoliques (VA, SA, FA) sur l'expression génique du gène peroxysomal Hsd17b4. Les cellules microgliales BV-2 Wt et Acox1^{-/-} ont été prétraitées pendant 3H avec différentes concentrations (30–100 μM) de Flavonoïdes et composés phénoliques puis stimulées avec du LPS (1μg/ml) pendant 24h. Après avoir retiré le milieu, l'ARN a été isolé. Le niveau d'expression des ARNm du gène Hsd17b4, a été déterminé par analyse qPCR. Les résultats sont représentatifs de trois expériences indépendantes (**p < 0,01 vs contrôle (Wt/Acox1^{-/-}), ###p < 0,01 vs traitement LPS (Wt/Acox1^{-/-})).

En plus, la **figure (48, A, B)** montre que l'IR n'a aucun impact sur le niveau d'expression du *Hsd17b4* des cellules microgliales BV2 stimulées avec du LPS. Pour l'isorhamnetine-O-rutinoside, on voit une répression de l'expression du gène *Hsd17b4* des cellules sauvages et mutantes traitées et non traitées au LPS, à l'exception du traitement à 30µM de RU qui a augmenté l'expression du gène de l'enzyme bifonctionnelle des cellules déficientes en *Acox1*. (**Figure 48, A, B**)

Le résultat de prétraitement avec les composés phénoliques n'était pas trop différent que celui des flavonoïdes (**Figure 48, A, B, C, D**). Pour la vanilline, la molécule a diminué légèrement l'expression du *Hsd17b4* des deux lignées cellulaires traitées ou non avec du LPS (**Figure 48, C, D**). On voit un effet inverse avec le prétraitement à la Syringaldehyde, qui a causé une faible augmentation du niveau d'expression du gène peroxysomal des cellules microgliales. Alors que la Ferulaldehyde, a une concentration de 30µM, a baissé dramatiquement l'expression du *Hsd17b4*, et à 100µM on remarque une faible induction de l'*Hsd17b4* mais non significative (**Figure 48, C, D**).

Le gène *Pex11b*, code pour la protéine de membrane peroxysomale 11B Impliqué dans la prolifération des peroxysomes, peut réguler la division des peroxysomes et favorise la saillie et l'allongement de la membrane sur la surface peroxysomale. L'expression du gène *Pex11b* présentée ci-après dans la **figure 49**, est induite significativement dans les cellules mutantes par rapport aux cellules sauvages contrôle (**Figure 49, graphe E**). Cet effet s'inverse avec le traitement LPS, qui fait augmenter le niveau d'expression du gène *Pex11b* et le diminue significativement chez les cellules mutantes. Comme le montre la **figure 49 (A, B)**, le gène *Pex11b* est fortement induit dans les cellules sauvages et mutantes prétraitées avec la quercétine. Cette induction s'estompe dans les cellules *Acox1^{-/-}* traitées avec du LPS à une concentration de 30µM de la quercétine **figure 49 (B)**. L'isorhamnetine n'affecte pas significativement les cellules sauvages en comparaison avec les groupes de contrôle **figure 49 (A)**. Par contre, les cellules mutantes à une concentration de 100µM d'isorhamnetine, l'expression du gène *Pex11b* s'atténue subtilement mais significativement.

Pex11b

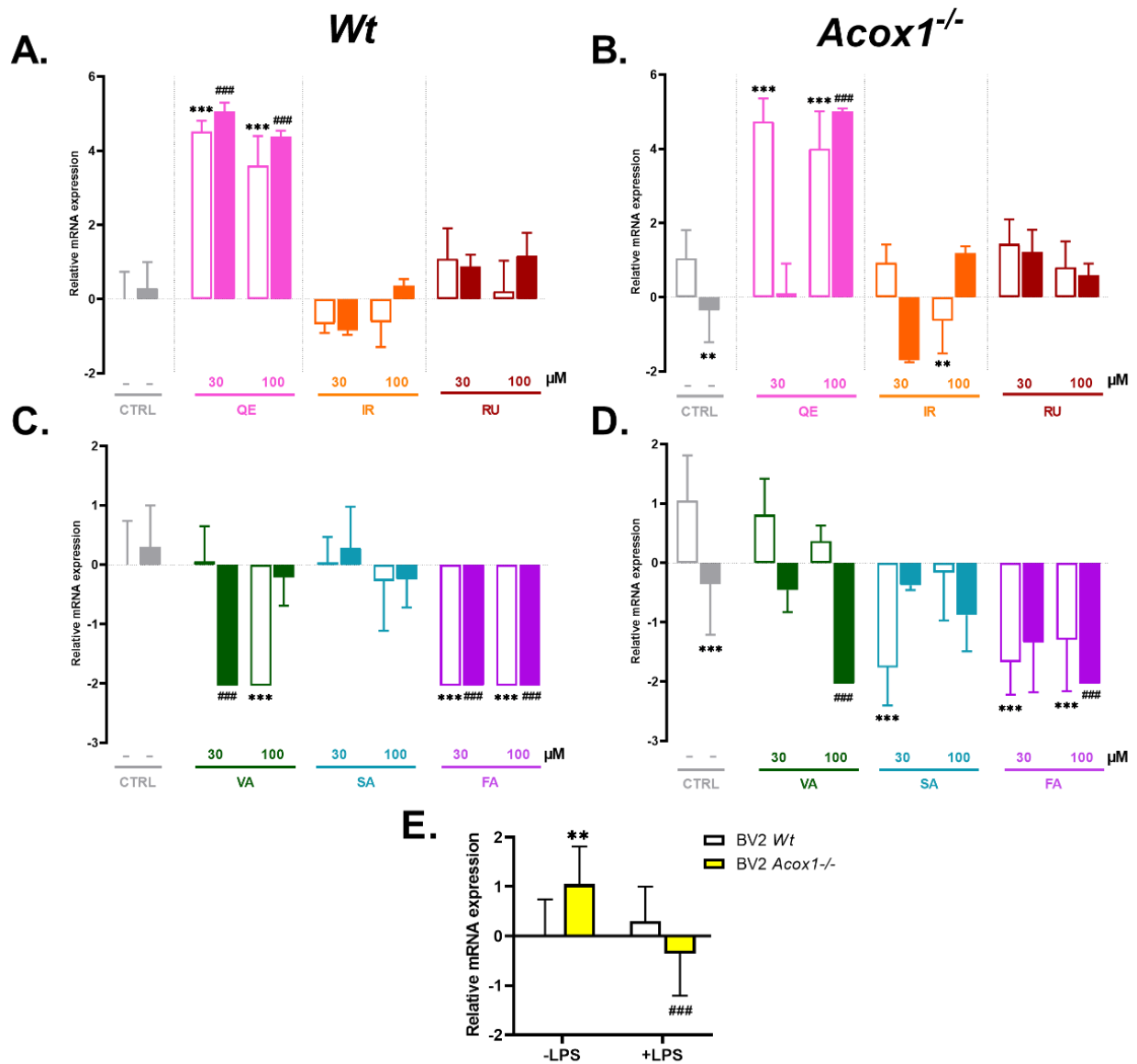


Figure 49: Effets des flavonoïdes (QE, IR, RU) et composés phénoliques (VA, SA, FA) sur l'expression génique du gène peroxysomal *Pex11b*. Les cellules microgliales BV-2 Wt et Acox1^{-/-} ont été prétraitées pendant 3H avec différentes concentrations (30–100 μM) de Flavonoïdes et composés phénoliques puis stimulées avec du LPS (1μg/ml) pendant 24h. Après avoir retiré le milieu, l'ARN a été isolé. Le niveau d'expression des ARNm du gène *Pex11b*, a été déterminé par analyse qPCR. Les résultats sont représentatifs de trois expériences indépendantes (**p < 0,01 vs contrôle (Wt/Acox1^{-/-}), ###p < 0,01 vs traitement LPS (Wt/Acox1^{-/-}).

L'isorhamnetine-O-rutinoside stimule l'expression du *Pex11b* des cellules *Wt*, alors que les cellules mutantes avec le prétraitement seul RU, n'influence pas l'expression du gène codant pour la protéine de membrane peroxysomale **figure 49 (A, B)**. Mais pour les cellules mutantes stimulées avec du LPS, on remarque que l'expression du gène *Pex11b* est induite avec des prétraitement de 30 et 100µM de RU.

En ce qui concerne les composés phénoliques **figure 49 (C, D)**, la vanilline à une concentration de 100µM diminue significativement l'expression du gène *Pex11b* des cellules *Wt*. Avec un traitement LPS on voit que la réduction change de niveau, en passant d'une concentration de 30 à 100µM de la vanilline. Pour les cellules mutantes, le traitement avec la vanilline diminue le niveau d'expression de *Pex11b*, et cet effet s'accroît avec la stimulation des cellules déficientes en *Acox1* avec du LPS **figure 49 (D)**. Pour la Syringaldehyde, n'a pas provoqué des changements spectaculaires dans l'expression du *Pex11b*. Par contre les cellules mutantes, étaient plus sensibles au SA. A 30µM on assiste à une diminution significative du *Pex11b*, et avec un traitement LPS la diminution est plus remarquable à une dose de 100µM de SA. Concernant le Ferulaldehyde, elle a pu affecter l'expression du gène *Pex11b* des deux lignées cellulaires avec ou sans traitement LPS. Pour les cellules sauvages le niveau de répression est similaire pour les deux concentrations du FA, tandis que les cellules mutantes la diminution d'expression n'est pas au même niveau, est liée probablement à la concentration du traitement.

L'action des proliférateurs de peroxysomes est médiée par des récepteurs spécifiques, appelés PPAR, qui appartiennent à la superfamille des récepteurs d'hormones stéroïdiennes. Les PPAR affectent l'expression de gènes cibles impliqués dans la prolifération cellulaire, la différenciation cellulaire et dans les réponses immunitaires et inflammatoires. Trois sous-types étroitement liés (alpha, bêta/delta et gamma) ont été identifiés.

Le gène *Ppara* code pour le sous-type PPAR α qui est un facteur de transcription nucléaire et est considéré un régulateur majeur du métabolisme des lipides dans le foie. L'absence du gène *Acox1*, ainsi que le traitement LPS diminuent mais faiblement l'expression du gène *Ppara* des cellules BV2 microgliales **figure 50, E**.

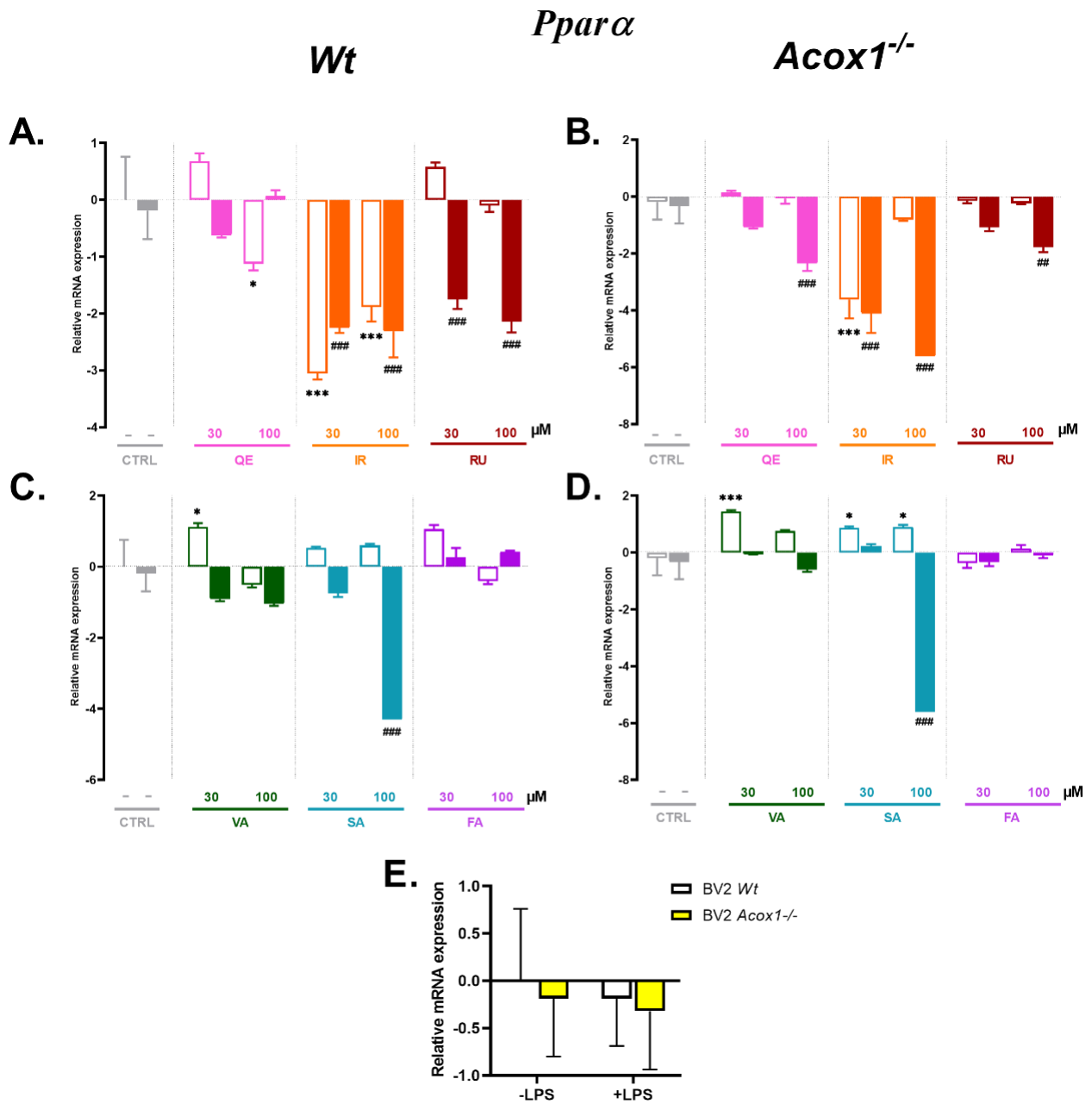


Figure 50: Effets des flavonoïdes (QE, IR, RU) et composés phénoliques (VA, SA, FA) sur l'expression génique du gène peroxysomal *Ppara*. Les cellules microgliales BV-2 Wt et *Acox1*^{-/-} ont été prétraitées pendant 3H avec différentes concentrations (30–100 μM) de Flavonoides et composés phénoliques puis stimulées avec du LPS (1μg/ml) pendant 24h. Après avoir retiré le milieu, l'ARN a été isolé. Le niveau d'expression des ARNm du gène *Ppara*, a été déterminé par analyse qPCR. Les résultats sont représentatifs de trois expériences indépendantes (***p* < 0,01 vs contrôle (Wt/*Acox1*^{-/-}), ##*p* < 0,01 vs traitement LPS (Wt/*Acox1*^{-/-}).

La quercétine n'affecte pas dramatiquement le niveau d'expression de *Ppara*, sauf pour la concentration 100µM où on observe que la diminution est significative de *Ppara* des cellules sauvages, et aussi pour les cellules mutantes stimulées avec du LPS (**figure 50, A, B**). Les deux concentrations du traitement isorhamnetine engendrent une réduction de niveau d'expression de *Ppara* des cellules sauvages, et cette répression s'exacerbe en absence du gène *Acox1*. Tandis que le prétraitement RU exerce presque le même effet sur les deux lignées cellulaires, 30 ou 100µM de RU diminuent significativement l'expression de *Ppara*.

Une concentration de 30µM de la vanilline augmente significativement l'expression du *Ppara* des cellules sauvages et mutantes par rapport au contrôle, mais diminue son expression quand les cellules sont stimulées avec du LPS (**Figure 50, C, D**). La Syringaldehyde engendre une légère élévation de l'expression du *Ppara* des cellules sauvages et mutantes. Cet effet s'inverse significativement quand les cellules sont en condition de stress cellulaire induit par LPS. A 100µM de SA, on assiste à une sous expression du gène *Ppara* des cellules *Wt* et déficientes en *Acox1*. Quant au prétraitement avec la Ferulaldehyde, on ne voit pas de grandes différences d'expression du gène *Ppara* en comparaison avec les groupes contrôle. A 30µM de FA, il y a une faible activation d'expression du gène *Ppara* mais non significative. L'effet du FA sur les cellules sauvages est en opposition avec celui des cellules mutantes (**Figure 50, C, D**).

Contrairement au gène *Ppara*, le traitement LPS induit significativement l'expression du gène *Pparβ* (**Figure 51, E**). Alors que la mutation au niveau du gène *Acox1* provoque une légère diminution du gène *Pparβ* similaire à celle observée pour le gène *Ppara* (**Figure 50, 51**) **graphe E**. Le traitement avec 100µM de la quercétine diminue significativement l'expression du gène *Pparβ* des cellules sauvages, mais pas de cellules mutantes (**Figure 51, A, B**). Les deux doses de quercétine ne modifient pas l'effet LPS sur l'expression du gène *Pparβ* de cellules microgliales BV2. A 30µM d'isorhamnetine les cellules ne changent pas d'expression du *Pparβ* avec ou sans traitement LPS. Mais à une dose de 100µM, l'IR permet de réduire significativement le niveau d'expression du *Pparβ* des cellules microgliales sauvages et mutantes stimulées avec du LPS. Pour le prétraitement avec l'isorhamnetine-O-rutinoside, la dose de 30µM n'affecte pas le taux d'expression du gène *Pparβ* des deux lignées cellulaires, alors que 100µM de RU engendre une sous expression de *Pparβ* des cellules *Wt* traitées au LPS, mais pas des cellules mutantes.

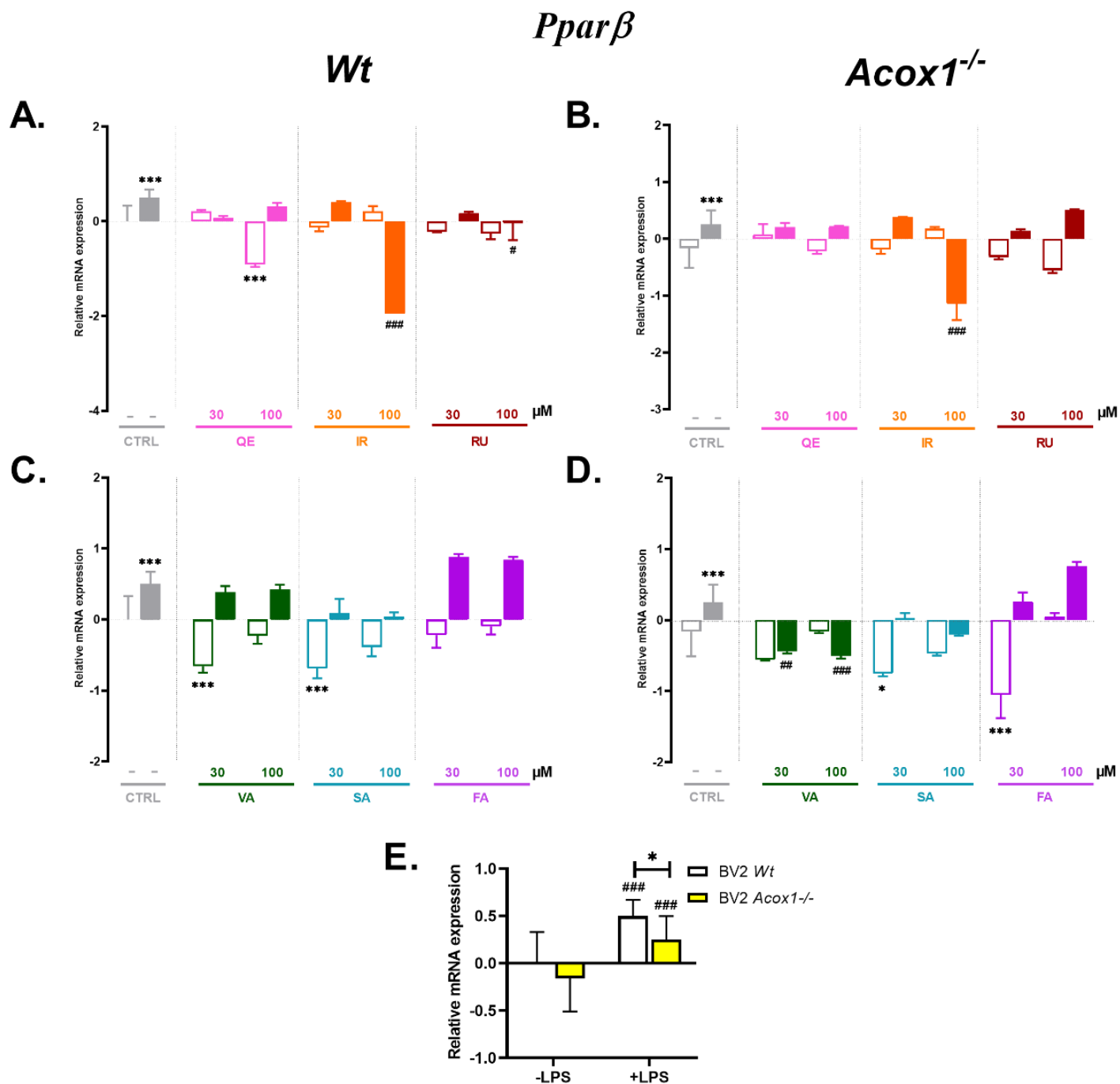


Figure 51: Effets des flavonoïdes (QE, IR, RU) et composés phénoliques (VA, SA, FA) sur l'expression génique du gène peroxysomal *Pparβ*. Les cellules microgliales BV-2 Wt et *Acox1^{-/-}* ont été prétraitées pendant 3H avec différentes concentrations (30–100 μ M) de Flavonoïdes et composés phénoliques puis stimulées avec du LPS (1 μ g/ml) pendant 24h. Après avoir retiré le milieu, l'ARN a été isolé. Le niveau d'expression des ARNm du gène *Pparβ*, a été déterminé par analyse qPCR. Les résultats sont représentatifs de trois expériences indépendantes (** $p < 0,01$ vs contrôle (Wt/*Acox1^{-/-}*), ### $p < 0,01$ vs traitement LPS (Wt/*Acox1^{-/-}*).

En général, le prétraitement de 3H avec les composés phénoliques (VA, SA, FA) a engendré une réduction de l'expression de *Pparβ* des deux lignées cellulaires (**Figure 51, C, D**). Cette diminution est liée principalement à la concentration du traitement, le niveau de sous expression change en fonction de la dose qui est de 30 ou 100μM. La vanilline ne change pas l'expression de *Pparβ* des cellules sauvages traitées avec du LPS, mais pour les cellules mutantes, on remarque une réduction significative du *Pparβ* par rapport au cellules mutantes traitées avec du LPS seul. La Syringaldehyde diminue l'expression de *Pparβ* des cellules sauvages et mutantes stimulées avec du LPS. Contrairement à la vanilline et la Syringaldehyde, la Ferulaldehyde a permis d'augmenter légèrement l'expression du *Pparβ* des cellules sauvages traitées avec du LPS par rapport au control LPS. Pour les cellules mutantes, la surexpression de *Pparβ* est plus remarquable à une dose de 100μM qu'à 30μM de FA.

L'expression du gène *Pparγ* qui code pour le 3^{ème} type de récepteur nucléaire PPAR a été également investiguée. Il intervient dans des processus physiopathologiques cruciaux. Ici, dans la **figure 52, graphe E** on montre que le traitement LPS diminue presque deux fois l'expression du gène *Pparγ* par rapport aux cellules non traitées. Tandis que l'absence du gène *Acox1* a augmenté faiblement mais significativement l'expression du gène *Pparγ* en comparaison avec les cellules *Wt*. Les flavonoïdes engendrent une sous expression du gène *Pparγ* des cellules sauvages et mutantes traitées et non traitées avec du LPS. La quercétine réduit l'expression du *Pparγ* surtout à une dose de 100μM. L'effet de QE sur les cellules *Wt* stimulées avec du LPS est presque absent. L'isorhamnetine cause une diminution d'expression du *Pparγ* des deux lignées cellulaires, le traitement LPS ne fait qu'exacerber cette sous expression surtout à une dose de 100μM d'IR. Par rapport au prétraitement avec l'isorhamnetine-O-rutinoside, cette dernière a diminué également l'expression du *Pparγ* des cellules sauvages et mutantes traitées et non traitées avec du LPS (**figure 52, A, B**).

Les composés phénoliques ne changent pas considérablement l'expression de *Pparγ* (**figure 52, C, D**). Le prétraitement de 3H avec de la vanilline à 100μM affaiblie encore plus l'expression de *Pparγ* des cellules sauvages et mutantes. Le même effet est observable avec un traitement Syringaldehyde. La dose de traitement affecte l'expression du gène *Pparγ*, et l'effet sur les cellules sauvages est comparable à celui sur les cellules mutantes.

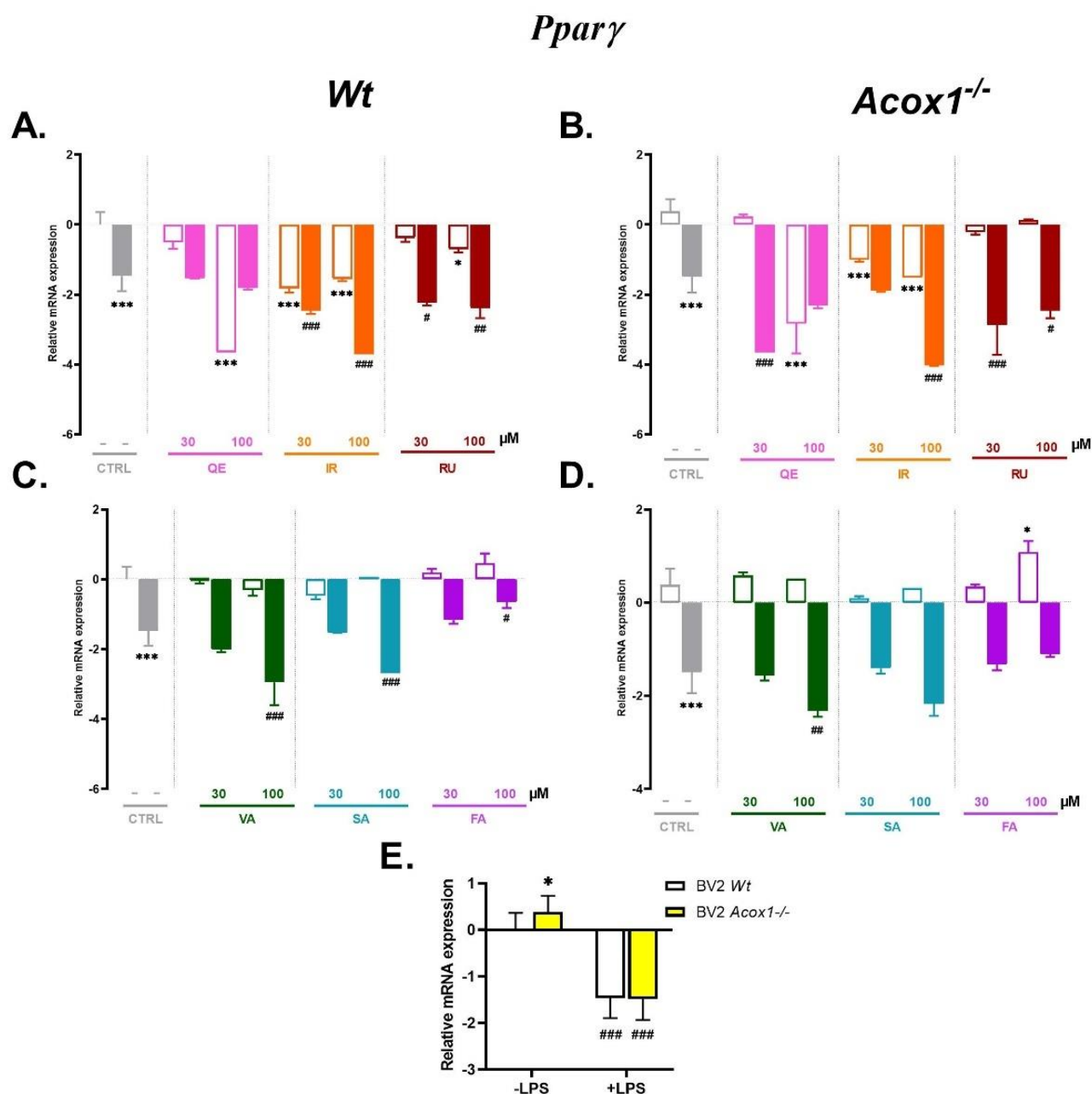


Figure 52: Effets des flavonoïdes (*QE*, *IR*, *RU*) et composés phénoliques (*VA*, *SA*, *FA*) sur l'expression génique du gène peroxysomal *Ppar γ* . Les cellules microgliales BV-2 Wt et *Acox1*^{-/-} ont été prétraitées pendant 3H avec différentes concentrations (30–100 μ M) de Flavonoïdes et composés phénoliques puis stimulées avec du LPS (1 μ g/ml) pendant 24h. Après avoir retiré le milieu, l'ARN a été isolé. Le niveau d'expression des ARNm du gène *Ppar γ* , a été déterminé par analyse qPCR. Les résultats sont représentatifs de trois expériences indépendantes (***p* < 0,01 vs contrôle (Wt/*Acox1*^{-/-}), ##*p* < 0,01 vs traitement LPS (Wt/*Acox1*^{-/-}).

Quant au Ferulaldehyde, le prétraitement de 100µM augmente significativement l'expression de *Pparγ* des cellules déficientes en *Acox1*, mais moins chez les cellules sauvages. Contrairement aux 2 autres composés phénoliques, la FA à une dose de 100µM a permis de freiner légèrement la sous expression du gène *Pparγ* des cellules sauvages et mutantes stimulées avec du LPS (**figure 52, C, D**).

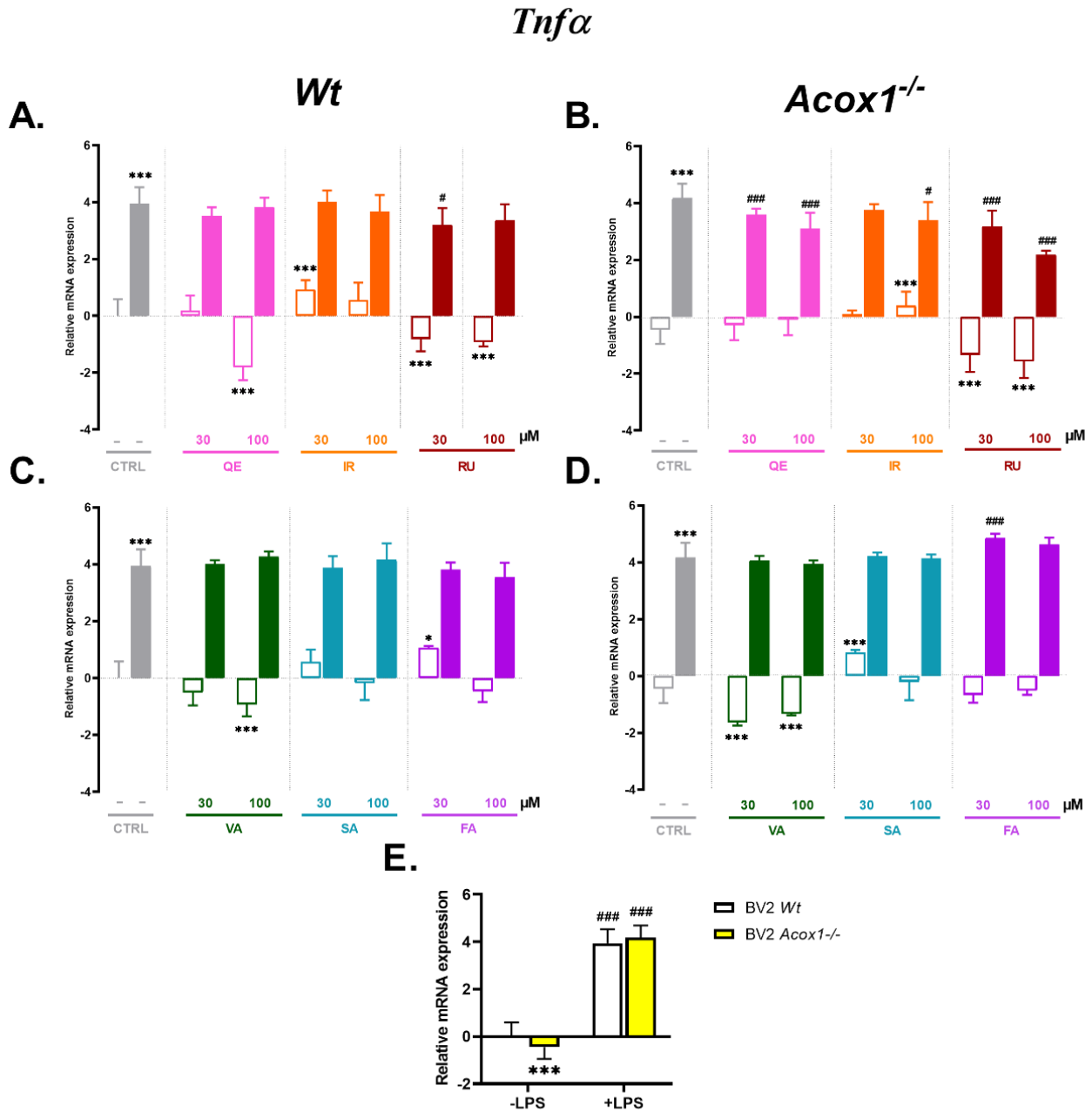
3.2.Gènes d'inflammation

Nous avons réalisé une étude comparative de l'effet anti-inflammatoire des dérivés issus de cactus sur les cellules microgliales BV2 *Wt* ou déficientes en ACOX1, stimulées ou non avec du LPS. Pour ce faire, nous avons quantifié le niveau d'expression des gènes codant des cytokines pro- et anti-inflammatoires. Les gènes qui ont été choisis pour cette étude sont *Tnf-α*, *Il-1β*, et *Il-4*. Ces trois gènes sont connus pour leur implication dans les processus inflammatoires médiés par un stimulus externe comme les endotoxines bactériennes (LPS).

Plusieurs études ont démontré que les voies de signalisations responsables de l'inflammation pourront être régulées par des molécules bioactives issues de plantes telles que les flavonoïdes et les composés phénoliques. La **figure 53** présente des graphiques illustrant l'expression du gène *Tnf-α*, codant pour une cytokine qui peut être produite par différentes cellules du système immunitaire. Le TNF-α joue un rôle pro-inflammatoire à la fois par lui-même et en régulant d'autres médiateurs inflammatoires comme les interleukines 1 et 6. Au niveau cellulaire, il favorise le recrutement de lymphocytes et de neutrophiles ainsi que la détection des antigènes. De plus, il participe également au remodelage et à la réparation des tissus (Kanaji et al. 2013; 2011). Lorsque le système immunitaire fonctionne correctement, le TNF-α possède une action positive et protège l'organisme. Cependant, des altérations des taux de TNF-α peuvent entraîner de graves pathologies (Varfolomeev et Vucic 2018; Akdis et al. 2016).

Dans les cellules BV-2 *Acox1*^{-/-}, la déficience en *Acox1* se traduit par une diminution faible mais significative de l'expression du gène *Tnf-α*. Par contre, le traitement LPS induit fortement le taux des ARNm *Tnf-α* dans les deux lignées cellulaires microgliales *Wt* et *Acox1*^{-/-} (**figure 53, E**). Le

prétraitement avec de la quercétine pendant 3H ne modifie pas de manière significative l'expression de *Tnf-α*. Cependant, à une concentration de 100μM, nous remarquons une diminution significative de l'expression du gène *Tnf-α* des cellules sauvages *Wt* (**figure 53, A**). Cet effet n'est pas observé chez les cellules *Acox1*^{-/-} (**figure 53, B**). De plus, la quercétine réduit significativement l'expression du gène pro-inflammatoire *Tnf-α* dans les cellules mutantes stimulées par du LPS pendant 24H par rapport au cellules contrôles.



*Figure 53: Effets des flavonoïdes (QE, IR, RU) et des composés phénoliques (VA, SA, FA) sur l'expression du gène d'inflammation *Tnf-α*. Les cellules microgliales BV-2 Wt et *Acox1*^{-/-} ont été prétraitées pendant 3H avec différentes concentrations (30–100 μM) de Flavonoïdes ou de composés phénoliques puis stimulées avec du LPS (1μg/ml) pendant 24h. Après avoir retiré le milieu, les ARN totaux ont été isolés puis utilisés pour la rétrotranscription. Le niveau d'expression des ARNm du gène *Tnf-α*, a été déterminé par analyse qPCR. Les résultats sont représentatifs de trois expériences indépendantes (**p < 0,01 vs contrôle (Wt/*Acox1*^{-/-}), ##p < 0,01 vs traitement LPS (Wt/*Acox1*^{-/-}).*

L'isorhamnetine à une dose de 30μM, a augmenté l'expression du gène pro-inflammatoire pour les cellules sauvages et cet effet est évident à 100μM pour les cellules mutantes (**Figure 53 A, B**). L'IR ne modifie pas l'expression du *Tnf-α* des cellules traitées avec du LPS, sauf pour les cellules mutantes où la concentration de 100μM a fait diminuer significativement l'expression du gène pro-inflammatoire *Tnf-α*. Quant à l'isorhamnetine-O-rutinoside (RU), nous observons à une répression significative de l'expression du gène *Tnf-α* à la fois dans les cellules sauvages et mutantes. L'effet LPS sur l'expression du *Tnf-α* a été modulé par le composé RU, comme le montre la **figure 53 A, B**. Les cellules mutantes prétraitées avec RU puis stimulées avec du LPS expriment moins le gène *Tnfα* par rapport au groupe contrôle LPS.

La vanilline (VA) diminue significativement l'expression de *Tnf-α* dans les cellules *Wt* et déficientes en ACOX1, mais n'entraîne aucun changement d'expression génique quand celles-ci sont stimulées avec du LPS (**Figure 53, C, D**). La syringaldéhyde (SA), augmente l'expression de *Tnf-α* à une dose de 30μM, cette induction n'est pas observée à une dose de 100μM de SA. Comme la VA, la Syringaldehyde ne provoque aucun changement dans l'expression de *Tnf-α* des cellules BV2 microgliales stimulées avec du LPS. Le férulaldéhyde (FA) augmente légèrement l'expression de *Tnf-α* dans les cellules sauvages à une concentration de 30μM, et il la diminue à une dose de 100μM. Alors que les cellules mutantes montrent une élévation significative de niveau d'expression de *Tnf-α* qui s'ajoute au taux d'induction médié par le traitement LPS (**Figure 53, D**). Comme le *Tnf-α*, le gène *Il-1β* est un pro-inflammatoire dont le taux d'expression a été évalué dans les cellules microgliales prétraitées avec les différentes molécules issues de cactus. La **figure 54E** montre, en comparaison avec les cellules sauvages *Wt*, que dans les cellules *Acox1*^{-/-} l'expression de *Il-1β* augmente faiblement mais significativement. Alors que le traitement LPS,

amplifiée avec un facteur 6 l'expression du gène *Il-1β*. Cet effet s'accroît avec la mutation au niveau du gène *Acox1* (Figure 54, E).

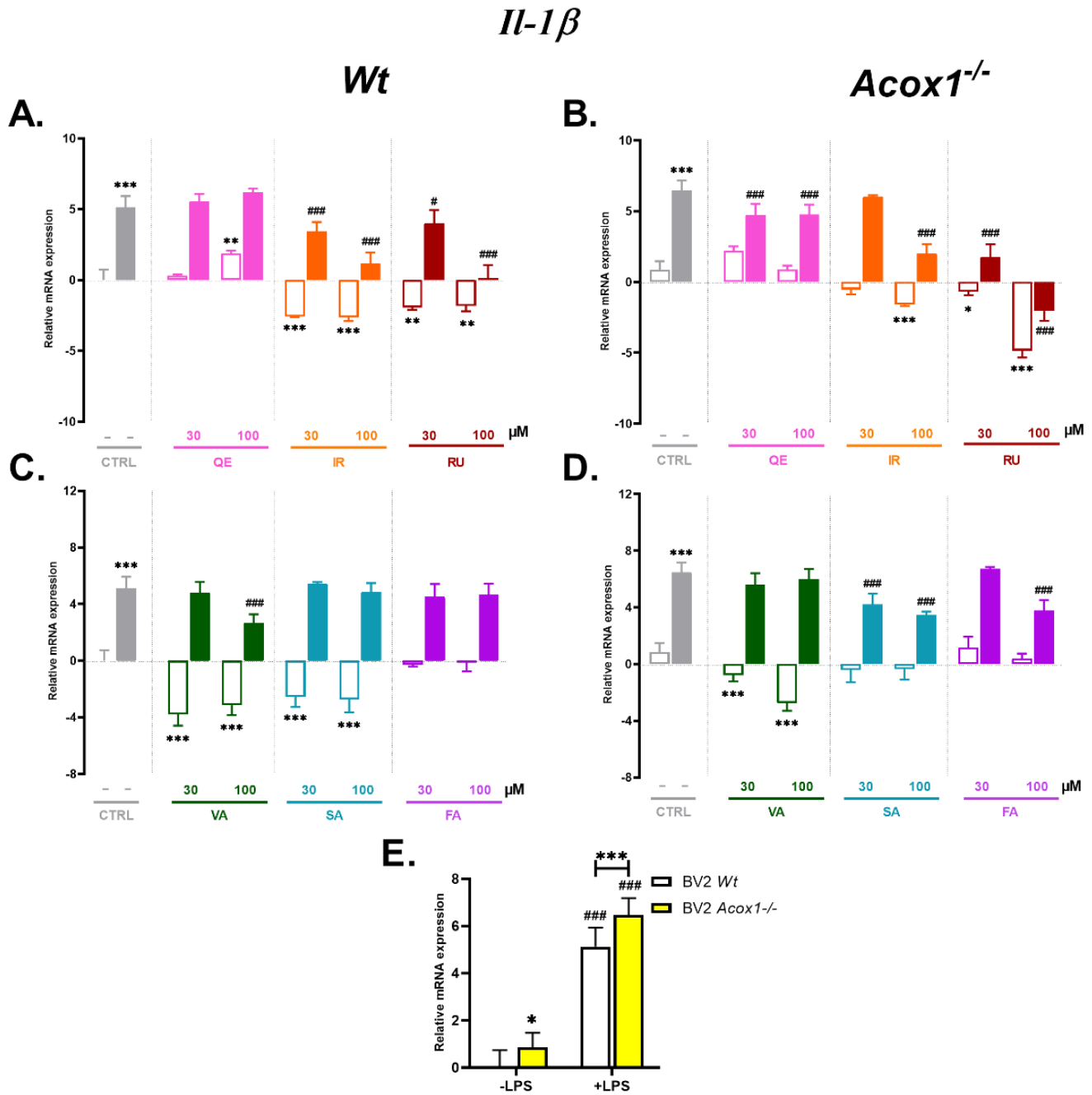


Figure 54: Effets des flavonoïdes (QE, IR, RU) et de composés phénoliques (VA, SA, FA) sur l'expression du gène d'inflammation *Il-1β*. Les cellules microgliales BV-2 Wt et *Acox1*^{-/-} ont été

*prétraitées pendant 3H avec différentes concentrations (30–100 µM) de Flavonoïdes ou de composés phénoliques puis stimulées avec du LPS (1µg/ml) pendant 24h. Après avoir retiré le milieu, les ARN totaux ont été isolés puis utilisés pour la rétrotranscription. Le niveau d'expression des ARNm du gène *Il-1β*, a été déterminé par analyse qPCR. Les résultats sont représentatifs de trois expériences indépendantes (**p < 0,01 vs contrôle (Wt/Acox1^{-/-}), ##p < 0,01 vs traitement LPS (Wt/Acox1^{-/-}).*

La quercétine (QE) entraîne une augmentation de niveau d'expression d'*Il-1β* dans les cellules sauvages et mutantes. Par contre, elle le diminue significativement pour les cellules mutantes stimulées avec du LPS (**Figure 54A, B**). L'isorhamnetine (IR) provoque une réduction significative de l'expression du gène *Il-1β* et particulièrement pour les cellules stimulées avec du LPS. A 100µM, l'isorhamnetine-O-rutinoside (IR) atténué notablement l'expression génique de l'*Il-1β*. Ajouter à cela, l'IR, montre un effet important sur l'expression du gène *Il-1β*. La RU a engendré une répression importante sur l'expression du gène *Il-1β* des cellules sauvages et mutantes (**Figure 54A, B**).

La vanilline (VA) provoque une réduction significative de l'expression d'*Il-1β* des cellules sauvages et mutantes (**Figure 54, C, D**). Seule la concentration 100µM de VA diminue l'expression d'*Il-1β* des cellules sauvages stimulées avec du LPS, cet effet n'est pas observé chez les cellules mutantes. La syringaldéhyde (SA) comme la vanilline réduit significativement le taux d'expression de l'*Il-1β* dans les cellules *Wt*. L'effet de répression sur l'expression d'*Il-1β* des cellules mutantes est beaucoup plus remarquable avec le traitement LPS. Les résultats montrent aussi que l'atténuation de l'expression du gène *Il-1β* par SA est dose-dépendante. En ce qui concerne le férulaldéhyde, nous n'observons pas d'effet sur l'expression du gène *Il-1β* des cellules sauvages et mutantes en comparaison avec les cellules contrôles *Wt* et *Acox1^{-/-}*. Par contre, nous remarquons une diminution d'expression significative dans l'expression du gène *Il-1β* dans les cellules mutantes traitées avec du LPS suite au prétraitement avec le FA à une dose de 100µM.

Nous avons évalué également le statut anti-inflammatoire des cellules microgliales suite aux différents traitements avec les flavonoïdes ou les composés phénoliques. Nous avons donc suivi l'expression du gène codant pour la cytokine IL-4, connue pour ces effets inhibiteurs remarquables sur l'expression et la libération des cytokines pro-inflammatoires. L'IL-4 est capable de bloquer ou de supprimer l'expression des cytokines pro-inflammatoires, y compris IL-1, TNF- α , IL-6, IL-8.

Il-4

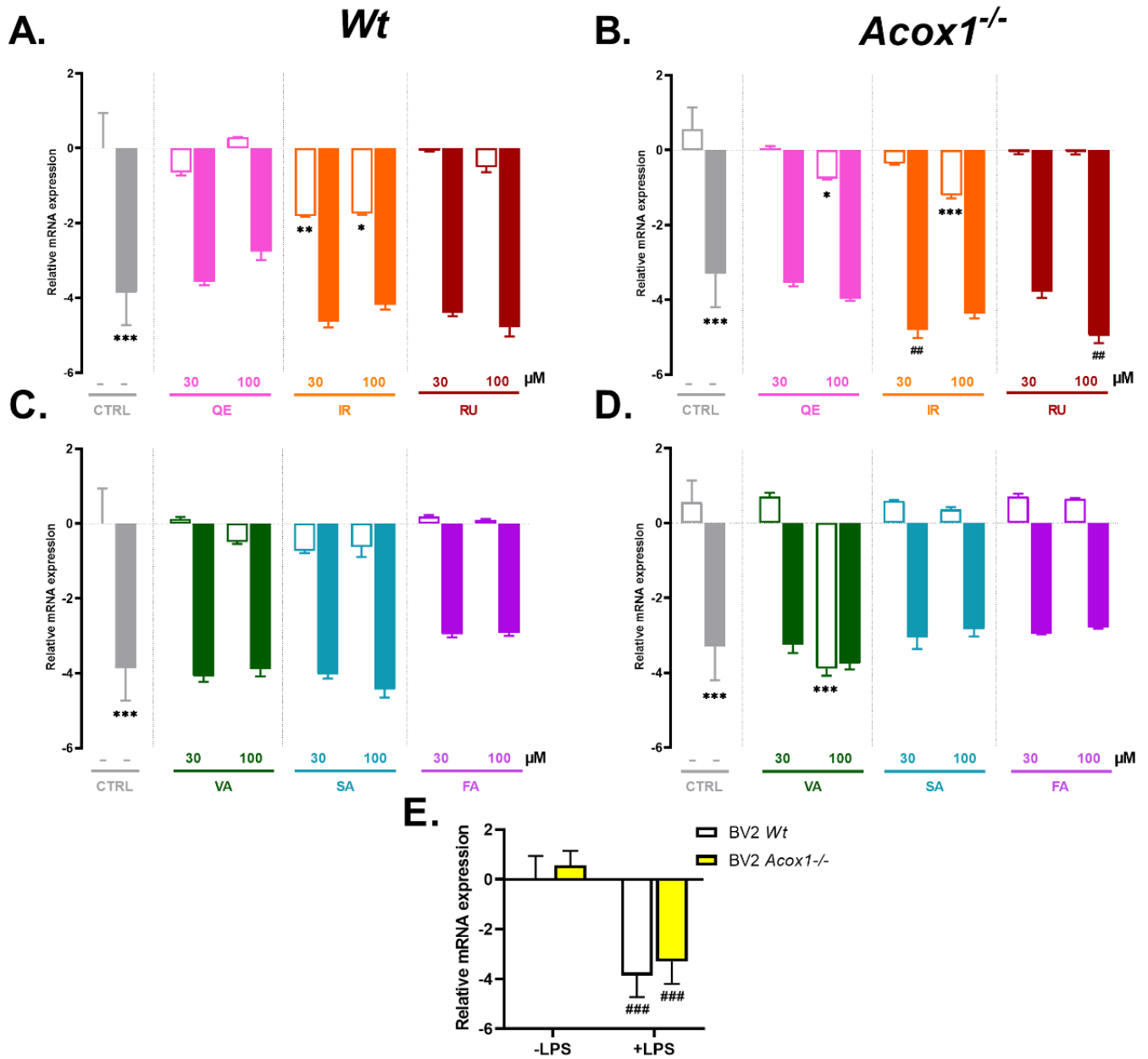


Figure 55: : Effets des flavonoïdes (QE, IR, RU) et des composés phénoliques (VA, SA, FA) sur l'expression génique du gène anti-inflammatoire *Il-4*. Les cellules microgliales BV-2 Wt et *Acox1*^{-/-} ont été prétraitées pendant 3H avec différentes concentrations (30–100 μM) de flavonoïdes ou des composés

*phénoliques puis stimulées avec du LPS (1µg/ml) pendant 24h. Après avoir retiré le milieu, les ARN totaux ont été isolés puis utilisés pour la rétrotranscription. Le niveau d'expression des ARNm du gène *Il-4*, a été déterminé par analyse qPCR. Les résultats sont représentatifs de trois expériences indépendantes (**p < 0,01 vs contrôle (Wt/Acox1-/-), ##p < 0,01 vs traitement LPS (Wt/Acox1-/-).*

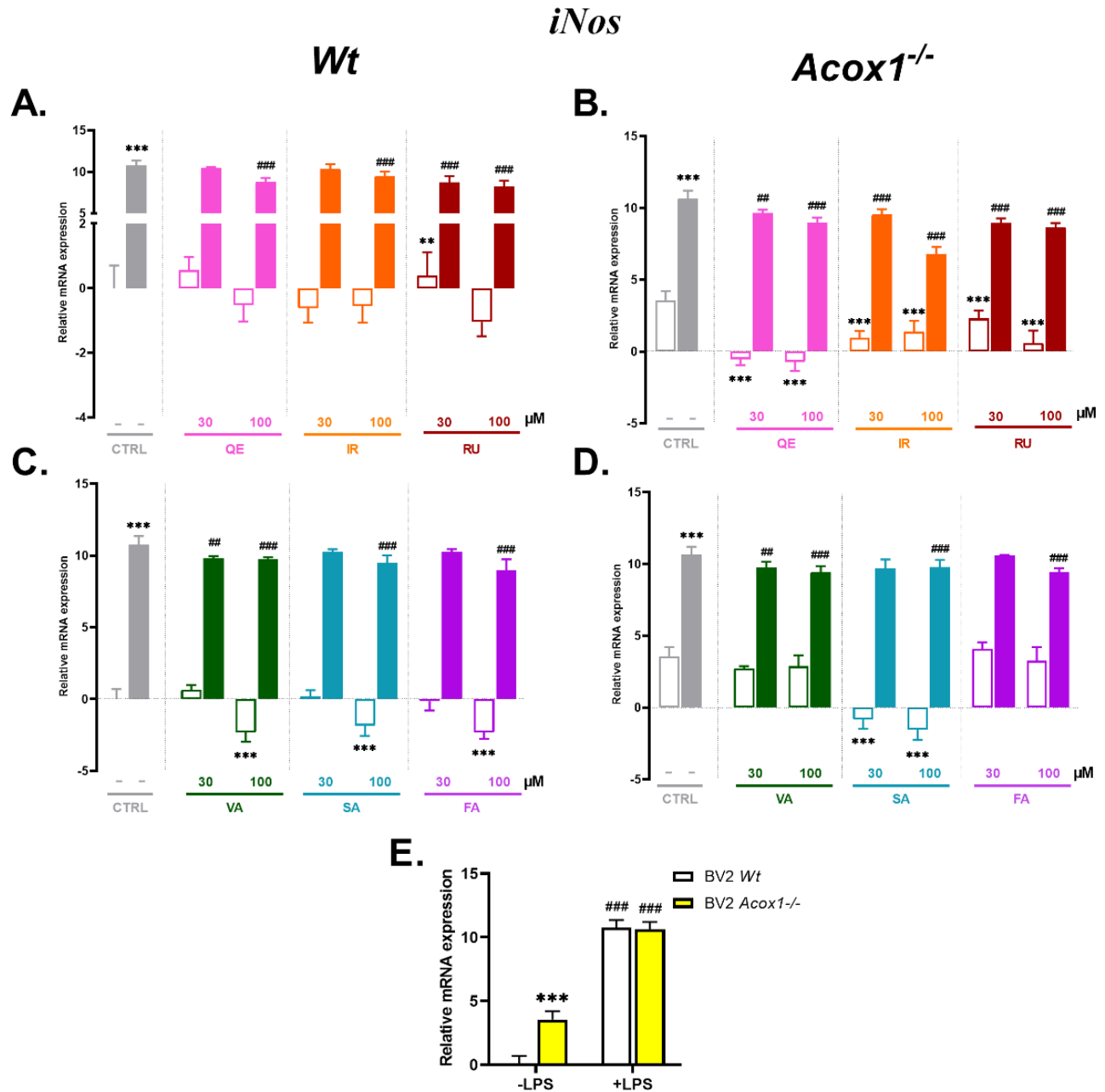
La **figure 55E** montre que l'absence du gène *Acox1*, se traduit par une stimulation de l'expression du gène *Il-4* dans les cellules BV2 microgliales, et le traitement LPS la diminue significativement. Une dose de 100µM de QA a permis d'augmenter l'expression du gène *IL-4*, et d'estomper l'effet LPS sur l'expression du gène *Il-4* des cellules sauvages (**Figure 55, A**). Les cellules mutantes ont réagi différemment au prétraitement avec la quercétine avec une diminution non-significative de l'expression du gène *Il-4* (**Figure 55, B**). Le prétraitement des cellules microgliales sauvages et mutantes pendant 3H avec l'IR à 30 ou à 100µM diminue significativement l'expression du gène *Il-4*. Ce résultat est similaire à celui obtenu avec le prétraitement de RU qui a provoqué une répression de l'expression du gène *Il-4*.

La vanilline (VA) n'affecte pas significativement l'expression du gène *Il-4* des cellules sauvages (**Figure 55, C**). Les cellules mutantes montrent une baisse dramatique de l'expression du gène *IL-4* avec un traitement de 100µM de vanilline (**Figure 55, D**). Pour la syringaldéhyde (SA), aucun changement significatif sur l'expression du *Il-4* n'est observé ni sur les cellules mutantes ni sauvages avec ou sans traitement LPS (**Figure 55 C, D**). De même, la férulaldéhyde n'affecte pas l'expression du gène *Il-4* des deux lignées cellulaires, et ne modifie pas significativement l'effet du LPS sur le taux d'expression du *Il-4*.

3.3.Gènes redox

Le traitement avec du LPS pendant 24H, n'induit pas seulement de l'inflammation mais aussi du stress oxydatif cellulaire. Pour explorer l'effet des prétraitements sur le statut redox des cellules microgliales, nous avons évalué l'expression génique de deux gènes (*iNos* et *Sod1*) qui codent pour des enzymes antioxydantes qui servent principalement à restaurer la balance Redox cellulaire déséquilibrée par le LPS. **La figure 56E** montre clairement que dans les cellules *Acox1*^{-/-} augmente significativement l'expression du gène *iNos* codant pour la forme inductible de l'oxyde

nitrique synthase, une enzyme oxydoréductase indépendante de Ca^{2+} dont l'expression peut être induite dans différents types cellulaires et de tissulaires par des cytokines. Dans le même sens, le traitement LPS étant un initiateur du stress oxydant, a provoqué une forte induction de l'expression du gène *iNos* des deux lignées cellulaires BV2 microgliales.



*Figure 56: Effets des flavonoïdes (QE, IR, RU) et des composés phénoliques (VA, SA, FA) sur l'expression génique du gène du stress oxydant *iNos*. Les cellules microgliales BV-2 Wt et *Acox1*^{-/-} ont été prétraitées pendant 3H avec différentes concentrations (30–100 µM) de flavonoïdes ou de composés phénoliques puis stimulées avec du LPS (1µg/ml) pendant 24h. Après avoir retiré le milieu, les ARN totaux ont été isolés puis utilisés pour la rétrotranscription. Le niveau d'expression des ARNm du gène *iNos*, a été déterminé par analyse qPCR. Les résultats sont représentatifs de trois expériences indépendantes (**p < 0,01 vs contrôle (Wt/*Acox1*^{-/-}), ##p < 0,01 vs traitement LPS (Wt/*Acox1*^{-/-}).*

Le traitement avec la quercétine (QE), l'isorhamnétine (IR) ou L'isorhamnetine-O-rutinoside (RU) diminue l'expression du gène *iNos* dans les cellules mutantes uniquement (**Figure 56, A, B**). L'effet inducteur du LPS sur l'expression du gène *iNos* s'atténue avec le prétraitement avec la quercétine. De même, l'isorhamnétine (IR) inhibe significativement l'expression du gène *iNos* dans les cellules sauvages et mutantes, particulièrement avec une concentration de 100µM. RU réduit également l'expression d'*iNos* dans les cellules sauvages et mutantes.

Le traitement avec les composés phénoliques, VA, SA ou FA (**Figure 56, C, D**), inhibe l'expression du gène *iNos* les cellules sauvages principalement à 100µM. Dans les cellules mutantes, seule SA montre un effet inhibiteur à 30 et 100µM. Le prétraitement par ces composés phénoliques atténue légèrement mais significativement l'effet inducteur du LPS sur l'expression d'*iNos* (**Figure 56, C, D**).

La superoxyde dismutase SOD1 est une enzyme antioxydante colocalisée dans le peroxydosome et codée par le gène *Sod1*. Elle catalyse la conversion du radical superoxyde en oxygène moléculaire et peroxyde d'hydrogène. Comme le montre **la figure 57E**, les cellules déficientes en *Acox1* montrent une diminution de l'expression des ARNm *Sod1* en comparaison avec les cellules sauvages. Le traitement LPS à court terme ne provoque aucun changement dans l'expression du gène *Sod1* dans les deux lignées.

Le traitement par la QE ou l'IR n'a pas d'effet sur le taux des ARNm *Sod1* dans les cellules sauvages et mutantes en comparaison avec les contrôles (**Figure 57 A, B**). Par contre, RU diminue l'expression du gène *Sod1*, particulièrement à une concentration de 100µM. Les cellules mutantes prétraitées avec 30µM d'IR et stimulées ensuite avec du LPS pendant 24H montrent une relative induction significative de l'expression de *Sod1*. Quant à la répression par RU de l'expression de *Sod1* dans les cellules sauvages et mutantes, s'estompe relativement en présence du LPS (**figure 57A, B**).

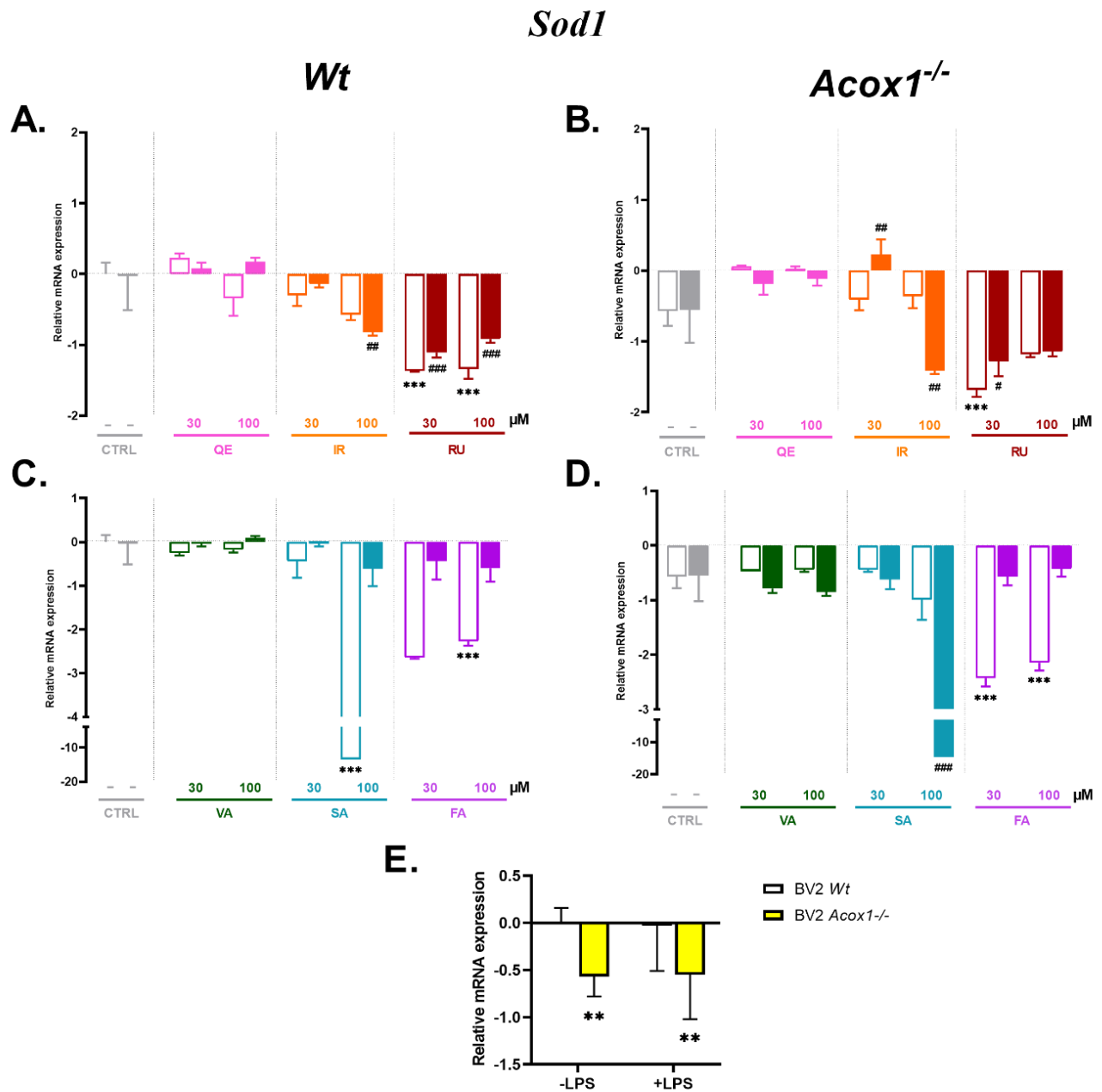


Figure 57 : Effets des flavonoïdes (QE, IR, RU) et des composés phénoliques (VA, SA, FA) sur l'expression génique du gène du stress oxydant Sod1. Les cellules microgliales BV-2 Wt et Acox1^{-/-} ont été prétraitées pendant 3H avec différentes concentrations (30–100 μM) de flavonoïdes et composés phénoliques puis stimulées avec du LPS (1μg/ml) pendant 24h. Après avoir retiré le milieu, les ARN totaux ont été isolés puis utilisés pour la rétrotranscription. Le niveau d'expression des ARNm du gène Sod1, a été déterminé par analyse qPCR. Les résultats sont représentatifs de trois expériences indépendantes (**p < 0,01 vs contrôle (Wt/Acox1^{-/-}), ##p < 0,01 vs traitement LPS (Wt/Acox1^{-/-}).

Pour les deux concentrations de VA à 30 et 100µM, nous n’observons pas de changement dans l’expression du gène *Sod1* dans les deux lignées cellulaires sauvages et mutantes (**Figure 57, C, D**). Curieusement, la baisse d’expression de *Sod1* provoquée uniquement par la concentration de 100µM de SA, est effective dans les cellules sauvages non traitées au LPS, alors que dans les cellules mutantes, cette forte baisse est observée uniquement en présence du LPS (**Figure 57, C, D**). Le FA exhibe un effet inhibiteur significatif sur l’expression des ARNm *Sod1* des cellules sauvages et mutantes. Cependant, cet effet se dissipe quand les cellules après le prétraitement FA sont ensuite exposées au LPS (**Figure 57, C, D**).

4. Effet sur l’expression des protéines

Nous avons réalisé l’analyse de l’expression de protéines impliquées dans les fonctions de biogenèse et β -oxydation peroxysomales, dans les fonctions lysosomales et dans l’inflammation. Cette partie du manuscrit est consacrée à présenter les résultats obtenus après analyse par western blot des extraits protéiques des cellules *Wt* et *Acox1*^{-/-} prétraitées pendant 3H avec un composé issu de cactus (flavonoïdes ou phénols), suivi d’un traitement LPS de 24H permettant l’induction d’un stress cellulaire. La caractérisation des modèles cellulaires BV2 microgliales effectuée précédemment a montré que l’absence de gènes peroxysomaux affectent considérablement l’expression génique et protéique des protéines lysosomales. Pour cette raison, la quantification des protéines ne s’est pas limitée seulement aux protéines peroxysomales et d’inflammation mais aussi les protéines lysosomales telles que les cathepsines B et K. L’ensemble des données présentées ci-après sous forme de graphes est le résultat d’une seule expérience.

4.1. Protéines peroxysomales

La **figure 58** montre l’effet des composés issus de cactus sur le taux d’expression de la protéine PEX11B, impliquée dans la biogenèse du peroxysome, dans les cellule sauvages et mutantes. Le traitement LPS des cellules microgliales diminue très légèrement l’expression du PEX11B des deux lignées cellulaires (**Figure 58 E**).

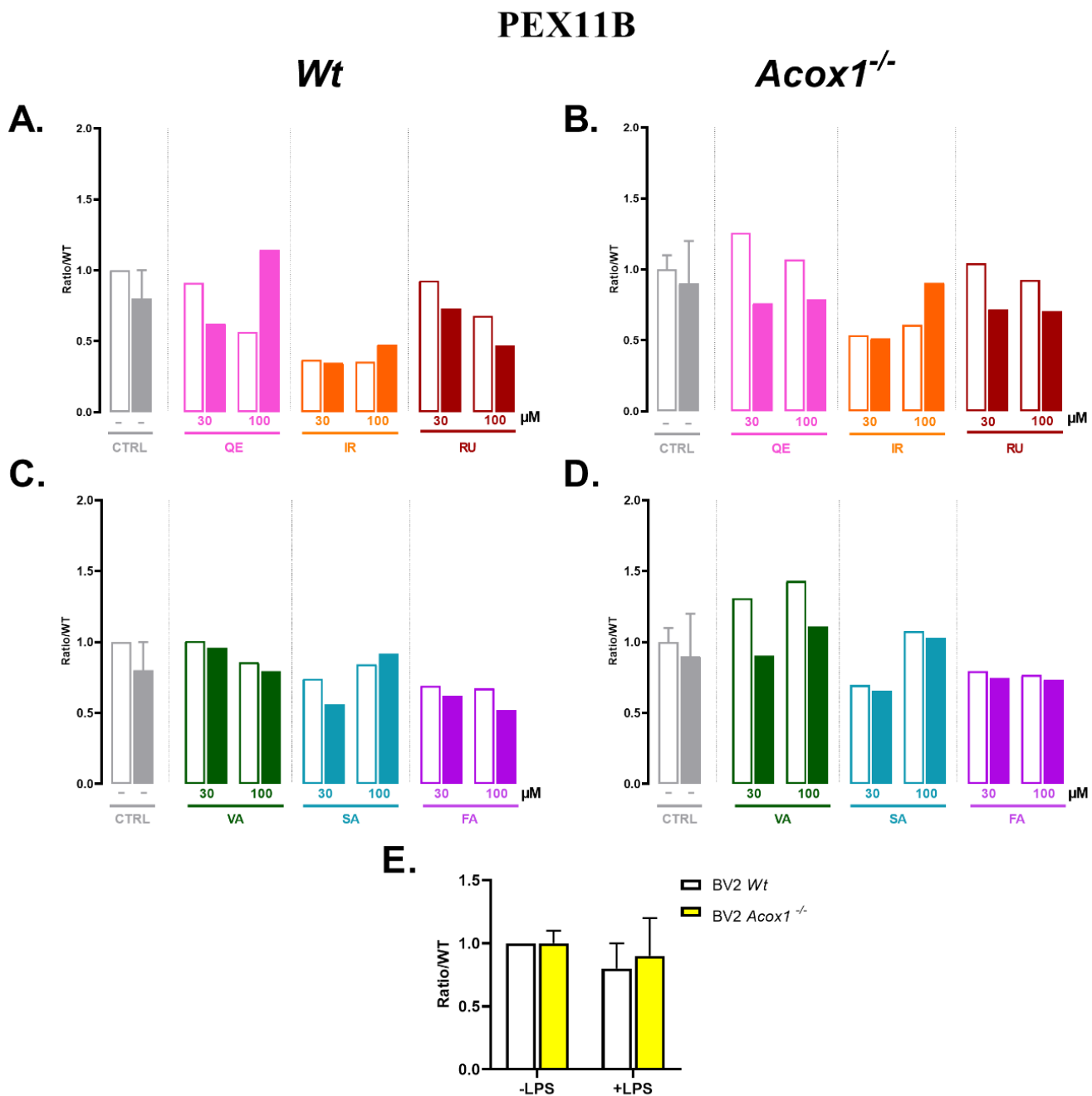


Figure 58: Effets des flavonoïdes (QE, IR, RU) ou des composés phénoliques (VA, SA, FA) sur l'expression protéique du PEX11B (26kDa). Les cellules microgliales BV-2 Wt et Acox1^{-/-} ont été prétraitées pendant 3H avec différentes concentrations (30 ou 100 μM) de flavonoïdes et de composés phénoliques puis incubées avec du LPS (1μg/ml) pendant 24h. Après une Lyse du culot cellulaire dans un tampon de lyse RIPA, 30μg de l'extrait protéique cellulaire ont été séparées sur un gel d'électrophorèse SDS-PAGE de 14% puis transférées sur une membrane PVDF et analysées par immunoblotting avec l'anticorps anti-Pex11b. Les résultats sont représentatifs d'une seule expérience.

*Après quantification de l'intensité des bandes par densitométrie, les résultats de ont été standardisés par ceux de l' α -tubuline et sont présentés sous forme de ratio par rapport au contrôle *Wt*.*

Trois heures de prétraitement avec QE à une dose de 100 μ M diminue l'expression protéique PEX11B des cellules *Wt*. Cependant, nous observons un effet opposé dans les cellules *Wt* traitées au LPS avec une augmentation du niveau d'expression protéique de PEX11B particulièrement à 100 μ M (**Figure 58, A**). Pour les cellules mutantes, le traitement QE augmente le niveau d'expression PEX11B par rapport au contrôle non traité (**Figure 58, B**). Les deux concentrations de QE ont réduit le taux d'expression PEX11B des cellules déficientes en *Acox1* stimulées avec du LPS (**Figure 58, A, B**). Quant au traitement avec IR, l'effet sur la protéine PEX11B est remarquable dans les deux lignées sauvages et mutantes. IR a diminué le niveau d'expression PEX11B dans les cellules *Wt* en comparaison avec le contrôle et avec les autres traitements des molécules issues de cactus (**Figure 58, A, C**). Les cellules mutantes *Acox1*^{-/-} montrent également une réduction de l'expression de PEX11B en réponse au traitement IR, sauf à la concentration de 100 μ M et suite au traitement LPS où le niveau d'expression de PEX11B est similaire à celui du contrôle traité au LPS (**Figure 58, B**). Le traitement des cellules microgliales BV2 avec RU montre une diminution de PEX11B principalement à 100 μ M.

Pour les composés phénoliques (**Figure 58, C, D**), la VA augmente principalement l'expression protéique de PEX11B dans les cellules mutantes (**Figure 58, D**). Le traitement avec du SA semble diminuer PEX11B dans les deux lignées cellulaires uniquement à 30 μ M et non à 100 μ M. Le FA engendre une faible diminution de PEX11B dans les cellules sauvages et mutantes. Alors que le niveau d'expression de PEX11B des cellules traitées avec du LPS est réduit par le FA au niveau de celui des cellules non traitées.

L'expression de la protéine HSD17B4, impliquées dans la voie de bêta-oxydation peroxysomale, au niveau des cellules microgliales n'est pas affectée par l'absence d'expression du gène *Acox1* ni par le traitement LPS (**Figure 59, graphe E**). Le traitement avec QE induit faiblement l'expression protéique de HSD17B4 dans les cellules sauvages, cet effet est beaucoup plus prononcé chez les cellules mutantes. (**Figure 59, A, B**)

HSD17B4

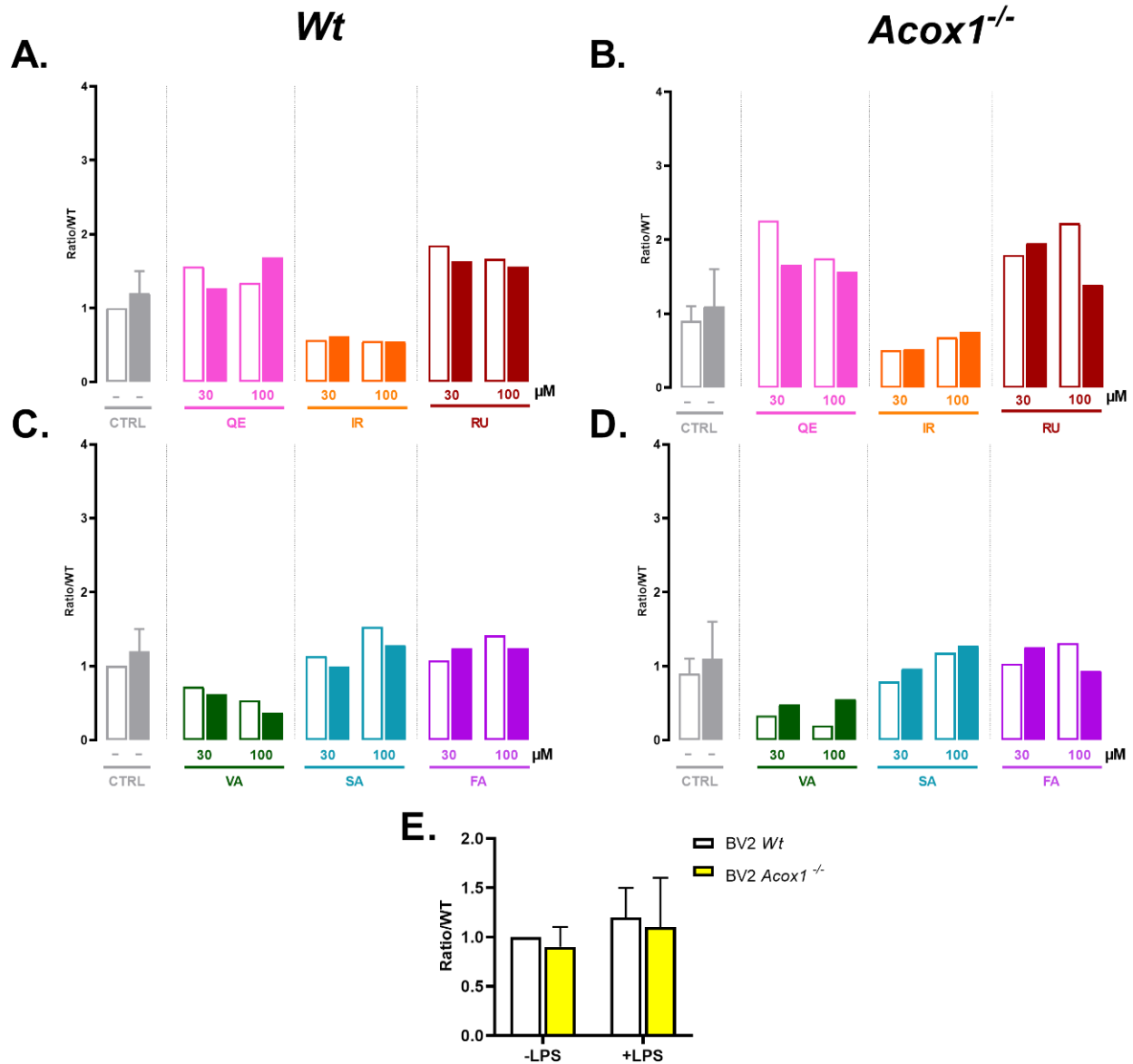


Figure 59: Effets des flavonoïdes (QE, IR, RU) et composés phénoliques (VA, SA, FA) sur l'expression protéique de l'enzyme bifonctionnelle du peroxysome HSD17B4 (80kDa). Les cellules microgliales BV-2 Wt et Acox1^{-/-} ont été prétraitées pendant 3H avec différentes concentrations (30–100 μM) de Flavonoïdes et composés phénoliques puis incubées avec du LPS (1μg/ml) pendant 24h flavonoïdes dans un tampon de lyse RIPA, 30μg de l'extrait protéique cellulaire ont été séparées sur un gel d'électrophorèse SDS PAGE de 12% puis transférées sur une membrane PVDF et analysées par immunoblotting avec l'anticorps Hsd17b4, Les résultats sont représentatifs d'une seule expérience.

Après quantification de l'intensité des bandes par densitométrie, les résultats de ont été standardisés par ceux de l' α -tubuline et sont présentés sous forme de ratio par rapport au contrôle Wt.

Effectivement, nous n'observons pas de différence remarquable entre les cellules traitées et non traitées avec du LPS au niveau du taux d'expression de HSD17B4. Comme PEX11B, l'expression d'HSD17B4 diminue en réponse au traitement avec IR, et cette répression affecte l'expression de HSD17B4 dans les cellules sauvages et mutantes avec ou sans traitement au LPS (**Figure 59, A, B**). Par contre, le prétraitement avec RU montre un effet presque similaire à celui de QE, où RU provoque une augmentation de l'expression protéique de HSD17B4 en comparaison avec les contrôles des deux lignées cellulaires (**Figure 59, A, B**).

Le prétraitement avec VA conduit à une répression de l'expression du HSD17B4 des cellules sauvages et mutantes (**Figure 59, C, D**). Alors que le SA n'entraîne pas de grandes modifications dans l'expression de la protéine HSD17B4 par rapport aux groupes contrôles. On remarque aussi que l'effet de SA sur l'expression de HSD17B4 est dépendant de la concentration utilisée pour le traitement. FA n'altère pas véritablement l'expression d'HSD17B4 dans les cellules BV2 microgliales. Les faibles variations observées peuvent être liées aux doses de traitement FA (**Figure 59, C, D**). Les cellules sauvages stimulées avec du LPS, leur niveau d'expression de HSD17B4 à 30 μ M est comparable à celui à 100 μ M (**Figure 59, C**). Alors que dans les cellules mutantes, traitées aux LPS, l'expression d'HSD17B4 à 100 μ M est plus faible par rapport à son niveau d'expression à 30 μ M (**Figure 59, D**).

4.2. Protéines lysosomales

Récemment, des résultats obtenus au laboratoire (publication soumise) de séquençage d'ARN, issus des cellules microgliales BV-2 sauvages ou déficientes en ACOX1, ont permis de révéler une dérégulation -entre autres- de l'expression de gènes impliqués dans les fonctions lysosomales. Parmi ces gènes, nous avons retrouvé les gènes codants pour des cathepsines lysosomales. Comme rapporté précédemment (§ 2.3.1 pp29), nous avons exploré cette dérégulation de l'expression des cathepsines au niveau l'expression des cathepsines B et K dans les deux lignées microgliales *Wt* et *Acox1*^{-/-}. Afin d'examiner l'effet des traitements sur les

perturbations lysosomales des cellules mutantes, nous avons décidé de mesurer l'expression protéique de deux protéines lysosomales la Cathepsine B et la Cathepsine K dans les cellules BV2 microgliales des deux lignées cellulaires *Wt* et déficientes en *Acox1*^{-/-}.

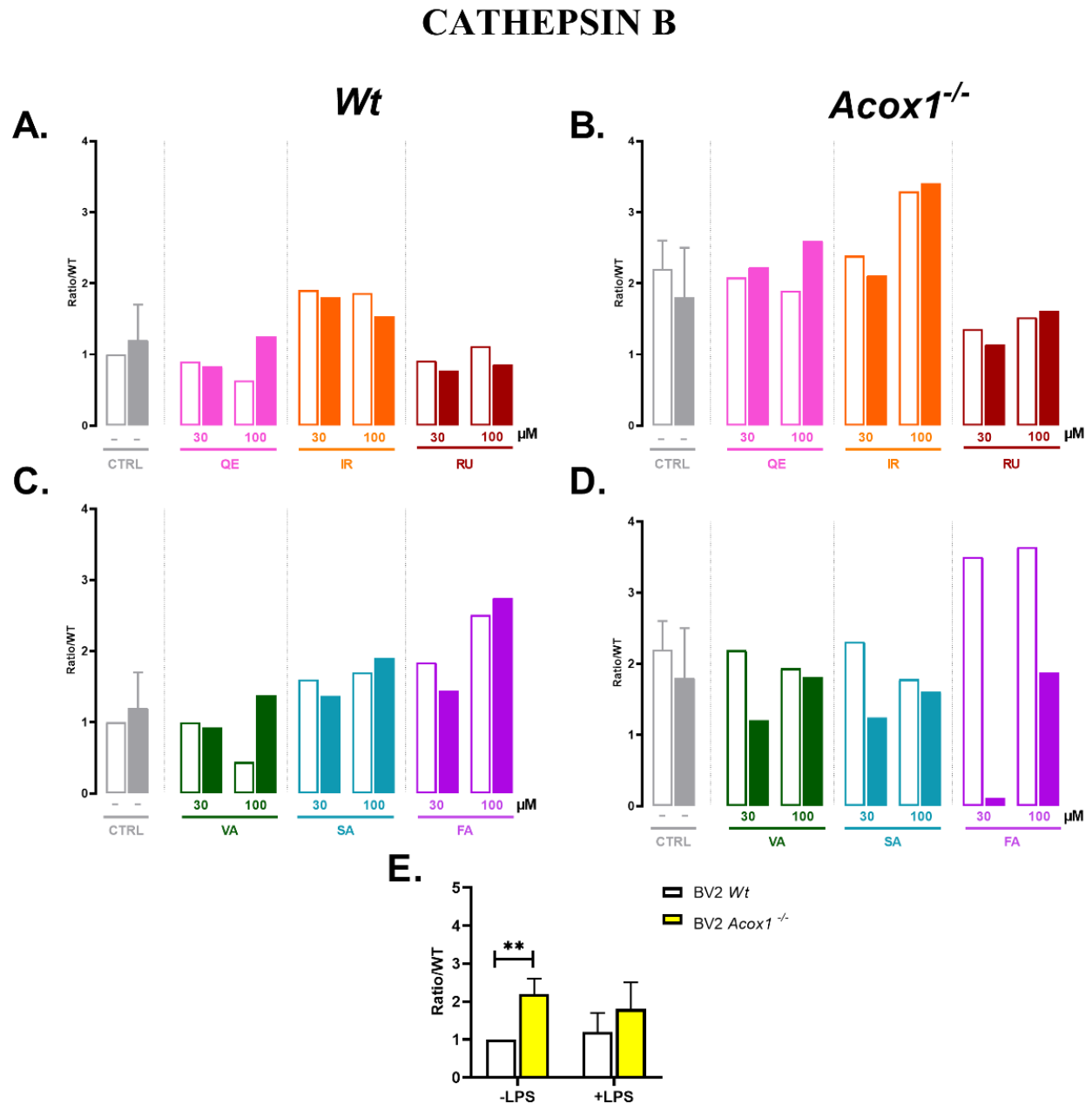


Figure 60: Effets des flavonoïdes (QE, IR, RU) et de composés phénoliques (VA, SA, FA) sur l'expression protéique de la Cathepsine B (38kDa). Les cellules microgliales BV-2 *Wt* et *Acox1*^{-/-} ont été

prétraitées pendant 3H avec différentes concentrations (30–100 μ M) de flavonoïdes ou de composés phénoliques puis incubées avec du LPS (1 μ g/ml) pendant 24h. Après une Lyse du culot cellulaire dans un tampon de lyse RIPA, 30 μ g de l'extrait protéique cellulaire ont été séparées sur un gel d'électrophorèse SDS PAGE de 12% puis transférées sur une membrane PVDF et analysées par immunoblotting avec l'anticorps Cathepsine B, Les résultats sont représentatifs d'une seule et unique expérience. Après quantification de l'intensité des bandes par densitométrie, les résultats de ont été standardisés par ceux de l' α -tubuline et sont présentés sous forme de ratio par rapport au contrôle Wt.

La cathepsine B est une protéase lysosomale intervenant dans différentes voies de signalisation cellulaires telles que l'inflammation. Comme montré dans nos résultats précédents et confirmé une nouvelle fois dans les données présentées ci-dessus, Le déficit cellulaire en ACOX1 provoque une augmentation significative dans l'expression protéique de la cathepsine B (**Figure 60, graphe E**). En accord avec les résultats précédents, le traitement LPS ne modifie pas l'expression de la Cathepsine B dans les cellules sauvages et mutantes en comparaison avec les groupes contrôles (**Figure 60, graphe E**).

Le traitement avec QE diminue faiblement l'expression de la CATHB et cet effet s'inverse quand les cellules sont prétraitées avec QE à 100 μ M puis stimulées avec du LPS pendant 24H (**Figure 60, A, B**). Tandis que le traitement avec l'IR stimule clairement l'expression protéique de CATHB. A une dose de 100 μ M, l'IR induit l'expression de la cathepsine B des cellules mutantes en présence ou non du LPS (**Figure 60, B**). Contrairement à l'IR, RU diminue légèrement l'expression de la CATHB des cellules mutantes, mais l'effet sur les cellules sauvages était moins évident.

Concernant les composés phénoliques, le traitement par VA réduit l'expression de la cathepsine B des cellules BV2 microgliales Wt principalement à 100 μ M, et augmente cette expression quand ces cellules sont traitées avec du LPS (**Figure 60, C, D**). Le traitement au SA montre que la CATHB dans les cellules sauvages est faiblement surexprimée, alors que cette expression est inhibée dans les cellules mutantes. Le traitement au FA provoque une augmentation de l'expression de CATHB dans les cellules sauvages et de façon plus remarquable dans les cellules mutantes. Nous remarquons que l'exposition au LPS se traduit par une diminution importante dans l'expression de la CATHB principalement dans les cellules mutantes (**Figure 60, D**).

La CATHK est une cystéine protéase, membre de la famille des cathepsines lysosomales. Nos résultats précédents ont montré que le déficit en β -oxydation peroxysomale dans les cellules BV2 microgliales affectent le taux d'expression de la CATHK présente dans les milieux intra- et extra-cellulaires. Dans cette partie de notre investigation, nous avons exploré l'effet des traitements avec des flavonoïdes ou des composés phénoliques sur la surexpression de la CATHK dans les cellules microgliales déficientes *Acox1*^{-/-} et traitées ou non avec du LPS.

CATHEPSIN K

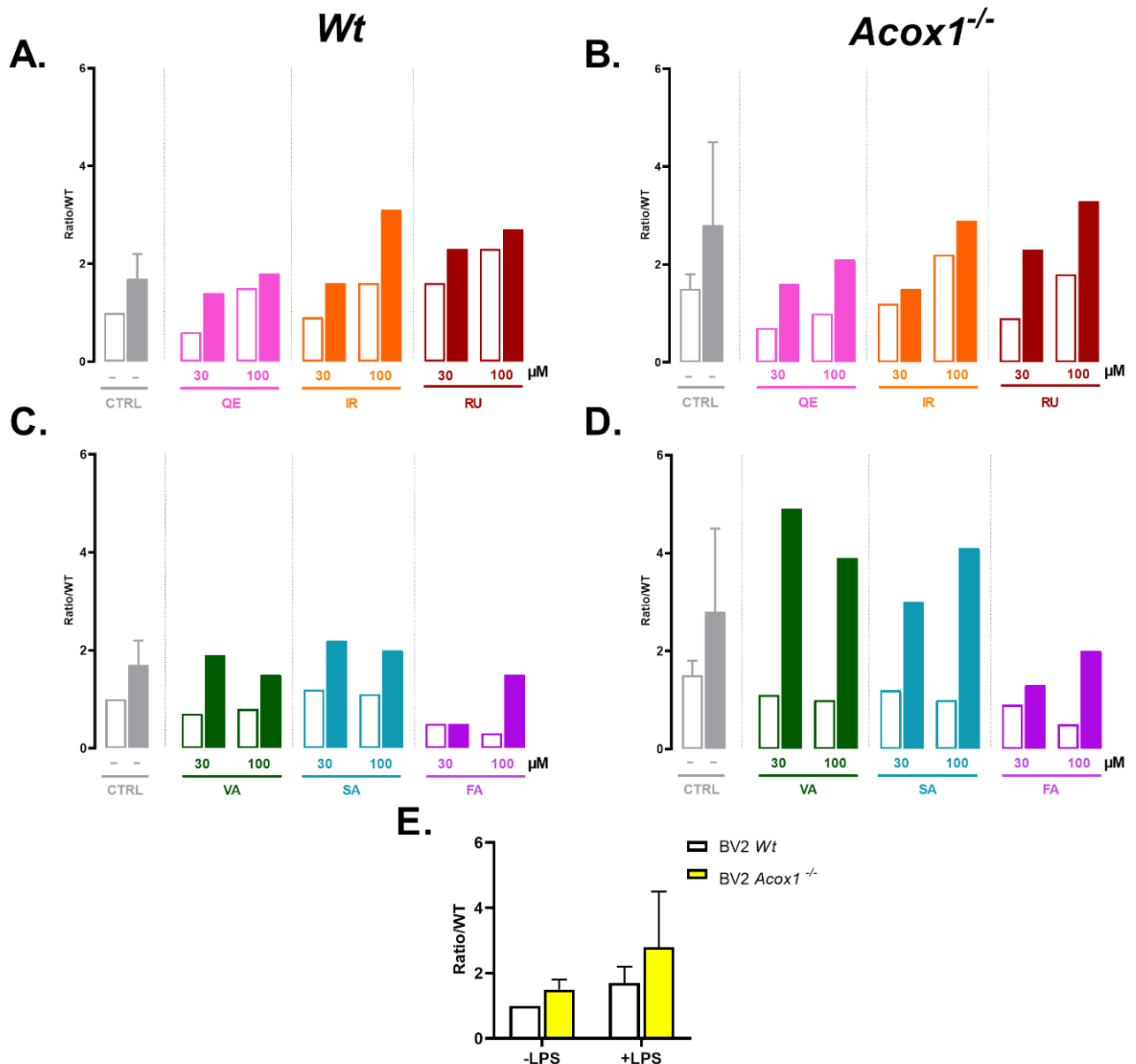


Figure 61: Effets des flavonoïdes (QE, IR, RU) et composés phénoliques (VA, SA, FA) sur l'expression protéique de la Cathepsine K (28kDa). Les cellules microgliales BV-2 Wt et Acox1^{-/-} ont été prétraitées pendant 3H avec différentes concentrations (30–100 µM) de Flavonoïdes et composés phénoliques puis incubées avec du LPS (1µg/ml) pendant 24h. Après une Lyse du culot cellulaire dans un tampon de lyse RIPA, 30µg de l'extrait protéique cellulaire ont été séparées sur un gel d'électrophorèse SDS PAGE de 12% puis transférées sur une membrane PVDF et analysées par immunoblotting avec l'anticorps anti-Cathepsine K. Les résultats sont représentatifs d'une seule et unique expérience. Après quantification de l'intensité des bandes par densitométrie, les résultats de ont été standardisés par ceux de l'α-tubuline et sont présentés sous forme de ratio par rapport au contrôle Wt.

La figure 61, graphe E, confirme l'augmentation relative de l'expression protéique de la cathepsine K causée par la déficience en ACOX1 et suite au traitement LPS des deux lignées cellulaires sauvages et mutantes. Le traitement QE ne modifie que légèrement l'expression CATHK (**Figure 61, A, B**). QE diminue l'expression de la CathK dans les cellules sauvages et mutantes. L'induction de l'expression de CATHK médiée par LPS dans les cellules mutantes est relativement estompée par le traitement QE (**Figure 61, B**). Le prétraitement avec l'IR pendant 3H modifie l'expression de CATHK, nous constatons une augmentation de l'expression de CATHK. Quant au traitement par RU, il provoque également une augmentation de la CATHK des cellules BV2 microgliales sauvages par rapport aux groupes contrôle (**Figure 61, A**). Pour les cellules mutantes, la concentration de 30µM de RU diminue faiblement l'expression de la CATHK (**Figure 61, B**). Les composés phénoliques semblent agir différemment sur l'expression de la CATHK (**Figure 61, C, D**). Nous observons que le traitement par la VA entraîne une diminution dans l'expression de la protéine cathepsine K des cellules *Wt* et *Acox1^{-/-}*. Cependant, les cellules stimulées avec le LPS, suite au prétraitement VA à une concentration de 30µM, montre une forte augmentation de l'expression de la CATHK, et cet effet semble être atténué légèrement à une dose de 100µM de VA (**Figure 61, C, D**). Le SA n'affecte l'expression de la CATHK des cellules sauvages comparativement au contrôle (**Figure 61, C**). Le SA réduit faiblement la CATHK dans les cellules mutantes. En revanche, suite au traitement LPS, cette expression est augmentée et de manière plus importante dans les cellules mutantes (**Figure 61, D**). Le traitement avec le FA, réprime clairement l'expression de la CATHK dans les deux lignées cellulaires et cet effet était beaucoup plus notable sur les cellules traitées avec du LPS pendant 24H (**Figure 61, C, D**).

4.3. Protéines d'inflammation

Le potentiel anti-inflammatoire des flavonoïdes (Quercétine, Isorhamnetine, Isorhamnetine-O-rutinoside) et des composés phénoliques (Vanilline, Syringaldehyde, Ferulaldehyde) a été évalué sur les cellules BV2 microgliales sauvages et mutantes stimulées avec du LPS pendant 24H. Pour cette raison, nous avons analysé par western blot l'expression protéique de deux protéines de l'inflammation NLRP3 et IL-1 β .

La **figure 62, E** montre que le traitement LPS stimule l'expression de la NLRP3 dans les cellules sauvages et un peu plus dans les cellules mutantes. Le traitement par QE engendre une diminution dans l'expression de NLRP3 des cellules sauvages (**Figure 62, A**). Une concentration de 100 μ M de QE suivi d'un traitement LPS amplifie l'expression de NLRP3 des cellules BV2 microgliales. De même, le traitement avec IR, induit le niveau d'expression de la protéine NLRP3 des cellules sauvages par rapport aux contrôles et cet effet est reproduit de manière un peu plus importante dans les cellules mutantes (**Figure 62, A, B**). Tandis que le traitement avec RU réduit faiblement l'expression de la NLRP3 des cellules *Wt* stimulées avec du LPS, alors que les cellules déficientes en ACOX1, ayant reçu un traitement LPS, montrent plutôt une augmentation de l'expression de NLRP3, principalement à 100 μ M (**Figure 62, A, B**).

En ce qui concerne les composés phénoliques (**Figure 62, C, D**), la VA diminue relativement l'expression de NLRP3 des cellules sauvages et mutantes, mais après le traitement LPS, nous retrouvons une augmentation de NLRP3 concentration-dépendante. Pour le SA, nous observons une réduction relative de NLRP3. Alors que dans les cellules stimulées avec du LPS, nous constatons une augmentation de NLRP3, principalement à 100 μ M de SA (**Figure 62, C, D**). Aussi bien dans les cellules sauvages ou mutantes, le FA seul n'a pas d'effet sur l'expression de NLRP3. Cependant, comme SA, le prétraitement par FA suivi de traitement LPS induit le taux de NLRP3 dans les cellules mutantes. (**Figure 62, C**). La **figure 62 graphe D** montre que l'expression de la NLRP3 est induite de manière concentration-dépendante

NLRP3

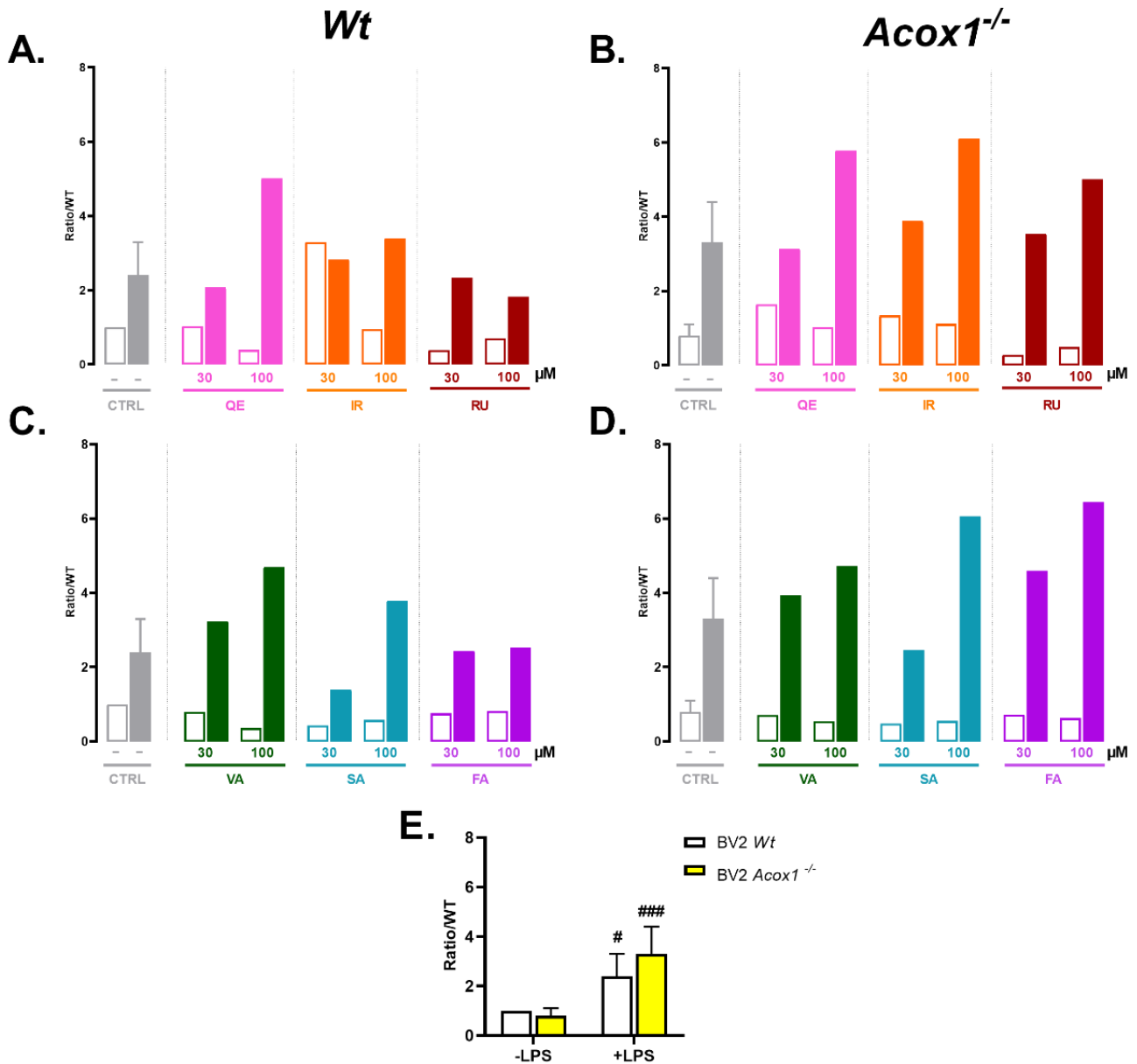


Figure 62: Effets des flavonoïdes (QE, IR, RU) et de composés phénoliques (VA, SA, FA) sur l'expression protéique de la NLRP3 (85kDa). Les cellules microgliales BV-2 Wt et Acox1^{-/-} ont été prétraitées pendant 3H avec différentes concentrations (30–100 μM) de flavonoïdes et de composés phénoliques puis incubées avec du LPS (1μg/ml) pendant 24h. Après une Lyse du culot cellulaire dans un tampon de lyse RIPA, 30μg de l'extrait protéique cellulaire ont été séparées sur un gel d'électrophorèse SDS PAGE de 12% puis transférées sur une membrane PVDF et analysées par immunoblotting avec l'anticorps anti-Nlrp3. Les résultats sont représentatifs d'une seule et unique

expérience. Après quantification de l'intensité des bandes par densitométrie, les résultats de ont été standardisés par ceux de l'α-tubuline et sont présentés sous forme de ratio par rapport au contrôle Wt.

Comme présenté auparavant, l'expression génique d'*Il-1β* est altérée par le déficit peroxysomal et le traitement LPS. Ici, nous montrons que le traitement LPS induit une forte production d'IL-1β par les cellules sauvages et cette induction s'accroît encore plus dans les cellules déficientes en ACOX1 (**Figure 63, graphe C**).

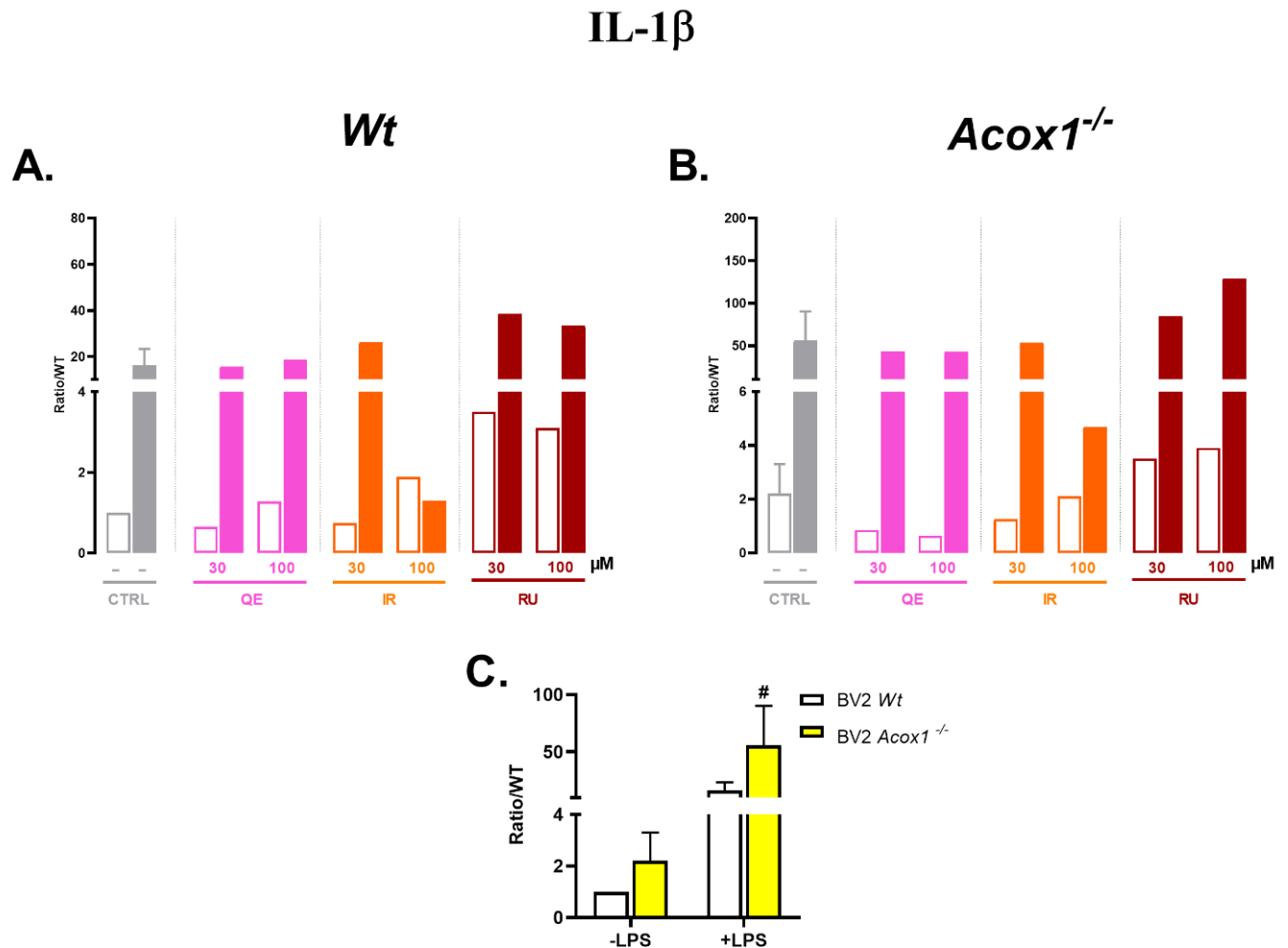


Figure 63 Effets des flavonoïdes (QE, IR, RU) sur l'expression protéique de *IL1B* (31kDa). Les cellules microgliales BV-2 Wt et *Acox1*^{-/-} ont été prétraitées pendant 3H avec différentes concentrations (30–100

μM de flavonoïdes puis incubées avec du LPS (1μg/ml) pendant 24h. Après une Lyse du culot cellulaire dans un tampon de lyse RIPA, 30μg de l'extrait protéique cellulaire ont été séparés sur un gel d'électrophorèse SDS PAGE de 12% puis transférées sur une membrane PVDF et analysées par immunoblotting avec l'anticorps anti-IL-1β. Les résultats sont représentatifs d'une seule expérience. Après quantification de l'intensité des bandes par densitométrie, les résultats ont été standardisés par ceux de l'α-tubuline et sont présentés sous forme de ratio par rapport au contrôle Wt.

Le traitement avec QE inhibe l'expression d'IL-1β uniquement dans les cellules mutantes (**Figure 63, B**). En présence de LPS, le niveau très élevé d'expression d'IL-1β ne varie pas même si les cellules sauvages ou mutantes ont été prétraitées avec QE (**Figure 63, A**). Par contre, IR montre, à une concentration de 100μM, une répression remarquable dans l'expression d'IL-1β dans les cellules sauvages ou mutantes stimulées avec du LPS (**Figure 63, A, B**). Tandis que RU ne fait qu'augmenter l'expression d'IL-1β dans les deux lignées cellulaires ayant reçu ou pas le traitement LPS aux deux concentrations utilisées de RU (**Figure 63, A, B**).

vii. La modulation de l'inflammation et le stress oxydatif, provoqués par l'absence du gène Acox1 et le traitement LPS, par des composés issus de cactus : flavonoïdes et composés phénoliques

Les propriétés anti-inflammatoires et antioxydantes de flavanols et de phénols présents dans les produits naturels ont été décrites dans plusieurs publications internationales (Bezerra et al. 2016; Kumar et al. 2011; Zhou et al. 2017; Matias et al. 2014). L'objectif de notre travail a été de tester, d'évaluer et de comparer le pouvoir antioxydant et anti-inflammatoire de six molécules naturelles différentes issues de cactus à deux concentrations, 30 et 100μM. La perspective de ces travaux est une évaluation du potentiel thérapeutique, d'un ou plusieurs de ces composés, contre les dommages oxydatifs et inflammatoires induits par : (i) soit l'altération des fonctions peroxysomales liée à l'absence de l'activité ACOX1 ; (ii) et/ou les endotoxines bactériennes comme les LPS. Cette évaluation nous a amené à effectuer des analyses par RT-qPCR, par western Blot et par dosage de NO afin de quantifier le taux d'expression de gènes, d'enzymes impliqués dans la β-oxydation peroxysomale et dans l'inflammation, pour comprendre le mécanisme d'action moléculaire responsable du pouvoir anti-inflammatoire et anti-oxydant de ces dérivés de cactus.

L'effet des molécules sur la viabilité cellulaire a été évalué par le test de MTT. Une étude faite par Xu et al. a montré que l'incubation des cellules neuronales PC12 avec de l'isorhamnetine (à 10μM pendant 72H) entraîne une augmentation de la viabilité cellulaire (S. L. Xu et al. 2012). Dans nos résultats, nous avons constaté également une légère augmentation de viabilité cellulaire

des cellules BV2 sauvages après un traitement IR 10 μ M de 48H. C'est également le cas pour l'isorhamnetine-O-rutinoside (RU), qui augmente la viabilité cellulaire à une concentration de 10 μ M dans les deux lignées cellulaires sauvages et mutantes des cellules BV2 microgliales. Dans une étude de Beken et al., la quercétine devient cytotoxique à partir d'une concentration de 25 μ M (Beken et al. 2020). Les trois composés phénoliques, vanilline (VA), syringaldéhyde (SA) et férulaldéhyde (FA) n'exercent aucun effet cytotoxique sur les cellules BV2 sauvages et mutantes même à une concentration maximale de 100 μ M. Dans l'article de Salau et al., les auteurs indiquent que VA n'exerce aucune toxicité sur les cellules cérébrales et elle est capable de traverser la barrière hématoencéphalique contrairement à l'acide vanillique (Salau et al. 2020). Les caractéristiques physico-chimiques des composés naturels jouent un rôle important dans le mécanisme d'action moléculaire des composés. L'addition d'un groupement glycosyl peut modifier la solubilité, l'absorption et l'effet de la molécule. La présence d'un groupement glycosyl dans la quercétine glycoside augmente sa solubilité dans l'eau par rapport à la quercétine aglycone (Ross et al. 2002; Hollman et al. 1999). Contrairement au férulaldéhyde, la quercétine a une faible biodisponibilité due à sa faible absorption et par son élimination rapide (Radnai et al. 2009; Yao Li et al. 2016). Ceci suggérerait que la mort cellulaire constatée des cellules BV2 à partir de concentrations de 30 μ M est peut-être dû à la faible absorption et la métabolisation des flavanols par les cellules microgliales. Par conséquent, l'accumulation extracellulaire des dérivés de cactus et de leurs métabolites peut causer la cytotoxicité cellulaire des cellules microgliales BV2 sauvages et mutantes. De plus, l'absorption et la stabilité métabolique des flavonoïdes avec un groupement méthyl est plus importante que les flavanols dépourvus de groupement méthyl (Jaramillo et al. 2010). Cette propriété rend de l'isorhamnetine un composé plus actif que la quercétine. Les polyphénols contiennent au moins un cycle aromatique contenant un ou plusieurs groupements hydroxyyles (van Duynhoven et al. 2011). En raison de leurs noyau phénolique et la chaîne latérale avec un radical phénoxy stable, rend ces molécules des composés à fort potentiel antioxydant (Graf 1992).

Dans nos conditions expérimentales, les cellules BV2 microgliales *Wt* et *Acox1*^{-/-} sont incubées 3H pour un prétraitement avec une molécule issue de cactus à une concentration de 30 ou de 100 μ M, puis sont incubées avec du LPS pendant 24H. L'endotoxine bactérienne LPS se lie au récepteur TLR4-MD-2, sachant que la protéine MD-2 est nécessaire pour reconnaître le LPS. La formation du complexe TLR4/MD-2/LPS est essentielle pour activer la voie de signalisation TLR4

dans les macrophages. Une fois que TLR4 reconnaît la molécule de LPS, il subit une oligomérisation permettant de recruter des protéines adaptatrices telle que la MyD88, qui induit l'activation des voies de signalisation MAPK (mitogen-activated protein kinase), impliquant la c-Jun N-terminal kinase et (JNK) et p38 MAPK (Zhong et al. 2007; Fang et al. 2007). Ensuite, la MAPK active les facteurs de transcription AP-1 et NFκB (Y. H. Kim et al. 2005; Jp et al. 2008). Ensuite, la translocation de NFκB du cytoplasme vers le noyau déclenche la production des molécules pro-inflammatoires. Ces facteurs de transcription induisent l'expression génique de cytokines et chimiokines (TNFα, IL-1, IL-8, IL-12) (Jp et al. 2008; A. Murakami et al. 2005), ainsi que l'expression de cyclooxygénase (COX-2), l'oxyde nitrique (NO)-synthase inductible (iNOS), et les molécules d'adhésion cellulaire (Woo et al. Kwon 2007; Chiu et al. 2008). De plus, la surexpression de COX2 et d'iNOS, augmente la production de NO et des ROS. Comme le montre nos résultats, nous constatons également une augmentation dans l'expression des médiateurs inflammatoires et une augmentation de production de NO des cellules microgliales sauvages et mutantes stimulées avec du LPS. La production excessive de cytokines est considérée comme une cause majeure d'inflammation systémique ou septicémie (Hotchkiss et al. 2016). En plus, l'activation des réponses immunitaires pro-inflammatoires est souvent associée à l'apparition et le développement des maladies neurodégénérative. Donc, l'inhibition des facteurs pro-inflammatoires pourrait diminuer la neurodégénérescence et ralentir la progression de la maladie.

Plusieurs études ont décrit la capacité des flavonoïdes et les composés phénoliques à inhiber le processus inflammatoire et à protéger contre la neurodégénérescence (Bastianetto et al. 2006; Szwajgier et al. 2017; Spencer et al. 2012; Vauzour 2014; Suk 2005; Vafeiadou et al. 2007) (Szwajgier, Borowiec, et Pustelniak 2017). Les polyphénols atténuent la neuroinflammation par l'inhibition de l'activation des microglies et la répression de l'expression des cytokines pro-inflammatoires, iNOS et COX-2 (Spencer et al. 2012; Vauzour 2014). Le pouvoir anti-inflammatoire des polyphénols et des produits naturels est souvent lié à la modulation des mécanismes de signalisation moléculaire qui impliquent p38MAPK, JNK, AP-1 et NFκB (Stalińska et al. 2005; Gonzales et al. 2008). Le traitement des cellules BV2 microgliales avec du LPS pendant 24H augmente la production du NO. Cette production de NO est exacerbée dans les cellules déficientes en *Acox1*, ce qui prouve pour une nouvelle fois que l'absence de l'activité ACOX1 cause du stress cellulaire dans les cellules microgliales. Les six molécules testées flavanols (QE, IR, RU) et phénols (VA, SA, FA) atténuent la production de NO par les cellules

sauvages et mutantes traitées avec du LPS. Ce qui signifie que les dérivés de cactus exercent un effet inhibiteur sur l'expression de iNOS, l'enzyme synthétisant le NO. En effet, le traitement des cellules mutantes avec les flavanols a diminué significativement l'expression génique de cytokines pro-inflammatoires *Tnf- α* et *Il-1 β* induites par la déficience en *Acox1* et/ou le traitement LPS. L'absence d'*Acox1* et le traitement avec du LPS augmentent l'expression génique de *iNos* et diminuent celle de *Sod1*. Toutes les molécules flavanols et phénols diminuent l'expression génique de *iNos* dans les cellules BV2 microgliales sauvages et mutantes stimulées avec du LPS.

D'après les résultats présentés précédemment dans ce manuscrit, l'absence des gènes peroxysomaux entraîne un dysfonctionnement au niveau lysosomal, l'autophagie et provoque une altération dans la fonction de phagocytose des cellules BV2 microgliales. Vasko et al. (Vasko et al. 2013) ont montré que le dysfonctionnement lysosomal affecte aussi la fonction peroxysomale et entraîne une accumulation de peroxysomes. Ainsi, les cellules avec un déficit lysosomal montrent un niveau de stress oxydatif et de cytokine pro-inflammatoire très élevés. Nous avons montré que l'expression protéique de l'enzyme lysosomale cathepsine B est impactée principalement par la déficience peroxysomale, alors que le LPS n'a induit aucun changement dans l'expression de cette protéine lysosomale des cellules contrôle. Tandis que l'expression de la cathepsine K est impactée par le traitement LPS et la déficience en *Acox1*. L'isorhamnetine augmente l'expression de la CATHB des cellules mutantes avec un effet dose-dépendant. Un traitement avec 30 μ M d'isorhamnetine-O-rutinoside ou de vanilline diminuent l'expression protéique de la cathepsine B des cellules BV2 microgliales. La quercétine, l'isorhamnetine, l'isorhamnetine-O-rutinoside ou le férulaldéhyde diminuent chacun l'expression de la CATHK dans les cellules mutantes traitées avec du LPS. L'isorhamnetine-O-rutinoside réduit l'expression protéique des deux protéines lysosomales CATHB et CATHK.

Dans l'ensemble des résultats, nous observons que la déficience en *Acox1* diminue l'expression des gènes peroxysomaux *Abcd3*, *Hsd17b4*, des récepteurs nucléaires *Ppar α* , *Ppar β* , de la cytokine pro-inflammatoire *Tnf- α* , et de l'enzyme antioxydante *Sod1*. Et augmente l'expression de la *Catalase*, *Pex11b*, *Ppar γ* , *IL-1 β* , *IL-4*, et *iNos*. Vasko et al. , rapportent, après injection de LPS aux souris (WT) contrôles, une diminution de l'activité et du taux protéique d'ACOX1 et une réduction dans l'expression protéique CAT sans altération de son activité enzymatique, suivi après par une restauration des niveaux d'expression de CAT et ACOX. Les auteurs décrivent cette

expression des enzymes peroxysomales comme biphasique, et c'est également le cas pour les protéines ABCD3 et PEX14. L'augmentation de l'activité ACOX1 génératrice de la molécule H₂O₂ et la diminution de l'expression de la catalase cause un déséquilibre dans la balance redox peroxysomale. Ce déséquilibre métabolique oxydatif provoque une altération supplémentaire des fonctions peroxysomales, avec une augmentation du stress oxydatif et l'aggravation des lésions organiques (Vasko et al. 2013). Le traitement LPS des cellules BV2 microgliales, diminue l'expression génique de *Abcd3*, *Hsd17b4*, *Pparα*, *Pparγ*, *Il-4* et augmente l'expression de *Catalase*, *Pparβ*, *Tnf-α*, *IL-1β*, *iNos*, et l'expression protéique de CATHK, NLRP3 et IL-1B.

Les deux sources de stress cellulaire, la déficience en *Acox1* et le LPS, diminuent l'expression du gène *Abcd3* codant pour la protéine ABCD3/PMP70 qui participe au transport des acides gras à travers la membrane peroxysomale. D'après Vasko et al. , le traitement LPS induit temporairement une pexophagie, qui se manifeste par la diminution de taux d'expression d'ABCD3 et de PEX14, et la réduction de la densité de peroxysomes et de lysosomes, suivie après par une augmentation dans la prolifération des peroxysomes (Vasko et al. 2013). Ici dans notre étude, la déficience en *Acox1* a causé également une répression dans l'expression génique d'*Abcd3* et une induction de la peroxine *Pex11β*. Le traitement VA et QE augmentent davantage l'expression de PEX11B des cellules déficientes en *Acox1*. Le traitement des cellules avec IR, RU ou FA diminuent l'expression protéique de PEX11B. Les deux molécules Isorhamnetine et férulaldéhyde ont inversé l'effet du LPS, en augmentant l'expression du gène peroxysomale. L'isorhamnetine induit l'expression d'*Abcd3*, de *Cat* et de *Hsd17b4* et diminue celle de *Pex11β*. Les traitements SA et FA n'affectent pas l'expression protéique de HSD17B4. Contrairement aux résultats de RTqPCR, l'expression protéique de HSD17B4 augmente avec le traitement QE et RU. Alors qu'elle diminue avec un prétraitement IR et VA. Les résultats sur l'effet des molécules sur l'expression des protéines peroxysomales sont à prolonger par un traitement au cours du temps, vu que l'expression biphasique, décrite plus haut, se terminant par une phase de restauration des fonctions peroxysomales. L'expression de PPARα, augmente dans les souris avec des lysosomes défectueux, contrairement aux souris sauvages, ce qui contribue à la préservation d'ACOX1. L'activation de PPARα peut représenter un mécanisme de compensation pour activer les peroxysomes dysfonctionnels (Vasko et al. 2013). Nos résultats montrent que l'expression génique

des récepteurs nucléaire *Ppara* est réprimée dans les cellules mutantes et les cellules traitées avec du LPS.

La quercétine (QE), comme indiqué précédemment, est un flavonoïde lipophile possédant de puissantes activités anti-inflammatoire et antioxydante. Elle peut traverser la barrière hématoencéphalique (Ferri et al. 2015), ce qui rend de cette molécule un candidat à potentiel thérapeutique pour le traitement des maladies neurodégénératives et des lésions neuronales (Bagad et Khan 2015). QE est capable de stabiliser les mastocytes et de protéger le tractus gastro-intestinal (Yao Li et al. 2016). Plusieurs exemples montrent l'effet inhibiteur de QE sur la production des cytokines pro-inflammatoires (Yoon et al. 2012). Une dose de 10 μM de QE diminue l'expression de COX-2, de NF- κB , et de NO (Ramyaa et al. 2014). Dans une autre étude 10–25 μM de QE inhibe l'expression de NO et de TNF- α (Mrvová et al. 2015). De même, chez l'homme, 25 μM de QE bloque les sécrétions de IL-1 β , IL-6, IFN- γ , et TNF- α induits par LPS dans le plasma (Ribeiro et al. 2015). Comalada et al., montrent qu'à des concentrations en dessous de 50 μM , QE stimule l'expression des cytokines anti-inflammatoires IL-10 (Comalada et al. 2006). Il faut noter que, le traitement avec QE était capable d'augmenter l'expression du gène anti-inflammatoire *Il-4* dans les cellules microgliales BV-2 *Wt* traitées avec du LPS. A des concentrations plus élevées de 50 et 100 μM , QE réduit le taux de secretion de IL-6 et TNF- α des macrophages RAW 264.7 stimulées avec du LPS (Mueller et al. 2010). Des doses intermédiaires de 25 et 50 μM ont été considérées les plus efficaces pour bloquer la sécrétion de TNF- α dans les macrophages. Egert et al., ont constaté que la prise journalière de 150 milligrammes de QE pendant six semaines a permis de réduire significativement la concentration de TNF- α dans le plasma humain (Egert et al. 2009). Ils ont démontré également que la QE diminue le stress oxydatif et l'inflammation induits par les ROS en supprimant la production de l'oxydase NOX2 dans les cellules épithéliales pulmonaires (Sul et Ra 2021). Non seulement, QE peut atténuer l'inflammation dans l'athérosclérose par l'inhibition de la voie de signalisation Gal-3-NLRP3 (H. Li et al. 2021). Nos résultats montrent que 30 μM de QE induisent une légère diminution du taux d'expression protéique de NLRP3 des cellules BV2 sauvages et mutantes traitées aux LPS. D'autres études ont également démontré que la QE supprimait l'activation de l'inflammasome NLRP3 dans des modèles de lésions hépatiques induites par l'éthanol ou l'isoniazide (S. Liu et al. 2018; Yueming Zhang et al. 2020). De plus, la QE atténue la réponse inflammatoire des cellules endothéliales provoquée par *Escherichia coli* (O157:H7) ou une vascularite médiée par IL-1 en inactivant l'inflammasome NLRP3 (Xue et al. 2017;

Domiciano et al. 2017). Une étude récente *in vitro* réalisée sur des macrophages RAW264.7 montre que le traitement avec QE atténue la réponse inflammatoire et le stress oxydatif induit par LPS (Tang et al. 2019). Le prétraitement des kératinocytes avec 1,5 μ M de QE réduit significativement l'expression de IL-1 β , IL-6, IL-8, et augmente l'expression de SOD1, SOD2, catalase, GPx, et IL-10 dans des kératinocytes, modèle cellulaire de dermatites atopique, traités par un cocktail composé de IL-4, IL-13, et TNF- α (Beken et al. 2020). Ces observations ont été confirmées par d'autres études *in vivo*, (Bagad et al. 2015; Dora et al. 2021) montrant le pouvoir antioxydant de QE. En effet, dans nos modèles de microglie, QE a pu induire légèrement l'expression génique de *Sod1* des cellules sauvages et mutantes. 100 μ M de QE augmente l'expression du gène *Cat* dans les cellules déficientes en *Acox1* stimulées avec du LPS. De plus, QE et son métabolite l'isorhamnetine sont capables de protéger les hépatocytes HepG2 contre la cytotoxicité cellulaire induite par un carcinogène grâce à l'activation de la voie de signalisation impliquant Nrf2 (*nuclear factor erythroid 2-related factor 2*) qui régule l'expression des gènes codant les enzymes antioxydantes (M. Kim et al. 2021). Il a été suggéré que la diminution des ROS par QE augmente l'expression de PGC1 α qui permet d'activer la voie de signalisation NRF2 (*nuclear respiratory factor 2*) (Sharma et al. 2015). *In vitro et in vivo* la quercétine exerce son effet anti-athérogénique par l'induction de l'expression des gènes *Ppar γ* et *Lxr α* et *Abca1* (Jia et al. 2019; S.-M. Lee et al. 2013; L. Sun et al. 2015; K. Ren et al. 2018) (S.-M. Lee et al. 2013) (L. Sun et al. 2015). PPAR γ , régule le métabolisme lipidique par l'activation de l'expression de LXR α et ABCA1 (Majdalawieh et al. 2010; Zhao et al. 2018). Tandis que nos résultats montrent que le traitement avec QE diminue davantage l'expression du gène *Ppar γ* dans les cellules BV2 microgliales. Dans les cellules gliales il a été montré que la QE peut inhiber l'expression génique de *Tnf- α* induite par LPS et de IL-1 α ce qui diminue l'apoptose des cellules neuronales induite par l'activation des cellules microgliales (Bureau et al. 2008).

L'isorhamnetine (IR) est un flavanol aglycone connu pour ces propriétés anti-inflammatoires, et ses activités antioxydante et antitumorale (Lu et al. 2018; Ramachandran et al. 2012). Liu et al., ont montré que IR inhibe la cirrhose développée chez les souris par la réduction de l'autophagie et la régulation de la voie de signalisation TGF- β 1/p38 MAPK (N. Liu et al. 2019). L'IR démontre son effet hépato-protecteur sur les souris par l'inhibition de l'apoptose et l'autophagie par la voie P38/PPAR α (Lu et al. 2018). De plus, l'IR est capable d'induire l'expression de PPAR γ dans les

hépatocytes de souris (F. Zhang et al. 2013; Z. Wang et al. 2011). Zhang et al., montrent que l'administration d'extrait riche en flavonoïdes diminue l'expression de NFκB, iNOS, COX-2, TNFα, IL-1β, IL-4, IL-6, par la modulation des voies de signalisation JNK, ERK et p38 MAPK dans un modèle de rat avec une ischémie cérébrale (S. Zhang et al. 2013). Une autre étude démontre que IR est un agoniste de PPARγ (Ramachandran et al. 2012). Alors que dans nos résultats, l'IR réprime significativement l'expression des gènes *Ppara* et *Pparγ* des cellules sauvages et mutantes. Zhang et al., confortent en partie nos résultats en indiquant que l'IR serait plutôt un antagoniste spécifique de PPARγ (Yu Zhang et al. 2016). Ils ont montré que IR inhibe l'activation de PPARγ induite par son agoniste, la rosiglitazone, mais pas celle de PPARα, PPARβ/δ ou LXR (α et β) avec un effet dose-dépendant (Yu Zhang et al. 2016). Dans le cas d'une lésion cérébrale, IR atténuerait la réponse inflammatoire et l'apoptose par l'activation de la voie de signalisation Akt/SIRT1/Nrf2/HO-1 des neurones de l'hippocampe HT22 (Y. Wu et al. 2021). De plus, il a été rapporté que la régulation de la voie de signalisation de SIRT1/Nrf2 permet de réduire le stress oxydatif, l'inflammation, et l'apoptose cellulaire dans le cas de lésion cérébrale aggravée par l'hyperglycémie diabétique (Linyang Chen et al. 2019). L'effet antioxydant de l'IR a été confirmé une fois de plus dans l'étude réalisée sur les cellules neuronales PC12 (Cho et al. 2017). Le traitement des cellules HT22 avec de l'IR permet de réduire le taux de MDA et d'augmenter l'expression des enzymes antioxydantes SOD et GPx (Y. Wu et al. 2021). Une concentration de 30μM d'IR permet d'induire l'expression génique de *Sod1* des cellules déficientes en *Acox1* avec ou sans traitement LPS. Ajouter à cela, l'expression du gène *Cat* augmente dans les cellule sauvages et mutantes ayant reçues ou pas un traitement LPS. Sur un modèle de septicémie induite par *E. coli* chez les souris, le traitement avec l'IR permet de réduire le niveau d'expression des cytokines pro-inflammatoires dans le plasma et les poumons, et d'augmenter la longévité chez les souris traitées (Chauhan et al. 2019). De plus, l'IR a une activité anti-inflammatoire distincte est capable de réduire l'expression des gènes inflammatoires dans les macrophages de souris stimulés aux LPS (Boesch-Saadatmandi et al. 2011). IR inhibe la phosphorylation de IκBα et de la sous-unité p65 de NFκB chez un modèle de souris de la maladie intestinale inflammatoire de Crohn (Dou et al. 2014). Ren et al., ont rapporté que le traitement des cellules épithéliales pulmonaires BEAS-2B avec de l'IR diminue significativement l'expression des cytokines pro-inflammatoire IL-1β, IL-6, IL-8 induites par TNFα (X. Ren et al. 2021). IR atténue les effets induits par l'alimentation riche en graisse et en fructose par l'inhibition des voies

de signalisation MAPK et NFκB de souris obèses (Mulati et al. 2021). Dans nos résultats, la cytokine inflammatoire IL-1β est induite dans les cellules traitées avec du LPS et les cellules mutantes. Une concentration de 100μM de IR entraîne une diminution notable de l'expression protéique d'IL-1β des cellules sauvages et mutantes traitées aux LPS. Galati et al. (Galati et al. 2003) ont observé que le jus de fruit d'*Opuntia ficus-indica* contenant majoritairement de l'isorhamnetin-3-O-rutinoside (RU) présente une activité antioxydante importante, par l'inhibition de la formation des ROS (X. Zhang et al. 2018). En effet, Le traitement RU augmente l'expression génique *Cat* des cellules sauvages traitées ou non avec des LPS, de manière dose-dépendante, mais réprime significativement l'expression de *Sod1* par rapport aux cellules contrôles. L'effet anti-inflammatoire de RU, est constaté dans les cellules sauvages traitées aux LPS, dans lesquelles RU diminue l'expression protéique de l'inflammasome NLRP3. De plus, à une concentration de 30μM RU induit l'expression du gène *Ppara*.

Kim et al. (M. E. Kim et al. 2019) rapportent que la vanilline (VA) inhibe la production de NO et l'expression des médiateurs pro-inflammatoires iNOS, IL-1β, IL-6, et TNF-α, dans les cellules BV2 stimulées avec du LPS (Yan et al. 2017). Les auteurs expliquent ces résultats par l'effet suppresseur de VA sur la voie de signalisation NFκB. Nos résultats ont montré que VA réduit significativement la production de NO par l'inhibition de l'expression d'*iNos* et diminue l'expression des cytokines pro-inflammatoires. Salau et al., ont observé qu'*ex-vivo* VA possède un pouvoir neuroprotecteur sur les lésions cérébrales induites par le Fe²⁺. De plus, dans les tissus traités avec la VA, ces auteurs observent une restauration des activités des enzymes antioxydantes GPx, SOD et catalase, accompagnée d'une diminution des taux de MDA et de NO (Salau et al. 2020). Cependant, nos résultats, dans les cellules microgliales sauvages ou mutantes, ne montrent aucune induction de l'expression des gènes *Cat* et *Sod1* par la VA, alors qu'elle induit l'expression de *Ppara*. Une autre étude *in vitro* conduite par Yan et al., décrit l'effet protecteur de VA sur les neurones dopaminergiques de rat contre l'inflammation et la mort cellulaire induites par LPS via l'inhibition de la voie de signalisation ERK1/2, P38 et NFκB (Yan et al. 2017). En plus de son rôle neuroprotecteur, plusieurs études ont rapporté que VA peut exercer un effet anti-inflammatoire sur les tissus périphériques comme le foie, le colon et sur les macrophages (Makni et al. 2011; S.-L. Wu et al. 2009).

Le Syringaldéhyde (SA) appartient au groupe des composés phénoliques (C. Y. Lee et al. 2009), connus pour leurs nombreux effets : antioxydant, antithrombotique, antihypertensive, anti-inflammatoire et anti-carcinogénique. Le SA réduit significativement l'expression d'*Il-1β*, une cytokine pro-inflammatoire, dans les cellules sauvages et déficientes *Acox1*^{-/-} stimulées avec du LPS. De plus, l'expression de la protéine NLRP3, induite par le LPS dans les cellules *Acox1*^{-/-}, semble être réduite après traitement par SA à 30μM. Ceci pourrait expliquer la répression significative de l'expression d'*Il-1β* constatée dans les cellules sauvages et mutantes. Ajouter à cela, l'induction par SA, principalement dans les déficientes *Acox1*^{-/-}, l'expression de *Ppara*, connu pour ses capacités de régulation anti-inflammatoires. Dans ce sens, Malçok et al., ont démontré que l'administration de SA peut réduire le stress oxydatif et la migration cellulaire inflammatoire dans la moelle épinière ischémique de lapin (Malçok et al. 2020).

Radnai et al., ont testé *in vivo* l'effet du Férulaldéhyde (FA) chez des souris traitées avec du LPS et ont démontré que l'administration intrapéritonéale de FA (6 mg/kg) augmente la durée de vie des souris et réduit la réponse inflammatoire par l'inhibition des cytokines pro-inflammatoires TNF-α, IL-1β, et augmente l'expression de la cytokine anti-inflammatoire IL-10 (Radnai et al. 2009). FA diminue les radicaux libres et la production de NO dans le foie de souris traitées avec du LPS et Interféron-γ. Ces endotoxines bactériennes induisent la production des molécules pro-inflammatoires dans les cellules endothéliales et épithéliales, les neutrophiles, les macrophages et les lymphocytes (Ulloa et al. 2005). Il a été rapporté que FA inhibe la synthèse de NO induite par le LPS dans les macrophages RAW 264.7 de souris (N. Y. Kim et al. 1999). De même, nos résultats montrent que le prétraitement de 3H avec FA réduit considérablement la production de NO par les cellules *Wt* et *Acox1*^{-/-} stimulées avec du LPS. Et une dose de 100μM réduit significativement le taux d'expression d'*Il-1β* dans les cellules déficientes en *Acox1*. Nos résultats sont corroborés par d'autres études montrant que la forme oxydée de FA (acide férulique), atténue la production des molécules pro-inflammatoires, NO et TNF-α dans les macrophages stimulées avec du LPS (Ronchetti et al. 2006; Sakai et al. 1997). Maruf et al., ont démontré également que l'acide férulique peut être utilisé pour des fins thérapeutiques pour inhiber le stress oxydatif et la cytotoxicité induits par glyoxal et méthylglyoxal dans le foie de souris (Maruf et al. 2015). L'acide férulique a été démontré avoir des effets neuroprotecteur, radio-protecteur et anti-athérogénique (Soobrattee et al. 2005). Tucsek et al., rapportent que FA atténue l'activation de MAPKs et de

NFκB, et protégeait l'intégrité et la polarisation de la membrane mitochondriale, inhibant ainsi la génération des ROS par les mitochondries dans les macrophages RAW 264.7 traitées aux LPS (Tucsek et al. 2011). Dans les cellules *Wt* traitées aux LPS, nous avons constaté une faible augmentation du taux d'expression de *Ppara* induite par 30μM de FA. Le Férulaldéhyde entraîne également une induction de l'expression du récepteurs nucléaire *Pparγ* uniquement dans les cellules microgliales mutantes à 100μM en absence du LPS.

L'ensemble des données cumulées à partir de notre étude montre que le cactus contient un cocktail de molécules bioactives dont chacune permet de réguler une ou plusieurs voies de signalisation bien spécifique et ainsi moduler l'inflammation et le stress oxydatif induits par la déficience en *Acox1* et/ou le traitement LPS par un mécanisme d'action qui reste à déterminer.

V. Conclusion et perspectives

Les cellules microgliales jouent un rôle central dans les maladies neurodégénératives telles que les leucodystrophies peroxysomales. Les cellules murines microgliales immortalisées BV-2 sont largement utilisées dans ce contexte-là. La caractérisation des modèles cellulaires microgliales BV-2 générées par la technique de CRISPR-Cas9 dans notre laboratoire, représente un modèle original et un bon outil pour décrypter les mécanismes moléculaires et les voies de signalisation responsables des conséquences biologiques délétères liées aux déficiences peroxysomales. Bien que ces modèles cellulaires ne soient pas des microglies primaires, elles conservent la signature transcriptomique, ainsi que de nombreuses caractéristiques microgliales telles que la phagocytose et la capacité à répondre à la stimulation inflammatoire d'une manière assez similaire à celle des cellules primaires (A. Das et al. 2015; Henn et al. 2009).

En effet, le premier volet de nos investigations s'intéressait à l'évaluation des conséquences du déficit de la β -oxydation peroxysomale dans les lignées microgliales déficientes *Acox1*^{-/-} et *Abcd1/d2*^{-/-} sur la morphologie des structures subcellulaires. L'ensemble des résultats obtenus par fractionnement cellulaires par centrifugation différentielle et isopycnique dans trois types de gradients de densité –Nycodenz, Percoll et sucrose– ont montré l'absence de différences significatives dans la taille et la densité des organites subcellulaires, en particulier concernant les peroxysomes, des cellules microgliales BV2 déficientes par rapport aux cellules sauvages. Les profils de distributions des enzymes marqueurs des différents compartiments cellulaires, Mitochondries, lysosomes, Reticulum endoplasmique, peroxysomes et cytosol, montrent une similarité de répartition au sein des cellules sauvages comme dans les cellules mutantes.

L'analyse par RTqPCR des ARNms, isolés à partir des cellules *Wt* et déficientes *Abcd1*^{-/-}, *Abcd2*^{-/-}, *Abcd1/d2*^{-/-} et *Acox1*^{-/-}, a permis de quantifier les niveaux d'expression de différents gènes. D'abord ceux impliqués dans l'inflammation a montré que la plupart des gènes pro-inflammatoires sont induits dans les cellules mutantes en comparaison avec les cellules sauvages. Cette observation se confirme avec le traitement LPS, aboutissant à une surexpression de ces gènes. En s'appuyant sur des observations récentes faites dans notre laboratoire à partir de données transcriptomiques de séquençage à haut débit par RNA-seq, indiquant une surexpression de

plusieurs gènes codant pour des protéines lysosomales : *CtsB*, *lamp2*, *CtsK*, *CtsD* et *lysozymes*. L'analyse au niveau post-traductionnel par western blot de l'expression de plusieurs protéines lysosomales CATHB, CATHK et LAMP2, nous a révélée une augmentation des taux de certaines protéines aussi bien au niveau intracellulaire que dans le milieu extracellulaire dans les quatre lignées BV-2 déficientes *Abcd1*^{-/-}, *Abcd2*^{-/-}, *Abcd1/d2*^{-/-} et *Acox1*^{-/-}. Dans le cas des BV-2 *Acox1*^{-/-}, cette augmentation du taux de protéine de la CATHB s'accompagne d'une induction de son activité enzymatique. Des résultats similaires ont été observés pour l'augmentation du taux de la CATHK dans les cellules déficientes avec une différence notable montrant la libération uniquement de la forme précurseur pro-CATHK dans le milieu extracellulaire. Le taux de la protéine LAMP2 de la membrane lysosomale est augmentée légèrement dans les cellules déficientes, mais cette relative induction reste statistiquement non significative. Ces résultats sont en accord avec l'analyse transcriptomique réalisée au laboratoire sur les ARNm issus des lignées BV2 mutantes en comparaison avec la lignée sauvage *Wt*. De plus, l'évaluation de la capacité de phagocytose par fluorescence et par comptage CFU dans les cellules microgliales BV-2 a permis de montrer que les déficiences peroxysonales ont un impact majeur sur la capacité phagocytaire des cellules BV-2. L'absence du gène *Acox1* dans les cellules BV-2 augmente la phagocytose des bactéries *STm* fluorescentes. Alors que, l'absence des gènes *Abcd1* et *Abcd2* diminue la phagocytose dans les cellules BV-2 microgliales. Contrairement à la première méthode de fluorescence, le test CFU (comptage du nombre d'unité formant une colonie), qui nous indique indirectement la quantité de bactéries *STm* internalisées par les cellules BV-2, montre une similarité dans les profils de phagocytose des bactéries *STm* viables dans les trois lignées cellulaires. Le traitement des trois lignées de cellules BV-2 avec du LPS pendant 24H montre une augmentation de la phagocytose principalement dans les cellules BV-2 *Wt* et *Acox1*^{-/-}. Alors qu'inversement, dans les cellules BV-2 déficientes en *Abcd1/d2*, nous assistons à une perte d'efficacité de la fonction phagocytaire après un traitement LPS traduite par une diminution de nombre de CFU, en comparaison avec les cellules sauvages *Wt* et *Acox1*^{-/-}.

Aujourd'hui, le consommateur s'intéresse de plus en plus à la qualité et à l'apport nutritionnel des aliments. L'identification et la caractérisation des éléments bioactifs contenus dans les plantes et de leurs différentes parties : fleurs, cladodes, graines et mésocarpe, par les chercheurs encourage l'utilisation de la plante entière ou ses composés pour leur potentiel thérapeutique (Hegwood 1990). Ce qui pourrait également aller dans le sens de recommandations écologiques pour éviter le

gaspillage et préserver la sécurité alimentaire face aux crises alimentaires et la pénurie d'eau reconnues actuellement dans le monde. Le cactus est considéré comme une source alimentaire pour les uns et une ressource potentielle pour d'autres mais non encore bien valorisée à sa juste valeur. C'est une source de fibres alimentaire, de vitamines et de composés bioactifs. Son pouvoir antioxydant rend d'*Opuntia ficus-indica*, une bonne candidate pour moduler l'inflammation et les stress oxydatif induits par les endotoxines. L'huile de graine de cactus (CSO) posséderait un pouvoir protecteur contre l'inflammation aigüe et le stress oxydatif induits par les LPS dans le foie et le cerveau de souris. Nos travaux montrent que la CSO est capable de rétablir le statut antioxydant peroxysomal ainsi que les fonctions de β -oxydation des acides gras. De plus, la CSO présente un effet neuroprotecteur contre la septicémie par le maintien des activités peroxysomales antioxydantes de la catalase et GPx au niveau cérébral. La dernière partie de notre travail était destinée à chercher plus spécifiquement les molécules issues de cactus responsables des pouvoirs anti-inflammatoire et antioxydant. Le prétraitement des cellules microgliales par les différents dérivés de cactus flavonoïdes et composés phénoliques a montré que toutes ces molécules formeraient un cocktail bioactif dont chacun des composés qu'il contient interviendrait dans la stimulation ou la répression des voies de signalisation inflammatoire et antioxydante. Ainsi, nous avons révélé que chacun de ces composés a permis de réduire la production du NO, et de réprimer plus ou moins l'expression de gènes pro-inflammatoires, même si l'effet sur l'expression protéique et géniques des enzymes peroxysomales reste parfois modeste et mériteraient des investigations plus approfondies. Les cellules microgliales que nous avons investiguées représentent des modèles uniques et avantageux pour décortiquer le métabolisme et les mécanismes cellulaires, mais certains de nos résultats mériteraient d'être transposés et validés sur des cultures primaires de microglies. Les effets de ces molécules devraient être considérés dans d'autres cellules cérébrales : astrocytes, neurones ou oligodendrocytes pour compléter le portrait de leurs actions bénéfiques ou toxicologiques. Une approche de cocultures de ces cellules cérébrales pourrait également apporter des réponses sur les échanges cellulaires dans des conditions physiologiques ou pathologiques, par exemple d'accumulation des AGTLC et son impact sur les autres fonctions peroxysomales dans ces différents types cellulaires du SNC. L'utilisation de mélanges contenant tout ou partie de l'ensemble de ces composés (flavonoïdes et phénoliques) pourrait amener des réponses sur leur effet synergique et qui expliquerait mieux les effets, anti-inflammatoire et antioxydant, retrouvés dans les extraits, les jus ou les fruits ou toute autre partie de la plante de cactus.

Liste des figures

Figure 1: Image de la plante *O. ficus Indica*. La plante de cactus est composée de 3 structures principales fleur, cladode et fleur indiquées par des flèches dans la figure

Figure 2: Les sites de production de cactus au Maroc (Nounah et al. 2020). Au Maroc, 5 régions sont connues par la culture du Cactus. Dans la figure ces 5 régions sont indiquées sur la carte par les numéros de 1 à 5 et à droite chaque numéro correspond à un nom d'une région du Maroc.

Figure 3: La structure chimique de l'Isorhamnetine

Figure 4: Structure chimique de l'isorhamnetine 3-O-rutinoside

Figure 5: Structure chimique de Quercétine

Figure 6: Structure chimique de 4-Hydroxy-3-methoxycinnamaldehyde

Figure 7: Structure chimique de Syringaldehyde

Figure 8: Structure chimique de la vanilline

Figure 9. Eléments structuraux nécessaires à l'obtention d'une activité antioxydante (Salem 2009)

Figure 10: Micrographies électroniques de peroxysomes après purification (a) et les membranes peroxysomales préparées avec un traitement au carbonate de sodium (b), La flèche indique le noyau cristallin peroxysomal libre. Barre, 0.5 μm . (a) x 48000. (b) x 65000. encadré : structure tri-laminaire de membranes isolées après traitement par du bicarbonate de sodium barre, 50 nm, x 212000 (Y Fujiki et al. 1982).

Figure 11 : Illustration schématique des mécanismes moléculaires associés à la pathogenèse X-ALD et à la déficience en ACOX1. Une mutation au niveau du gène ABCD1, code pour une protéine de transport inopérante qui bloque le transport de VLCFA au peroxysome. L'absence de la protéine ACOX1 enzyme clé de la dégradation des VLCFA provoque une défaillance de la β -oxydation ce qui entraîne une accumulation de ces dernières dans les cellules. Ce qui impacte d'autres fonctions biologiques et cause un dysfonctionnement mitochondrial, stress oxydatif, Stress du RE et puis mort cellulaire. ABCD1, ATP binding cassette subfamily D member 1; ACOX1, acyl CoA oxydase 1; ER, Reticulum endoplasmique; ROS, reactive oxygen species; VLCFA, very long chain fatty acid.

Figure 12: Les symptômes liés aux maladies de leucodystrophies. Les symptômes liés aux déficiences peroxysomales apparaissent à un âge précoce et se manifestent sous forme de troubles dans les activités sensoriels et vitales de l'organisme. Dans la figure chaque symptôme est lié à l'organe altéré de l'organisme humain.

Figure 13: Les différents états cellulaires fonctionnels de la microglie peut être défini à partir du phénotype morphologique. A. Une microglie ramifiée montre des prolongations cytoplasmiques ramifiées, avec lesquelles, elle explore son microenvironnement. B, Des microglies activées avec des prolongations cytoplasmiques contractées et s'agrandit à cause de l'accumulation des organites et augmentation de l'activité métabolique. C, Microglies en mode phagocytaire apparaissent souvent sous forme de macrophages arrondie du cerveau. D, microglie dystrophique, la plupart se caractérisent par des prolongations cytoplasmiques perlées, tordus ou fragmentés. Cortex cérébral humain coloré avec l'anticorps Iba1. Barre = 20 μm .(Streit et al. 2014)

Figure 14: Les médiateurs du processus d'inflammation. Cette figure résume le rôle de différents médiateurs dans le processus de l'inflammation de la phase aiguë à la phase chronique. Abréviations : PGE prostaglandin E, VIP vasoactive intestinal polypeptide, LTB leukotriene B, LTD leukotriene D, PAF platelet-activating factor, IL interleukin, CXCL chemokine (C-X-C motif) ligand, CCL CC

chemokine ligand, IFN interferon, MCP monocyte chemoattractant protein, TGF transforming growth factor, TNF tumor necrosis factor (d'après Germolec et al. 2018).

Figure 15: Schéma de fractionnement subcellulaire par centrifugation différentielle (C. de Duve). Fraction N ou nucléaire, fraction M ou mitochondriale lourde, fraction L ou mitochondriale légère, fraction P ou microsomale, fraction S pour non sédimentable.

Figure 16: Rotor à godets basculants. Les tubes sont déposés dans des godets, accrochés au rotor par l'intermédiaire d'un bouchon muni de crochets que l'on fixe sur une barre fixe. Sous l'effet de la force centrifugeuse, les tubes se réorientent et passent en position horizontale.

Figure 17: La distribution intracellulaire des deux enzymes marqueurs des lysosomes β -galactosidase (A, B, C) et Cathepsine C (D, E, F), dans les cinq fractions subcellulaires (N, M, L, P et S) obtenues par centrifugation différentielle des homogénats de cellules BV-2 (WT (A, D), ACOX1-KO (B, E) et ABCD1/D2-KO (C, F)). Les repères des graphiques représentent en ordonnée : l'activité spécifique relative (SRA) et en abscisse : le pourcentage cumulé de protéines dans chaque fraction (cumulé de gauche vers la droite). L'aire de chaque rectangle est proportionnelle au pourcentage de l'activité mesurée dans chaque fraction. Au sommet de chaque graphique est indiqué le pourcentage de récupération représentant le taux d'activité mesuré dans les fractions (N, M, L, P et S) rapportée à l'activité totale dans l'homogénat (H) après centrifugation différentielle.

Figure 18: Les Profils de distribution intracellulaire de l'enzyme marqueur du réticulum endoplasmique (α -glucosidase), dans les cinq fractions cellulaires (N, M, L, P et S) obtenues par centrifugation différentielle des homogénats de cellules BV-2 (WT (A), ACOX1-KO (B) et ABCD1/D2-KO (C)). Les repères des graphiques représentent en ordonnée : l'activité spécifique relative (SRA) et en abscisse : le pourcentage cumulé de protéines dans chaque fraction (cumulé de gauche vers la droite). L'aire de chaque rectangle est proportionnelle au pourcentage de l'activité mesurée dans la fraction. Au sommet de chaque graphique est indiqué le pourcentage de récupération représentant le taux d'activité mesuré dans les fractions (N, M, L, P et S) rapportée à l'activité totale dans l'homogénat après centrifugation différentielle.

Figure 19: Les Profils de distribution intracellulaire de l'enzyme marqueur de la mitochondrie (Cytochrome C) dans les fractions cellulaires (N, M, L, P et S) obtenues par centrifugation différentielle des homogénats de cellules BV-2 (WT (A), ACOX1-KO (B) et ABCD1/D2-KO (C)). Les repères des graphiques représentent en ordonnée : l'activité spécifique relative (SRA) et en abscisse : le pourcentage cumulé de protéines dans chaque fraction (cumulé de gauche vers la droite). L'aire de chaque rectangle est proportionnelle au pourcentage de l'activité mesurée dans la fraction. Au sommet de chaque graphique est indiqué le pourcentage de récupération représentant le taux d'activité mesuré dans les fractions (N, M, L, P et S) rapportée à l'activité totale dans l'homogénat après centrifugation différentielle.

Figure 20 : Les Profils de distribution intracellulaire des enzymes marqueurs de cytosol (DPP3) dans les fractions cellulaires (N, M, L, P et S) obtenues par centrifugation différentielle des homogénats de cellules BV-2 (WT (A), ACOX1-KO (B) et ABCD1/D2-KO (C)). Les repères des graphiques représentent en ordonnée : l'activité spécifique relative (SRA) et en abscisse : le pourcentage cumulé de protéines dans chaque fraction (cumulé de gauche vers la droite). L'aire de chaque rectangle est proportionnelle au pourcentage de l'activité mesurée dans la fraction. Au sommet de chaque graphique est indiqué le pourcentage de récupération représentant le taux d'activité mesuré dans les fractions (N, M, L, P et S) rapportée à l'activité totale dans l'homogénat après centrifugation différentielle.

Figure 21: Les Profils de distribution intracellulaire de l'enzyme peroxysomale (Catalase) dans les fractions cellulaires (N, M, L, P et S) obtenues par centrifugation différentielle des homogénats de cellules BV-2 (WT (A, D, G), ACOX1-KO (B, E, H) et ABCD1/D2-KO (C, F, I)). Les repères des

graphiques représentent en ordonnée : l'activité spécifique relative (SRA) et en abscisse : le pourcentage cumulé de protéines dans chaque fraction (cumulé de gauche vers la droite). L'aire de chaque rectangle est proportionnelle au pourcentage de l'activité mesurée dans la fraction. Au sommet de chaque graphique est indiqué le pourcentage de récupération représentant le taux d'activité mesuré dans les fractions (N, M, L, P et S) rapportée à l'activité totale dans l'homogénat après centrifugation différentielle

Figure 22: : Les profils de distribution intracellulaire de l'enzyme marqueur de peroxysomes, la catalase (bande 64kDa) obtenu par western blotting dans les homogénats de fractions cellulaires (N, M, L, P et S) des cellules BV-2 ((WT (A. D. G), ACOX1-KO (B. E. H) et ABCD1/D2-KO (C. F. I) après centrifugation différentielle. Des quantités égales de protéines ont été chargées pour chaque fraction sur un gel d'électrophorèse PAGE-SDS, ensuite la catalase a été détectée par immunoblotting sur une membrane PVDF après transfert à l'aide des anticorps primaires et secondaires conjugués à des sondes fluorescentes. Les résultats montrent la distribution des intensités du signal de la catalase, quantifiées par densitométrie, dans chaque fraction rapportée à celui de l'extrait. En ordonnée, RSS : signal spécifique relatif et en abscisse : pourcentage cumulé de protéines dans chaque fraction subcellulaire (cumulé de gauche vers la droite). Au sommet de chaque graphique est indiqué le pourcentage de récupération représentant l'intensité du signal quantifiée dans les fractions (N, M, L, P et S) rapportée à l'intensité totale dans l'homogénat après centrifugation différentielle

Figure 23: Les profils de distribution intracellulaire de l'enzyme marqueur de peroxysomes, la catalase, dans les fractions cellulaires (E, N, M, L, P et S) des cellules BV-2 (WT (A, D), ACOX1-KO (B, E)) et ABCD1/D2-KO (C, F)) après centrifugation différentielle. Des quantités égales de protéines ont été chargées pour chaque fraction sur un gel d'électrophorèse PAGE-SDS, ensuite la catalase a été détectée par immunoblotting sur une membrane PVDF après transfert électrophorétique à l'aide des anticorps primaires et secondaires conjugués à des sondes fluorescentes. La distribution des intensités du signal de la catalase, quantifié par densitométrie, dans chaque fraction rapportée à celui de l'extrait. En ordonnée, RSS : signal spécifique relatif et en abscisse : pourcentage cumulé de protéines dans chaque fraction subcellulaire (cumulé de gauche vers la droite). Au sommet de chaque graphique est indiqué le pourcentage de récupération représentant l'intensité du signal quantifiée dans les fractions (N, M, L, P et S) rapportée à l'intensité totale dans l'homogénat (E+N) après centrifugation différentielle.

Figure 24: La distribution intracellulaire des enzymes marqueurs de lysosomes (β -galactosidase), réticulum endoplasmique (α -glucosidase alcaline), mitochondrie (cytochrome C oxydase) et peroxysome (Catalase) après ultracentrifugation isopycnique (gradient continu de Nycodenz de 1,06 à 1,26 g/ml). Un mélange de fractions M+L+P obtenu par centrifugation différentielle des cellules BV-2 (WT, ACOX1-KO et ABCD1/D2-KO) a été fractionné par ultracentrifugation isopycnique en utilisant un gradient de Nycodenz ; En Ordonnée : La fréquence, représente le quotient du pourcentage d'activité divisé par l'incrément de densité entre deux fractions, et en abscisse : La densité de la fraction en g/ml, et puis la densité médiane indiquée dans le graphique désigne la densité à laquelle se retrouve 50% des organites à l'équilibre.

Figure 25: Analyse de la distribution intracellulaire de la catalase, l'enzyme marqueur du peroxysome après ultracentrifugation isopycnique (gradient de Nycodenz de 1,06 à 1,26 g/ml). Un mélange de fractions M+L+P obtenu par centrifugation différentielle des cellules BV-2 (WT (A, D), ACOX1-KO (B, E) et ABCD1/D2-KO (C, F)) a été fractionné par ultracentrifugation isopycnique en utilisant un gradient de Nycodenz. Les tubes du gradient ont été coupés de haut en bas en fractions qui ont été ensuite analysées par western blot pour détecter la catalase. L'intensité du signal obtenue pour chaque fraction a été évaluée par densitométrie et les résultats ont été rapportés sur le

graphique pour les trois lignées cellulaires. L'ordonnée du graphe correspond à la fréquence ($Q/SQ \cdot r$, où Q représente l'intensité trouvée pour la fraction, et SQ, le total des intensités récupérées dans toutes les fractions, et r, l'incrément de densité entre deux fractions), et en abscisse : La densité de la fraction en g/ml, la densité médiane indiquée dans le graphique désigne la densité dans laquelle on retrouve 50% des organites à l'équilibre.

Figure 26: La distribution des activités relatives des enzymes marqueurs de lysosomes (β -galactosidase) et de microsomes des cellules BV2 microgliales dans un gradient de densité de Percoll. Un mélange de fractions M+L+P obtenues par centrifugation différentielle a été centrifugé dans un gradient de densité Percoll™ et 7 fractions ont été collectées de haut en bas du tube de centrifugation. La distribution des lysosomes et des microsomes a été établie sur la base respectivement des activités de la β -galactosidase et de l' α -glucosidase alcaline, mesurées dans les différentes fractions des trois lignées cellulaires (A. WT, B. ACOX1-KO, C. ABCD1/D2-KO). Le graphique montre le pourcentage de β -galactosidase et d' α -glucosidase alcaline dans chaque fraction du gradient Percoll™ et la densité de ces fractions.

Figure 27: La distribution des activités de la β -galactosidase (enzyme marqueur de lysosome) et de la catalase, (enzyme marqueur du peroxyssome) après ultracentrifugation isopycnique (gradient de saccharose allant de 1,09 g/cm³ à 1,26 g/cm³). Un mélange de fractions M+L+P obtenu par centrifugation différentielle des homogénats de cellules BV-2 (WT, ACOX1-KO, ABCD1/D2-KO) a été fractionné par ultracentrifugation isopycnique en utilisant un gradient de Saccharose. Les fractions du gradient ont été analysées par dosage enzymatique pour détecter la β -galactosidase (A) et catalase (B), les résultats ont été rapportés sur le graphique pour les trois lignées cellulaires. En Ordonnée : La fréquence, représente le quotient du pourcentage d'activité divisé par l'incrément de densité entre deux fractions, et en abscisse : La densité de la fraction en g/ml. La médiane indiquée dans le graphique désigne la densité dans laquelle on retrouve 50% des organites à l'équilibre.

Figure 28: Analyse de la distribution intracellulaire de la catalase, l'enzyme marqueur du peroxyssome, après ultracentrifugation isopycnique (gradient de sucrose de 1,06 à 1,26 g/ml). Un mélange de fractions M+L+P obtenu par centrifugation différentielle des homogénats de cellules BV-2 (WT (A, D), ACOX1-KO (B, E) et ABCD1/D2-KO (C, F)) a été fractionné par ultracentrifugation isopycnique en utilisant un gradient de sucrose. Les fractions du gradient ont été coupées de haut en bas, et ensuite analysées par immunoblotting pour détecter la catalase. L'intensité du signal obtenue pour chaque fraction a été évaluée par densitométrie et les résultats ont été rapportés sur le graphique pour les trois lignées cellulaires. L'ordonnée du graphe correspond à la fréquence ($Q/SQ \cdot r$, où Q représente l'activité trouvée dans la fraction, et SQ est l'activité totale représentant la somme des activités dans chaque fraction, et r, l'incrément de densité entre deux fractions), et en abscisse : La densité de la fraction en g/ml, la densité médiane indiquée dans le graphique désigne la densité dans laquelle on retrouve 50% des organites à l'équilibre.

Figure 29: L'impact des déficiences peroxyssomales sur l'expression des gènes d'inflammation, Casp1 (A) Il-1 β (B), Il1rn (C), Myd88 (D), Tollip (E) et Tab1 (F) des cellules BV2 sauvage WT et mutantes *Abcd1*^{-/-}, *Abcd2*^{-/-}, double mutantes *Abcd1/d2*^{-/-} et *Acox1*^{-/-}. L'ARN a été extrait à partir des cellules BV2 et puis transcrit en ADNc par une transcriptase inverse, puis la quantification du niveau d'expression des gènes a été réalisée grâce à la technique de qPCR. Les graphes présentent la moyenne \pm SD (n = 3), la significativité statistique des résultats est déterminée selon la valeur du p (***) $p \leq 0,001$. ** $p \leq 0,01$. * $p \leq 0,05$) comparé au control, (### $p \leq 0,001$. ## $p \leq 0,01$) comparé au control avec traitement LPS seul. Les analyses statistiques étaient réalisées en utilisant le test ANOVA1 et Tukey test.

Figure 30: L'impact des mutations au niveau des gènes peroxysomaux sur l'expression des gènes de facteur de transcription, Ppar β (A) Ppar γ (B), pcg1 α (C), pcg1 β (D), des cellules BV2 sauvage WT et mutantes Abcd1 $^{-/-}$, Abcd2 $^{-/-}$, double mutantes Abcd1/d2 $^{-/-}$ et Acox1 $^{-/-}$. L'ARN a été extrait à partir des cellules BV2 et puis transcrit en ADNc par une transcriptase inverse, puis la quantification du niveau d'expression des gènes a été réalisée grâce à la technique de qPCR. Les graphes présentent la moyenne \pm SD (n = 3), la significativité statistique des résultats est déterminée selon la valeur du p (*** p \leq 0,001. ** p \leq 0.01. * p \leq 0,05) comparé au control, (### p \leq 0,001. ## p \leq 0,01) comparé au control avec traitement LPS seul. Les analyses statistiques étaient réalisées en utilisant le test ANOVA1 et Tukey test.

Figure 31: L'impact des mutations au niveau des déficiences peroxysomales sur l'expression des gènes pro inflammatoires, Il-6(A) Il-8 (B), et anti-inflammatoires Il-4(C), Il-10 (D), des cellules BV2 sauvage WT et mutantes Abcd1 $^{-/-}$, Abcd2 $^{-/-}$, double mutantes Abcd1/d2 $^{-/-}$ et Acox1 $^{-/-}$. L'ARN a été extrait à partir des cellules BV2, ensuite transcrit en ADNc par une transcriptase inverse, puis la quantification du niveau d'expression des gènes a été réalisée grâce à la technique de qPCR. Les graphes présentent la moyenne \pm SD (n = 3), la significativité statistique des résultats est déterminé e selon la valeur du p (*** p \leq 0,001. ** p \leq 0.01. * p \leq 0,05) comparé au control, (### p \leq 0,001. ## p \leq 0,01) comparé au control avec traitement LPS seul. Les analyses statistiques étaient réalisées en utilisant le test ANOVA1 et Tukey test.

Figure 32: L'impact des mutations au niveau des gènes peroxysomaux sur l'expression des gènes d'inflammation, Ifn γ (A) Tnf α (B) Tak1(C), Ltb4R (D), des cellules BV2 sauvage WT et mutantes Abcd1 $^{-/-}$, Abcd2 $^{-/-}$, double mutantes Abcd1/d2 $^{-/-}$ et Acox1 $^{-/-}$. L'ARN a été extrait à partir des cellules BV2 et puis transcrit en ADNc par une transcriptase inverse, puis la quantification du niveau d'expression des gènes a été réalisée grâce à la technique de qPCR. Les graphes présentent la moyenne \pm SD (n = 3), la significativité statistique des résultats est déterminée selon la valeur du p (*** p \leq 0,001. ** p \leq 0.01. * p \leq 0,05) comparé au control, (### p \leq 0,001. ## p \leq 0,01) comparé au control avec traitement LPS seul. Les analyses statistiques étaient réalisées en utilisant le test ANOVA1 et Tukey test

Figure 33: L'analyse de l'expression protéique de la CATHB (38kDa), CATHK (28kDa) et LAMP2 (110kDa) par western blot des cellules BV-2 (WT, Abcd1 $^{-/-}$, Abcd2 $^{-/-}$, Abcd1d2 $^{-/-}$ et Acox1 $^{-/-}$). Trente μ g de protéines d'extrait cellulaire ont été séparées sur un gel d'électrophorèse SDS PAGE de 12%, ou 10% puis transférées sur une membrane PVDF et analysée par immunoblotting avec l'anticorps anti CathB (A, D), anti CathK (B, E) et anti-Lamp2(C, F). Analyse densimétrique de l'immunoblot pour comparer l'intensité du signal obtenu au niveau des bandes. Les graphes présentent la moyenne \pm SD (n = 3), la significativité statistique des résultats est déterminée selon la valeur du p (*** p \leq 0,001. ** p \leq 0.01. * p \leq 0,05) comparé au control, (### p \leq 0,001. ## p \leq 0,01) comparé au control avec traitement LPS seul. Les analyses statistiques étaient réalisées en utilisant le test ANOVA1 et Tukey test. Les pointes de flèche bleue et noires désignent les formes de protéine précurseur et mature respectivement.

Figure 34 L'analyse de l'expression protéique de la CATHB (38kDa), CATHK (28kDa) et LAMP2 (110kDa) par western blot des cellules BV-2 (WT, Abcd1 $^{-/-}$, Abcd2 $^{-/-}$, Abcd1d2 $^{-/-}$ et Acox1 $^{-/-}$). Trente μ g d'extrait de protéines stimulées avec du LPS (1 μ g/ml) pendant 24h, séparées sur un gel d'électrophorèse SDS PAGE de 12%, ou 10% puis transférées sur une membrane PVDF et analysée par immunoblotting avec l'anticorps anti CathB (A, D), anti CathK (B, E) et anti-Lamp2(C, F). Analyse densimétrique de l'immunoblot pour comparer l'intensité du signal obtenu au niveau des bandes. Les graphes présentent la moyenne \pm SD (n = 3), la significativité statistique des résultats

est déterminée selon la valeur du p (***) $p \leq 0,001$. ** $p \leq 0,01$. * $p \leq 0,05$) comparé au control, (### $p \leq 0,001$. ## $p \leq 0,01$) comparé au control avec traitement LPS seul. Les analyses statistiques étaient réalisées en utilisant le test ANOVA1 et Tukey test. Les pointes de flèche bleue et noires désignent les formes de protéine précurseur et mature respectivement.

Figure 35: Les déficiences peroxysomale et le traitement LPS augmentent la sécrétion de la forme pro de la protéine Cathepsine K (28kDa) dans le milieu de culture. Analyse de l'expression protéique de la CATHK par western blot des cellules BV-2 (WT, Abcd1^{-/-}, Abcd2^{-/-}, Abcd1d2^{-/-} et Acox1^{-/-}) traitées avec du LPS pendant 24H. L'extrait protéique du milieu de culture a été séparé sur un gel d'électrophorèse SDS PAGE de 12%, puis transférées sur une membrane PVDF et analysée par immunoblotting avec l'anticorps anti CathK. L'Analyse densimétrique de l'immunoblot a été faite pour comparer l'intensité du signal obtenu au niveau des bandes par rapport au Wt. Flèche bleue : la protéine sous sa forme pro.

Figure 36: Mesure de l'activité spécifique de la cathepsine B dans les lysats des cellules BV-2 WT, Abcd1d2^{-/-} Acox1^{-/-}. A. Les résultats représentent la moyenne de l'activité spécifique de la cathepsine B dans les lysats de cellules cultivées dans un milieu de culture pourvu de sérum (\pm écart-type) calculée à partir des activités mesurées dans 3 expériences indépendantes. B. Résultats de l'activité spécifique Cathepsine B dans les lysats cellulaires en absence de sérum, C. Mesure de l'activité enzymatique de la cathepsine B forme active dans le milieu de culture, D. Mesure de l'activité enzymatique de la forme Procathepsine B dans le milieu de culture dépourvu de serum. E. Pourcentage de sécrétion de la cathepsine B forme active dans le milieu de culture cellulaire. F. Pourcentage de sécrétion de la forme Procathepsine B dans le milieu de culture dépourvu de sérum.

Figure 37: La capacité phagocytaire des cellules BV-2 microgliales (WT, Acox1^{-/-} et Abcd1d2^{-/-}). Les Images obtenues par microscope à fluorescence (objectif X20) de l'infection de cellules BV-2 (WT, Acox1^{-/-}, Abcd1d2^{-/-}) par les bactéries STm-GFP mutantes après 24H d'infection. Les noyaux des cellules BV-2 sont marqués au DAPI à fluorescence bleue. La fluorescence verte vient des bactéries exprimant la protéine GFP fluorescente.

Figure 38: La capacité phagocytaire des cellules BV-2 microgliales (WT, Acox1^{-/-} et Abcd1d2^{-/-}). Les Images obtenues par microscope à fluorescence (objectif X20) de l'infection de cellules BV-2 (WT, Acox1^{-/-}, Abcd1d2^{-/-}) par les bactéries STm-GFP mutantes après 3H d'infection. Les noyaux des cellules BV-2 sont marqués au DAPI à fluorescence bleue. La fluorescence verte vient des bactéries exprimant la protéine GFP fluorescente.

Figure 39: Capacité phagocytaire des cellules BV2 microgliales sauvages et mutantes. Les graphiques montrent la moyenne de nombre d'unité formant une colonie (CFU) bactérienne de STm A. par ml de lysat cellulaire B. par millier de cellules BV-2 (Wt, Acox1^{-/-} et Abcd1d2^{-/-}) traitées ou non pendant 24H avec du LPS 1 μ g/ml et C. par μ g de protéines (seules les plaques contenant de 30 à 300 colonies ont été prise en compte).

Figure 40 : Effets de la quercétine (QE) sur la viabilité cellulaire. Les cellules microgliales BV-2 WT et Acox1^{-/-} ont été traitées avec diverses concentrations de quercétine (10, 50, 100 et 200 μ M) pendant 48H (A) et 24H (B), et la viabilité des cellules a été mesurée par FDA test. Les données représentent la moyenne (\pm SD) et sont représentatifs de quatre mesures correspondantes à 4 puits (**p < 0,01 vs contrôle Wt, ###p < 0,01 vs contrôle Acox1^{-/-})

Figure 41: Effets de l'isorhamnetine (IR) sur la viabilité cellulaire. Les cellules microgliales BV-2 WT et Acox1^{-/-} ont été traitées avec diverses concentrations d'isorhamnetine (10, 50, 100 et 200 μ M) pendant 48H (A) et 24H (B), à des concentrations de (10, 30, 50 et 100 μ M) pendant 6H (C), et à des concentrations de (30 et 100 μ M) pendant 3H (D) la viabilité des cellules a été mesurée par MTT test. Les données représentent la moyenne (\pm SD) et sont représentatifs de quatre mesures correspondantes à 4 puits (**p < 0,01 vs contrôle Wt, ###p < 0,01 vs contrôle Acox1^{-/-}).

Figure 42: Effets de l'isorhamnetine-O-rutinoside (RU) sur la viabilité cellulaire. Les cellules microgliales BV-2 WT et Acox1^{-/-} ont été traitées avec diverses concentrations d'isorhamnetine-O-rutinoside (10, 50, 100 et 200 µM) pendant 48H (A) et 24H (B), la viabilité des cellules a été mesurée par MTT test. Les données représentent la moyenne (± SD) et sont représentatifs de quatre mesures correspondantes à 4 puits (**p < 0,01 vs contrôle Wt, ##p < 0,01 vs contrôle Acox1^{-/-}).

Figure 43: Effets de composés phénoliques sur la viabilité cellulaire. Les cellules microgliales BV-2 WT et Acox1^{-/-} ont été traitées avec diverses concentrations de Vanilline (VA) (A), Syringaldehyde (SA) (B) et Ferulaldehyde (FA) (C) (10, 50, 100 et 200 µM) pendant 3H, la viabilité des cellules a été mesurée par MTT test. Les données représentent la moyenne (± SD) et sont représentatifs de quatre mesures correspondantes à 4 puits (**p < 0,01 vs contrôle Wt, ##p < 0,01 vs contrôle Acox1^{-/-}).

Figure 44: Effets du traitement LPS sur la production de NO par les cellules microgliales. Les cellules microgliales BV-2 Wt et Acox1^{-/-} ont été incubées avec du LPS (1µg/ml) pendant 24H. La production de NO a été détectée en utilisant le test de Griess. Les données représentent la moyenne (± SD) de trois puits répliqués et sont représentatifs de trois expériences indépendantes (**p < 0,01 vs contrôle (Wt/Acox1^{-/-}), ##p < 0,01 vs traitement LPS (Wt/Acox1^{-/-}).

Figure 45: Effets des molécules flavonoïdes (QE, IR, RU) et phénols (VA, SA, FA) sur la production de NO. Les cellules microgliales BV-2 Wt et Acox1 ont été prétraitées avec diverses concentrations de flavonoïdes ou de composés phénoliques (30–100 µM) pendant 3H puis incubées avec du LPS (1µg/ml) pendant 24H. La production de NO a été détectée en utilisant le test de Griess. Les données représentent la moyenne (± SD) de trois puits répliqués et sont représentatifs de trois expériences indépendantes (**p < 0,01 vs contrôle (Wt/Acox1^{-/-}), ##p < 0,01 vs traitement LPS (Wt/Acox1^{-/-}).

Figure 46: Effets des flavonoïdes (QE, IR, RU) et composés phénoliques (VA, SA, FA) sur l'expression génique du gène peroxysomal Abcd3. Les cellules microgliales BV-2 Wt et Acox1^{-/-} ont été prétraitées pendant 3H avec différentes concentrations (30–100 µM) de Flavonoides et composés phénoliques puis stimulées avec du LPS (1µg/ml) pendant 24h. Après avoir retiré le milieu, l'ARN a été isolé. Le niveau d'expression des ARNm du gène Abcd3, a été déterminé par analyse qPCR. Les résultats sont représentatifs de trois expériences indépendantes (**p < 0,01 vs contrôle (Wt/Acox1^{-/-}), ##p < 0,01 vs traitement LPS (Wt/Acox1^{-/-}).

Figure 47: Effets des flavonoïdes (QE, IR, RU) et composés phénoliques (VA, SA, FA) sur l'expression génique du gène peroxysomal Catalase. Les cellules microgliales BV-2 Wt et Acox1^{-/-} ont été prétraitées pendant 3H avec différentes concentrations (30–100 µM) de Flavonoides et composés phénoliques puis stimulées avec du LPS (1µg/ml) pendant 24h. Après avoir retiré le milieu, l'ARN a été isolé. Le niveau d'expression des ARNm du gène Catalase, a été déterminé par analyse qPCR. Les résultats sont représentatifs de trois expériences indépendantes (**p < 0,01 vs contrôle (Wt/Acox1^{-/-}), ##p < 0,01 vs traitement LPS (Wt/Acox1^{-/-}).

Figure 48: Effets des flavonoïdes (QE, IR, RU) et composés phénoliques (VA, SA, FA) sur l'expression génique du gène peroxysomal Hsd17b4. Les cellules microgliales BV-2 Wt et Acox1^{-/-} ont été prétraitées pendant 3H avec différentes concentrations (30–100 µM) de Flavonoides et composés phénoliques puis stimulées avec du LPS (1µg/ml) pendant 24h. Après avoir retiré le milieu, l'ARN a été isolé. Le niveau d'expression des ARNm du gène Hsd17b4, a été déterminé par analyse qPCR. Les résultats sont représentatifs de trois expériences indépendantes (**p < 0,01 vs contrôle (Wt/Acox1^{-/-}), ##p < 0,01 vs traitement LPS (Wt/Acox1^{-/-}).

Figure 49: Effets des flavonoïdes (QE, IR, RU) et composés phénoliques (VA, SA, FA) sur l'expression génique du gène peroxysomal Pex11b. Les cellules microgliales BV-2 Wt et Acox1^{-/-} ont été prétraitées pendant 3H avec différentes concentrations (30–100 µM) de Flavonoides et composés phénoliques puis stimulées avec du LPS (1µg/ml) pendant 24h. Après avoir retiré le milieu, l'ARN a été isolé. Le niveau d'expression des ARNm du gène Pex11b, a été déterminé par analyse qPCR. Les

résultats sont représentatifs de trois expériences indépendantes (**p <0,01 vs contrôle (Wt/Acox1-/-), ##p < 0,01 vs traitement LPS (Wt/Acox1-/-).

Figure 50: Effets des flavonoïdes (QE, IR, RU) et composés phénoliques (VA, SA, FA) sur l'expression génique du gène peroxysomal Ppar α . Les cellules microgliales BV-2 Wt et Acox1-/- ont été prétraitées pendant 3H avec différentes concentrations (30–100 μ M) de Flavonoïdes et composés phénoliques puis stimulées avec du LPS (1 μ g/ml) pendant 24h. Après avoir retiré le milieu, l'ARN a été isolé. Le niveau d'expression des ARNm du gène Ppar α , a été déterminé par analyse qPCR. Les résultats sont représentatifs de trois expériences indépendantes (**p <0,01 vs contrôle (Wt/Acox1-/-), ##p < 0,01 vs traitement LPS (Wt/Acox1-/-).

Figure 51: Effets des flavonoïdes (QE, IR, RU) et composés phénoliques (VA, SA, FA) sur l'expression génique du gène peroxysomal Ppar β . Les cellules microgliales BV-2 Wt et Acox1-/- ont été prétraitées pendant 3H avec différentes concentrations (30–100 μ M) de Flavonoïdes et composés phénoliques puis stimulées avec du LPS (1 μ g/ml) pendant 24h. Après avoir retiré le milieu, l'ARN a été isolé. Le niveau d'expression des ARNm du gène Ppar β , a été déterminé par analyse qPCR. Les résultats sont représentatifs de trois expériences indépendantes (**p <0,01 vs contrôle (Wt/Acox1-/-), ##p < 0,01 vs traitement LPS (Wt/Acox1-/-).

Figure 52: Effets des flavonoïdes (QE, IR, RU) et composés phénoliques (VA, SA, FA) sur l'expression génique du gène peroxysomal Ppar γ . Les cellules microgliales BV-2 Wt et Acox1-/- ont été prétraitées pendant 3H avec différentes concentrations (30–100 μ M) de Flavonoïdes et composés phénoliques puis stimulées avec du LPS (1 μ g/ml) pendant 24h. Après avoir retiré le milieu, l'ARN a été isolé. Le niveau d'expression des ARNm du gène Ppar γ , a été déterminé par analyse qPCR. Les résultats sont représentatifs de trois expériences indépendantes (**p <0,01 vs contrôle (Wt/Acox1-/-), ##p < 0,01 vs traitement LPS (Wt/Acox1-/-).

Figure 53: Effets des flavonoïdes (QE, IR, RU) et des composés phénoliques (VA, SA, FA) sur l'expression du gène d'inflammation Tnf- α . Les cellules microgliales BV-2 Wt et Acox1-/- ont été prétraitées pendant 3H avec différentes concentrations (30–100 μ M) de Flavonoïdes ou de composés phénoliques puis stimulées avec du LPS (1 μ g/ml) pendant 24h. Après avoir retiré le milieu, les ARN totaux ont été isolés puis utilisés pour la rétrotranscription. Le niveau d'expression des ARNm du gène Tnf- α , a été déterminé par analyse qPCR. Les résultats sont représentatifs de trois expériences indépendantes (**p <0,01 vs contrôle (Wt/Acox1-/-), ##p < 0,01 vs traitement LPS (Wt/Acox1-/-).

Figure 54: Effets des flavonoïdes (QE, IR, RU) et de composés phénoliques (VA, SA, FA) sur l'expression du gène d'inflammation Il-1 β . Les cellules microgliales BV-2 Wt et Acox1-/- ont été prétraitées pendant 3H avec différentes concentrations (30–100 μ M) de Flavonoïdes ou de composés phénoliques puis stimulées avec du LPS (1 μ g/ml) pendant 24h. Après avoir retiré le milieu, les ARN totaux ont été isolés puis utilisés pour la rétrotranscription. Le niveau d'expression des ARNm du gène Il-1 β , a été déterminé par analyse qPCR. Les résultats sont représentatifs de trois expériences indépendantes (**p <0,01 vs contrôle (Wt/Acox1-/-), ##p < 0,01 vs traitement LPS (Wt/Acox1-/-).

Figure 55: : Effets des flavonoïdes (QE, IR, RU) et des composés phénoliques (VA, SA, FA) sur l'expression génique du gène anti-inflammatoire Il-4. Les cellules microgliales BV-2 Wt et Acox1-/- ont été prétraitées pendant 3H avec différentes concentrations (30–100 μ M) de flavonoïdes ou des composés phénoliques puis stimulées avec du LPS (1 μ g/ml) pendant 24h. Après avoir retiré le milieu, les ARN totaux ont été isolés puis utilisés pour la rétrotranscription. Le niveau d'expression des ARNm du gène Il-4, a été déterminé par analyse qPCR. Les résultats sont représentatifs de trois expériences indépendantes (**p <0,01 vs contrôle (Wt/Acox1-/-), ##p < 0,01 vs traitement LPS (Wt/Acox1-/-).

Figure 56: Effets des flavonoïdes (QE, IR, RU) et des composés phénoliques (VA, SA, FA) sur l'expression génique du gène du stress oxydant iNos. Les cellules microgliales BV-2 Wt et Acox1-/-

ont été prétraitées pendant 3H avec différentes concentrations (30–100 μ M) de flavonoïdes ou de composés phénoliques puis stimulées avec du LPS (1 μ g/ml) pendant 24h. Après avoir retiré le milieu, les ARN totaux ont été isolés puis utilisés pour la rétrotranscription. Le niveau d'expression des ARNm du gène iNos, a été déterminé par analyse qPCR. Les résultats sont représentatifs de trois expériences indépendantes (**p < 0,01 vs contrôle (Wt/Acox1^{-/-}), ##p < 0,01 vs traitement LPS (Wt/Acox1^{-/-}).

Figure 57 : Effets des flavonoïdes (QE, IR, RU) et des composés phénoliques (VA, SA, FA) sur l'expression génique du gène du stress oxydant Sod1. Les cellules microgliales BV-2 Wt et Acox1^{-/-} ont été prétraitées pendant 3H avec différentes concentrations (30–100 μ M) de flavonoïdes et composés phénoliques puis stimulées avec du LPS (1 μ g/ml) pendant 24h. Après avoir retiré le milieu, les ARN totaux ont été isolés puis utilisés pour la rétrotranscription. Le niveau d'expression des ARNm du gène Sod1, a été déterminé par analyse qPCR. Les résultats sont représentatifs de trois expériences indépendantes (**p < 0,01 vs contrôle (Wt/Acox1^{-/-}), ##p < 0,01 vs traitement LPS (Wt/Acox1^{-/-}).

Figure 58: Effets des flavonoïdes (QE, IR, RU) ou des composés phénoliques (VA, SA, FA) sur l'expression protéique du PE11B (26kDa). Les cellules microgliales BV-2 Wt et Acox1^{-/-} ont été prétraitées pendant 3H avec différentes concentrations (30 ou 100 μ M) de flavonoïdes et de composés phénoliques puis incubées avec du LPS (1 μ g/ml) pendant 24h. Après une Lyse du culot cellulaire dans un tampon de lyse RIPA, 30 μ g de l'extrait protéique cellulaire ont été séparées sur un gel d'électrophorèse SDS-PAGE de 14% puis transférées sur une membrane PVDF et analysées par immunoblotting avec l'anticorps anti-Pex11b, Les résultats sont représentatifs d'une seule expérience. Après quantification de l'intensité des bandes par densitométrie, les résultats de ont été standardisés par ceux de l' α -tubuline et sont présentés sous forme de ratio par rapport au contrôle Wt.

Figure 59: Effets des flavonoïdes (QE, IR, RU) et composés phénoliques (VA, SA, FA) sur l'expression protéique de l'enzyme bifonctionnelle du peroxyosome HSD17B4 (80kDa). Les cellules microgliales BV-2 Wt et Acox1^{-/-} ont été prétraitées pendant 3H avec différentes concentrations (30–100 μ M) de Flavonoïdes et composés phénoliques puis incubées avec du LPS (1 μ g/ml) pendant 24h flavonoïdes dans un tampon de lyse RIPA, 30 μ g de l'extrait protéique cellulaire ont été séparées sur un gel d'électrophorèse SDS PAGE de 12% puis transférées sur une membrane PVDF et analysées par immunoblotting avec l'anticorps Hsd17b4, Les résultats sont représentatifs d'une seule expérience. Après quantification de l'intensité des bandes par densitométrie, les résultats de ont été standardisés par ceux de l' α -tubuline et sont présentés sous forme de ratio par rapport au contrôle Wt.

Figure 60: Effets des flavonoïdes (QE, IR, RU) et de composés phénoliques (VA, SA, FA) sur l'expression protéique de la Cathepsine B (38kDa). Les cellules microgliales BV-2 Wt et Acox1^{-/-} ont été prétraitées pendant 3H avec différentes concentrations (30–100 μ M) de flavonoïdes ou de composés phénoliques puis incubées avec du LPS (1 μ g/ml) pendant 24h. Après une Lyse du culot cellulaire dans un tampon de lyse RIPA, 30 μ g de l'extrait protéique cellulaire ont été séparées sur un gel d'électrophorèse SDS PAGE de 12% puis transférées sur une membrane PVDF et analysées par immunoblotting avec l'anticorps Cathepsine B, Les résultats sont représentatifs d'une seule et unique expérience. Après quantification de l'intensité des bandes par densitométrie, les résultats de ont été standardisés par ceux de l' α -tubuline et sont présentés sous forme de ratio par rapport au contrôle Wt.

Figure 61: Effets des flavonoïdes (QE, IR, RU) et composés phénoliques (VA, SA, FA) sur l'expression protéique de la Cathepsine K (28kDa). Les cellules microgliales BV-2 Wt et Acox1^{-/-} ont été prétraitées pendant 3H avec différentes concentrations (30–100 μ M) de Flavonoïdes et composés phénoliques puis incubées avec du LPS (1 μ g/ml) pendant 24h. Après une Lyse du culot cellulaire dans un tampon

de lyse RIPA, 30µg de l'extrait protéique cellulaire ont été séparées sur un gel d'électrophorèse SDS PAGE de 12% puis transférées sur une membrane PVDF et analysées par immunoblotting avec l'anticorps anti-Cathepsine K. Les résultats sont représentatifs d'une seule et unique expérience. Après quantification de l'intensité des bandes par densitométrie, les résultats de ont été standardisés par ceux de l'α-tubuline et sont présentés sous forme de ratio par rapport au contrôle Wt.

Figure 62: Effets des flavonoïdes (QE, IR, RU) et de composés phénoliques (VA, SA, FA) sur l'expression protéique de la NLRP3 (85kDa). Les cellules microgliales BV-2 Wt et Acox1-/- ont été prétraitées pendant 3H avec différentes concentrations (30–100 µM) de flavonoïdes et de composés phénoliques puis incubées avec du LPS (1µg/ml) pendant 24h. Après une Lyse du culot cellulaire dans un tampon de lyse RIPA, 30µg de l'extrait protéique cellulaire ont été séparées sur un gel d'électrophorèse SDS PAGE de 12% puis transférées sur une membrane PVDF et analysées par immunoblotting avec l'anticorps anti-Nlrp3, Les résultats sont représentatifs d'une seule et unique expérience. Après quantification de l'intensité des bandes par densitométrie, les résultats de ont été standardisés par ceux de l'α-tubuline et sont présentés sous forme de ratio par rapport au contrôle Wt.

Figure 63 Effets des flavonoïdes (QE, IR, RU) sur l'expression protéique de IL1B (31kDa). Les cellules microgliales BV-2 Wt et Acox1-/- ont été prétraitées pendant 3H avec différentes concentrations (30–100 µM) de flavonoïdes puis incubées avec du LPS (1µg/ml) pendant 24h. Après une Lyse du culot cellulaire dans un tampon de lyse RIPA, 30µg de l'extrait protéique cellulaire ont été séparés sur un gel d'électrophorèse SDS PAGE de 12% puis transférées sur une membrane PVDF et analysées par immunoblotting avec l'anticorps anti-Il-1b, Les résultats sont représentatifs d'une seule expérience. Après quantification de l'intensité des bandes par densitométrie, les résultats de ont été standardisés par ceux de l'α-tubuline et sont présentés sous forme de ratio par rapport au contrôle Wt.

Liste des tableaux

- Tableau 1:** Composition chimique en fibres alimentaires, sucres et protéines dans les différentes parties d'*O. ficus indica* (Silva et al. 2021)
- Tableau 2:** Contenu en vitamines dans les différentes parties d'*O. ficus indica*
- Tableau 3:** La composition en minéraux dans la plante d'*O. ficus indica* (L.) Mill.
- Tableau 4:** Contenu en acides gras dans la plante *O. ficus indica*
- Tableau 5:** Contenu en acide aminés dans la plante *O. ficus indica*
- Tableau 6:** Le contenu en stérols dans la plante d'*Opuntia ficus indica*
- Tableau 7:** Contenu en phénols et flavonoïdes de la plante d'*O. ficus indica* : Revue de (El-Mostafa et al. 2014)
- Tableau 8:** Différentes méthodes d'extraction de l'huile de graines de cactus, solvants, temps d'extraction et rendement.(Al-Naqeb et Aprea 2021)
- Tableau 9:** Effets anti-inflammatoires de l'isorhamnetine et ses mécanismes d'actions d'après (G. Gong et al. 2020)
- Tableau 10:** Les voies métaboliques associées au gène *Acox1* présentes dans différents compartiments cellulaires avec le nombre de protéines, de métabolites et de réactions.
- Tableau 11:** Conception de l'étude expérimentale sur les souris
- Tableau 12:** Mélange réactionnel pour la transcription inverse
- Tableau 13:** Programme de la transcription inverse dans le thermocycleur
- Tableau 14:** Mélange réactionnel de la qPCR
- Tableau 15:** Séquences d'amorces utilisées pour la qPCR
- Tableau 16:** Programme de qPCR
- Tableau 17:** Les anticorps primaires utilisés pour a réalisation de la technique d'immunoblotting
- Tableau 18:** Les anticorps secondaires utilisés pour reconnaître les anticorps primaires
- Tableau 19 :** Valeurs RSS de distribution de la protéine peroxysomale catalase de 3 expériences indépendantes, obtenues par la technique de Western Blot dans les différentes fractions subcellulaires N, M, L, P, S, des 3 lignées cellulaires (WT, ACOX1-KO et ABCD1/D2-KO) après centrifugation différentielle (Frct4 : Fractionnement N°4, Fract8 : Fractionnement N°8, Frct9 : Fractionnement N°9)
- Tableau 20:** Les moyennes de densités médianes de trois expériences indépendantes de fractionnement sur gradient de de Nycodenz de densité allant de 1,06 à 1,26 g/ml après analyse par immunoblotting de catalase, enzyme marqueur du peroxysome
- Tableau 21:** Les moyennes de densités médianes de trois expériences indépendantes de fractionnement sur gradient de de Nycodenz de densité allant de 1,06 à 1,26 g/ml après dosage de l'activité de la catalase, enzyme marqueur du peroxysome.

VI. Bibliographie

- Abbas, Eman Yasser, Marwa I. Ezzat, Hala Mohamed El Hefnawy, et Essam Abdel-Sattar. 2022. « An overview and update on the chemical composition and potential health benefits of *Opuntia ficus-indica* (L.) Miller ». *Journal of Food Biochemistry*, juillet, e14310. <https://doi.org/10.1111/jfbc.14310>.
- Abdel-Hameed, El-Sayed S., Mohamed A. Nagaty, Mahmood S. Salman, et Salih A. Bazaid. 2014. « Phytochemicals, nutritional and antioxidant properties of two prickly pear cactus cultivars (*Opuntia ficus indica* Mill.) growing in Taif, KSA ». *Food Chemistry* 160 (octobre) : 31-38. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.03.060>.
- Abdulkhaleq, L. A., M. A. Assi, Rasedee Abdullah, M. Zamri-Saad, Y. H. Taufiq-Yap, et M. N. M. Hezme. 2018. « The crucial roles of inflammatory mediators in inflammation: A review ». *Veterinary World* 11 (5) : 627-35. <https://doi.org/10.14202/vetworld.2018.627-635>.
- Abidi, Sourour, Hichem Salem, V. Vasta, et Alessandro Priolo. 2009. « Supplementation with barley or spineless cactus (*Opuntia ficus indica* f. *inermis*) cladodes on digestion, growth and intramuscular fatty acid composition in sheep and goats receiving oaten hay ». *Small Ruminant Research* 87 (novembre) : 9-16. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2009.09.004>.
- Aboura, Ikram, Abdelhafid Nani, Meriem Belarbi, Babar Murtaza, Aurélie Fluckiger, Adélie Dumont, Chahid Benammar, et al. 2017. « Protective effects of polyphenol-rich infusions from carob (*Ceratonia siliqua*) leaves and cladodes of *Opuntia ficus-indica* against inflammation associated with diet-induced obesity and DSS-induced colitis in Swiss mice ». *Biomedicine & Pharmacotherapy = Biomedecine & Pharmacotherapie* 96 (décembre) : 1022-35. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2017.11.125>.
- Abrahamson, Magnus, Marcia Alvarez-Fernandez, et Carl-Michael Nathanson. 2003. « Cystatins ». *Biochemical Society Symposium*, n° 70 : 179-99. <https://doi.org/10.1042/bss0700179>.
- Adibhatla, Rao Muralikrishna, et J. F. Hatcher. 2008. « Altered lipid metabolism in brain injury and disorders ». *Sub-Cellular Biochemistry* 49 : 241-68. https://doi.org/10.1007/978-1-4020-8831-5_9.
- Aguirre, Leixuri, Noemi Arias, M. Teresa Macarulla, Ana Gracia, et Maria P. Portillo. 2011. « Beneficial Effects of Quercetin on Obesity and Diabetes ». *The Open Nutraceuticals Journal* 4 (1). <https://benthamopen.com/ABSTRACT/TONUTRAJ-4-189>.
- Ait El Cadi, M., S. Makram, M. Ansar, Y. Khabbal, K. Alaoui, M. A. Faouzi, Y. Cherrah, et J. Taoufik. 2012. « Activité anti-inflammatoire des extraits aqueux et éthanolique de *Zygophyllum gaetulum* ». *Annales Pharmaceutiques Françaises* 70 (2) : 113-16. <https://doi.org/10.1016/j.pharma.2011.11.004>.
- Akagi, K., M. Hirose, T. Hoshiya, Y. Mizoguchi, N. Ito, et T. Shirai. 1995. « Modulating effects of ellagic acid, vanillin and quercetin in a rat medium term multi-organ carcinogenesis model ». *Cancer Letters* 94 (1) : 113-21. [https://doi.org/10.1016/0304-3835\(95\)03833-i](https://doi.org/10.1016/0304-3835(95)03833-i).
- Akdis, Mübeccel, Alar Aab, Can Altunbulakli, Kursat Azkur, Rita A. Costa, Reto Cramer, Su Duan, et al. 2016. « Interleukins (from IL-1 to IL-38), interferons, transforming growth factor β , and TNF- α : Receptors, functions, and roles in diseases ». *The Journal of Allergy and Clinical Immunology* 138 (4) : 984-1010. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2016.06.033>.
- Akdis, Mübeccel, et Cezmi A. Akdis. 2009. « Therapeutic manipulation of immune tolerance in allergic disease ». *Nature Reviews. Drug Discovery* 8 (8) : 645-60. <https://doi.org/10.1038/nrd2653>.
- Akira, Shizuo, Satoshi Uematsu, et Osamu Takeuchi. 2006. « Pathogen recognition and innate immunity ». *Cell* 124 (4) : 783-801. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.02.015>.

- Akkol, Esra Küpeli, Mert İlhan, Büşra Karpuz, Yasin Genç, et Eduardo Sobarzo-Sánchez. 2020. « Sedative and Anxiolytic Activities of *Opuntia ficus indica* (L.) Mill.: An Experimental Assessment in Mice ». *Molecules (Basel, Switzerland)* 25 (8) : E1844. <https://doi.org/10.3390/molecules25081844>.
- Akram, Muhammad, Kyeong-A. Kim, Eun-Sun Kim, Young-Jun Shin, Dabi Noh, Eunji Kim, Jeong-Hyeon Kim, et al. 2016. « Selective inhibition of JAK2/STAT1 signaling and iNOS expression mediates the anti-inflammatory effects of coniferyl aldehyde ». *Chemico-Biological Interactions* 256 (août) : 102-10. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2016.06.029>.
- Akram, Muhammad, Ahmed Shah Syed, Kyeong-A. Kim, Jong Soo Lee, Sun-Young Chang, Chul Young Kim, et Ok-Nam Bae. 2015. « Heme oxygenase 1-mediated novel anti-inflammatory activities of *Salvia plebeia* and its active components ». *Journal of Ethnopharmacology* 174 (novembre) : 322-30. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2015.08.028>.
- Alarcon-Aguilar, Francisco Javier, Argelia Valdes-Arzate, Santiago Xolalpa-Molina, Tania Banderas-Dorantes, Manuel Jimenez-Estrada, Erica Hernandez-Galicia, et Ruben Roman-Ramos. 2003. « Hypoglycemic activity of two polysaccharides isolated from *Opuntia ficus-indica* and *O. streptacantha* ». *Proceedings of the Western Pharmacology Society* 46 : 139-42.
- Albuquerque, Tânia Gonçalves, Filipa Santos, Ana Sanches-Silva, M. Beatriz Oliveira, Ana Cristina Bento, et Helena S. Costa. 2016. « Nutritional and phytochemical composition of *Annona cherimola* Mill. fruits and by-products: Potential health benefits ». *Food Chemistry* 193 (février) : 187-95. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.06.044>.
- Aldini, Rita, Matteo Micucci, Monica Cevenini, Romana Fato, Christian Bergamini, Cristina Nanni, Massimiliano Cont, et al. 2014. « Antiinflammatory effect of phytosterols in experimental murine colitis model: prevention, induction, remission study ». *PLoS One* 9 (9) : e108112. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0108112>.
- Ali, Hatem Salama Mohamed, Abdulrahman Saleh Al-Khalifa, et Hans Brückner. 2014. « Taurine is absent from amino components in fruits of *Opuntia ficus-indica* ». *SpringerPlus* 3 (1) : 663. <https://doi.org/10.1186/2193-1801-3-663>.
- Alimi, Hichem, Najla Hfaiedh, Zouhour Bouoni, Mbarka Hfaiedh, Mohsen Sakly, Lazhar Zourgui, et Khémair Ben Rhouma. 2010. « Antioxidant and antiulcerogenic activities of *Opuntia ficus indica* f. *inermis* root extract in rats ». *Phytomedicine: International Journal of Phytotherapy and Phytopharmacology* 17 (14) : 1120-26. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2010.05.001>.
- Allan, S. M., et N. J. Rothwell. 2001. « Cytokines and acute neurodegeneration ». *Nature Reviews. Neuroscience* 2 (10) : 734-44. <https://doi.org/10.1038/35094583>.
- Al-Naqeb, Ghanya. 2015. « Effect of prickly pear cactus seeds oil on the blood glucose level of streptozotocin-induced diabetic rats and its molecular mechanisms ». *International Journal of Herbal Medicine* 2015; 3(4): 29-34 3 (octobre) : 29-34.
- Al-Naqeb, Ghanya, et Eugenio Aprea. 2021. « Prickly Pear Seed Oil Extraction, Chemical Characterization and Potential Health Benefits ». *Molecules (Basel, Switzerland)* 26 (16) : 5018. <https://doi.org/10.3390/molecules26165018>.
- Al-Naqeb, Ghanya, Luca Fiori, Marco Ciolli, et Eugenio Aprea. 2021. « Prickly Pear Seed Oil Extraction, Chemical Characterization and Potential Health Benefits ». *Molecules (Basel, Switzerland)* 26 (16) : 5018. <https://doi.org/10.3390/molecules26165018>.
- Altiok, Ozden, Ryuji Yasumatsu, Gulbin Bingol-Karakoc, Richard J. Riese, Mildred T. Stahlman, William Dwyer, Richard A. Pierce, Dieter Bromme, Ekkehard Weber, et Sule Cataltepe. 2006. « Imbalance between cysteine proteases and inhibitors in a baboon model of bronchopulmonary dysplasia ». *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 173 (3) : 318-26. <https://doi.org/10.1164/rccm.200503-425OC>.

- Ammar, Imène, Amal BenAmira, Ibtihel Khemakem, Hamadi Attia, et Monia Ennouri. 2017. « Effect of *Opuntia ficus-indica* flowers maceration on quality and on heat stability of olive oil ». *Journal of Food Science and Technology* 54 (6) : 1502-10. <https://doi.org/10.1007/s13197-017-2581-0>.
- Anavi, Sarit, et Oren Tirosh. 2020. « INOS as a metabolic enzyme under stress conditions ». *Free Radical Biology & Medicine* 146 (janvier) : 16-35. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2019.10.411>.
- Andreu Coll, Lucía, Marina Cano-Lamadrid, Esther Sendra, Angel Carbonell-Barrachina, Pilar Legua, et Francisca Hernandez. 2019. « Fatty acid profile of fruits (pulp and peel) and cladodes (young and old) of prickly pear [*Opuntia ficus-indica* (L.) Mill.] from six Spanish cultivars ». *Journal of Food Composition and Analysis* 84 (août) : 103294. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2019.103294>.
- Anwikar, Shraddha, et Milind Bhitre. 2010. « Study of the synergistic anti-inflammatory activity of *Solanum xanthocarpum* Schrad and Wendl and *Cassia fistula* Linn ». *International Journal of Ayurveda Research* 1 (3) : 167-71. <https://doi.org/10.4103/0974-7788.72489>.
- Appelmans, F., R. Wattiaux, et C. De Duve. 1955. « Tissue fractionation studies. 5. The association of acid phosphatase with a special class of cytoplasmic granules in rat liver ». *The Biochemical Journal* 59 (3) : 438-45. <https://doi.org/10.1042/bj0590438>.
- Aravalli, Rajagopal N., Phillip K. Peterson, et James R. Lokensgard. 2007. « Toll-like receptors in defense and damage of the central nervous system ». *Journal of Neuroimmune Pharmacology: The Official Journal of the Society on Neuroimmune Pharmacology* 2 (4) : 297-312. <https://doi.org/10.1007/s11481-007-9071-5>.
- Arora, Cheshta, Hansashree Padmanabha, Rita Christopher, Rohan Mahale, Maya Bhat, Gautham Arunachal, Ravi Shekhar, Pooja Mailankody, et P. S. Mathuranath. 2022. « Pseudo-neonatal Adrenoleukodystrophy: A Rare Peroxisomal Disorder ». *Annals of Indian Academy of Neurology* 25 (2) : 275-78. https://doi.org/10.4103/aian.AIAN_486_21.
- Asagiri, Masataka, Toshitake Hirai, Toshihiro Kunigami, Shunya Kamano, Hans-Jürgen Gober, Kazuo Okamoto, Keizo Nishikawa, et al. 2008. « Cathepsin K-dependent toll-like receptor 9 signaling revealed in experimental arthritis ». *Science (New York, N.Y.)* 319 (5863) : 624-27. <https://doi.org/10.1126/science.1150110>.
- Astello-García, Marizel G., Ilse Cervantes, Vimal Nair, María del Socorro Santos-Díaz, Antonio Reyes-Agüero, Françoise Guéraud, Anne Negre-Salvayre, Michel Rossignol, Luis Cisneros-Zevallos, et Ana P. Barba de la Rosa. 2015. « Chemical composition and phenolic compounds profile of cladodes from *Opuntia* spp. cultivars with different domestication gradient ». *Journal of Food Composition and Analysis* 43 (novembre) : 119-30. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2015.04.016>.
- Attanzio, Alessandro, Luisa Tesoriere, Sonya Vasto, Anna Maria Pintaudi, Maria A. Livrea, et Mario Allegra. 2018. « Short-term cactus pear [*Opuntia ficus-indica* (L.) Mill] fruit supplementation ameliorates the inflammatory profile and is associated with improved antioxidant status among healthy humans ». *Food & Nutrition Research* 62. <https://doi.org/10.29219/fnr.v62.1262>.
- Ayadi, M. A., W. Abdelmaksoud, M. Ennouri, et H. Attia. 2009. « Cladodes from *Opuntia ficus indica* as a source of dietary fiber: Effect on dough characteristics and cake making ». *Industrial Crops and Products* 30 (1) : 40-47. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2009.01.003>.
- Baarine, M., P. Andréoletti, A. Athias, T. Nury, A. Zarrouk, K. Ragot, A. Vejux, et al. 2012. « Evidence of oxidative stress in very long chain fatty acid-treated oligodendrocytes and potentialization of ROS production using RNA interference-directed knockdown of ABCD1 and ACOX1 peroxisomal proteins ». *Neuroscience* 213 (juin) : 1-18. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2012.03.058>.
- Baes, Myriam, et Patrick Aubourg. 2009. « Peroxisomes, myelination, and axonal integrity in the CNS ». *The Neuroscientist: A Review Journal Bringing Neurobiology, Neurology and Psychiatry* 15 (4) : 367-79. <https://doi.org/10.1177/1073858409336297>.
- Bagad, Mayur, et Zaved Ahmed Khan. 2015. « Poly(n-butylcyanoacrylate) nanoparticles for oral delivery of quercetin: preparation, characterization, and pharmacokinetics and biodistribution studies in

- Wistar rats ». *International Journal of Nanomedicine* 10 (1) : 3921-35.
<https://doi.org/10.2147/IJN.S80706>.
- Baggiolini, M., et I. Clark-Lewis. 1992. « Interleukin-8, a chemotactic and inflammatory cytokine ». *FEBS letters* 307 (1) : 97-101. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(92\)80909-z](https://doi.org/10.1016/0014-5793(92)80909-z).
- Balkwill, Frances. 2006. « TNF-alpha in promotion and progression of cancer ». *Cancer Metastasis Reviews* 25 (3) : 409-16. <https://doi.org/10.1007/s10555-006-9005-3>.
- Banks, William A., et Sandra M. Robinson. 2010. « Minimal penetration of lipopolysaccharide across the murine blood-brain barrier ». *Brain, Behavior, and Immunity* 24 (1) : 102-9.
<https://doi.org/10.1016/j.bbi.2009.09.001>.
- Barbera, G., P. Inglese, et E. Pimienta-Barrios. 1995. « Agro-ecology, cultivation and uses of cactus pear ». *FAO Plant Production and Protection Paper (FAO)*.
https://scholar.google.com/scholar_lookup?title=Agro-ecology%2C+cultivation+and+uses+of+cactus+pear&author=Barbera%2C+G.+%28ed.%29&publication_year=1995.
- Barclay, L. R. C., F. Xi, et J. Q. Norris. 1997. « Antioxidant Properties of Phenolic Lignin Model Compounds ». *Journal of Wood Chemistry and Technology* 17 (1-2) : 73-90.
<https://doi.org/10.1080/02773819708003119>.
- Bardaa, Sana, Mouna Turki, Sameh Ben Khedir, Massara Mzid, Tarek Rebai, Fatma Ayadi, et Zouheir Sahnoun. 2020. « The Effect of Prickly Pear, Pumpkin, and Linseed Oils on Biological Mediators of Acute Inflammation and Oxidative Stress Markers ». *BioMed Research International* 2020 (août) : e5643465. <https://doi.org/10.1155/2020/5643465>.
- Bastianetto, Stéphane, Zhi-Xing Yao, Vassilios Papadopoulos, et Rémi Quirion. 2006. « Neuroprotective effects of green and black teas and their catechin gallate esters against beta-amyloid-induced toxicity ». *The European Journal of Neuroscience* 23 (1) : 55-64. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2005.04532.x>.
- Baudhuin, P., H. Beaufay, Y. Rahman-Li, O. Z. Sellinger, R. Wattiaux, P. Jacques, et C. De Duve. 1964. « Tissue fractionation studies. 17. Intracellular distribution of monoamine oxidase, aspartate aminotransferase, alanine aminotransferase, D-amino acid oxidase and catalase in rat-liver tissue ». *The Biochemical Journal* 92 (1) : 179-84. <https://doi.org/10.1042/bj0920179>.
- Baudhuin, P., A. N. Berleur, C. De Duve, et R. Wattiaux. 1956. « Tissue fractionation studies. VIII. Cellular localization of bound enzymes ». *The Biochemical Journal* 63 (4) : 608-12.
<https://doi.org/10.1042/bj0630608>.
- Beaufay, H., D. S. Bendall, P. Baudhun, R. Wattiaux, et C. De Duve. 1959. « Tissue fractionation studies. 13. Analysis of mitochondrial fractions from rat liver by density-gradient centrifuging ». *The Biochemical Journal* 73 (décembre) : 628-37. <https://doi.org/10.1042/bj0730628>.
- Beaufay, H., P. Jacques, P. Baudhuin, O. Z. Sellinger, J. Berthet, et C. De Duve. 1964. « Tissue fractionation studies. 18. Resolution of mitochondrial fractions from rat liver into three distinct populations of cytoplasmic particles by means of density equilibration in various gradients ». *The Biochemical Journal* 92 (1) : 184-205. <https://doi.org/10.1042/bj0920184>.
- Becer, Eda, Hilal Kabadayı, Filiz Meriçli, Ali Hikmet Meriçli, Barış Kivançlı, et Seda Vatanserver. 2018. « Apoptotic Effects of Opuntia ficus indica L. Seed Oils on Colon Adenocarcinoma Cell Lines ». *Proceedings* 2 (25) : 1566. <https://doi.org/10.3390/proceedings2251566>.
- Beigelman, Avraham, Megan Isaacson-Schmid, Geneline Sajol, Jack Baty, Oscar M. Rodriguez, Erin Leege, Kevin Lyons, et al. 2015. « Randomized trial to evaluate azithromycin's effects on serum and upper airway IL-8 levels and recurrent wheezing in infants with respiratory syncytial virus bronchiolitis ». *The Journal of Allergy and Clinical Immunology* 135 (5) : 1171-1178.e1.
<https://doi.org/10.1016/j.jaci.2014.10.001>.

- Beken, Burcin, Riza Serttas, Mehtap Yazicioglu, Kader Turkecul, et Suat Erdogan. 2020. « Quercetin Improves Inflammation, Oxidative Stress, and Impaired Wound Healing in Atopic Dermatitis Model of Human Keratinocytes ». *Pediatric Allergy, Immunology, and Pulmonology* 33 (2) : 69-79. <https://doi.org/10.1089/ped.2019.1137>.
- Ben Saad, Anouar, Brahmi Dalel, Ilhem Rjeibi, Amani Smida, Sana Ncib, Nacim Zouari, et Lazhar Zourgui. 2017. « Phytochemical, antioxidant and protective effect of cactus cladodes extract against lithium-induced liver injury in rats ». *Pharmaceutical Biology* 55 (1) : 516-25. <https://doi.org/10.1080/13880209.2016.1255976>.
- Bennett, Jeanette M., Glenn Reeves, George E. Billman, et Joachim P. Sturmborg. 2018. « Inflammation-Nature's Way to Efficiently Respond to All Types of Challenges: Implications for Understanding and Managing "the Epidemic" of Chronic Diseases ». *Frontiers in Medicine* 5 : 316. <https://doi.org/10.3389/fmed.2018.00316>.
- Bensadón, Sara, Deisy Hervert-Hernández, Sonia G. Sáyago-Ayerdi, et Isabel Goñi. 2010. « By-products of *Opuntia ficus-indica* as a source of antioxidant dietary fiber ». *Plant Foods for Human Nutrition (Dordrecht, Netherlands)* 65 (3) : 210-16. <https://doi.org/10.1007/s11130-010-0176-2>.
- Bensinger, Steven J., et Peter Tontonoz. 2008. « Integration of metabolism and inflammation by lipid-activated nuclear receptors ». *Nature* 454 (7203) : 470-77. <https://doi.org/10.1038/nature07202>.
- Benz, Christopher C., et Christina Yau. 2008. « Ageing, oxidative stress and cancer: paradigms in parallax ». *Nature Reviews. Cancer* 8 (11) : 875-79. <https://doi.org/10.1038/nrc2522>.
- Berger, Johannes, et Jutta Gärtner. 2006. « X-linked adrenoleukodystrophy: clinical, biochemical and pathogenetic aspects ». *Biochimica Et Biophysica Acta* 1763 (12) : 1721-32. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2006.07.010>.
- Bergner, Caroline G., Franziska van der Meer, Anne Winkler, Claudia Wrzos, Mevlude Türkmen, Emil Valizada, Dirk Fitzner, et al. 2019. « Microglia damage precedes major myelin breakdown in X-linked adrenoleukodystrophy and metachromatic leukodystrophy ». *Glia* 67 (6) : 1196-1209. <https://doi.org/10.1002/glia.23598>.
- Berraaouan, Ali, Ziyat Abderrahim, Mekhfi Hassane, Legssyer Abdelkhaleq, Aziz Mohammed, et Bnouham Mohamed. 2015. « Evaluation of protective effect of cactus pear seed oil (*Opuntia ficus-indica* L. MILL.) against alloxan-induced diabetes in mice ». *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine* 8 (7) : 532-37. <https://doi.org/10.1016/j.apjtm.2015.06.013>.
- Berraaouan, Ali, Abderrahim Ziyat, Hassane Mekhfi, Abdelkhaleq Legssyer, Marianne Sindic, Mohammed Aziz, et Mohamed Bnouham. 2014a. « Evaluation of antidiabetic properties of cactus pear seed oil in rats ». *Pharmaceutical Biology* 52 (10) : 1286-90. <https://doi.org/10.3109/13880209.2014.890230>.
- . 2014b. « Evaluation of antidiabetic properties of cactus pear seed oil in rats ». *Pharmaceutical Biology* 52 (10) : 1286-90. <https://doi.org/10.3109/13880209.2014.890230>.
- Bezerra, Daniel Pereira, Anne Karine Nascimento Soares, et Damião Pergentino de Sousa. 2016. « Overview of the Role of Vanillin on Redox Status and Cancer Development ». *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 2016 : 9734816. <https://doi.org/10.1155/2016/9734816>.
- Bishop-Bailey, David, et Jonas Bystrom. 2009. « Emerging roles of peroxisome proliferator-activated receptor-beta/delta in inflammation ». *Pharmacology & Therapeutics* 124 (2) : 141-50. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2009.06.011>.
- Blasi, E., R. Barluzzi, V. Bocchini, R. Mazzolla, et F. Bistoni. 1990. « Immortalization of murine microglial cells by a v-raf/v-myc carrying retrovirus ». *Journal of Neuroimmunology* 27 (2-3) : 229-37. [https://doi.org/10.1016/0165-5728\(90\)90073-v](https://doi.org/10.1016/0165-5728(90)90073-v).
- Boesch-Saadatmandi, Christine, Agnieszka Loboda, Anika E. Wagner, Anna Stachurska, Alicja Jozkowicz, Jozef Dulak, Frank Döring, Siegfried Wolffram, et Gerald Rimbach. 2011. « Effect of quercetin

- and its metabolites isorhamnetin and quercetin-3-glucuronide on inflammatory gene expression: role of miR-155 ». *The Journal of Nutritional Biochemistry* 22 (3) : 293-99. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2010.02.008>.
- Boonen, Marielle, Isabelle Hamer, Muriel Boussac, Anne-Françoise Delsaute, Bruno Flamion, Jérôme Garin, et Michel Jadot. 2006. « Intracellular localization of p40, a protein identified in a preparation of lysosomal membranes ». *The Biochemical Journal* 395 (1) : 39-47. <https://doi.org/10.1042/BJ20051647>.
- Boonen, Marielle, Emeline Puissant, Florentine Gilis, Bruno Flamion, et Michel Jadot. 2014. « Mouse liver lysosomes contain enzymatically active processed forms of Hyal-1 ». *Biochemical and Biophysical Research Communications* 446 (4) : 1155-60. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2014.03.070>.
- Boonen, Marielle, Roberta Rezende de Castro, Gaëlle Cuvelier, Isabelle Hamer, et Michel Jadot. 2008. « A dileucine signal situated in the C-terminal tail of the lysosomal membrane protein p40 is responsible for its targeting to lysosomes ». *The Biochemical Journal* 414 (3) : 431-40. <https://doi.org/10.1042/BJ20071626>.
- Bossard, M. J., T. A. Tomaszek, S. K. Thompson, B. Y. Amegadzie, C. R. Hanning, C. Jones, J. T. Kurdyla, et al. 1996. « Proteolytic activity of human osteoclast cathepsin K. Expression, purification, activation, and substrate identification ». *The Journal of Biological Chemistry* 271 (21) : 12517-24. <https://doi.org/10.1074/jbc.271.21.12517>.
- Boubaker, J., W. Bhourri, M. Ben Sghaier, K. Ghedira, M. G. Dijoux Franca, et L. Chekir-Ghedira. 2011. « Ethyl acetate extract and its major constituent, isorhamnetin 3-O-rutinoside, from *Nitraria retusa* leaves, promote apoptosis of human myelogenous erythroleukaemia cells ». *Cell Proliferation* 44 (5) : 453-61. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2184.2011.00772.x>.
- Bouhrim, Mohamed, Nour Elhouda Daoudi, Hayat Ouassou, Amina Benoutman, El Hassania Loukili, Abderrahim Ziyat, Hassane Mekhfi, Abdelkhalq Legssyer, Mohammed Aziz, et Mohamed Bnouham. 2020. « Phenolic Content and Antioxidant, Antihyperlipidemic, and Antidiabetogenic Effects of *Opuntia dillenii* Seed Oil ». *TheScientificWorldJournal* 2020 : 5717052. <https://doi.org/10.1155/2020/5717052>.
- Bouic, P. J. 2001. « The role of phytosterols and phytosterolins in immune modulation: a review of the past 10 years ». *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care* 4 (6) : 471-75. <https://doi.org/10.1097/00075197-200111000-00001>.
- Boukeloua, A., A. Belkhir, Z. Djerrou, L. Bahri, N. Boulebda, et Y. H. Pacha. 2012. « Acute Toxicity of *Opuntia Ficus Indica* and *Pistacia Lentiscus* Seed Oils in Mice ». *African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines* 9 (4) : 607-11. <https://doi.org/10.4314/ajtcam.v9i4.19>.
- Boutakiout, A., D. Elothmani, H. Hanine, M. Mahrouz, D. Le Meurlay, I. Hmid, et Said Ennahli. 2018. « Effects of different harvesting seasons on antioxidant activity and phenolic content of prickly pear cladode juice ». *Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences* 17 (4) : 471-80. <https://doi.org/10.1016/j.jssas.2016.11.005>.
- Bozkurt, Aras Adem, Guven Mustafa, Akman Tarik, Ozkan Adile, Sen Halil Murat, Kilicoglu Mesut, Kalkan Yildiray, Silan Coskun, et Cosar Murat. 2014. « Syringaldehyde exerts neuroprotective effect on cerebral ischemia injury in rats through anti-oxidative and anti-apoptotic properties ». *Neural Regeneration Research* 9 (21) : 1884-90. <https://doi.org/10.4103/1673-5374.145353>.
- Brahmi, Dalel, Yousra Ayed, Mbarka Hfaiedh, Chayma Bouaziz, Hedi Ben Mansour, Lazhar Zourgui, et Hassen Bacha. 2012. « Protective effect of cactus cladode extract against cisplatin induced oxidative stress, genotoxicity and apoptosis in balb/c mice: combination with phytochemical composition ». *BMC Complementary and Alternative Medicine* 12 (1) : 111. <https://doi.org/10.1186/1472-6882-12-111>.

- Brahmi, Dalel, Chayma Bouaziz, Yousra Ayed, Hédi Ben Mansour, Lazhar Zourgui, et Hassen Bacha. 2011. « Chemopreventive effect of cactus *Opuntia ficus indica* on oxidative stress and genotoxicity of aflatoxin B1 ». *Nutrition & Metabolism* 8 (octobre) : 73. <https://doi.org/10.1186/1743-7075-8-73>.
- Brahmi, Fatiha, Souhila Haddad, Kenza Bouamara, Drifa Yalaoui-Guellal, Emmanuelle Prost-Camus, Jean-Paul Pais de Barros, Michel Prost, et al. 2020. « Comparison of chemical composition and biological activities of Algerian seed oils of *Pistacia lentiscus* L., *Opuntia ficus indica* (L.) mill. and *Argania spinosa* L. Skeels ». *Industrial Crops and Products* 151 (septembre) : 112456. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2020.112456>.
- Brites, Pedro, Hans R. Waterham, et Ronald J. A. Wanders. 2004. « Functions and biosynthesis of plasmalogens in health and disease ». *Biochimica Et Biophysica Acta* 1636 (2-3) : 219-31. <https://doi.org/10.1016/j.bbali.2003.12.010>.
- Brix, Klaudia, Anna Dunkhorst, Kristina Mayer, et Silvia Jordans. 2008. « Cysteine cathepsins: cellular roadmap to different functions ». *Biochimie* 90 (2) : 194-207. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2007.07.024>.
- Brocard, C., M. Es-Souni, L. C. Ramirez, N. Latruffe, et P. Bournot. 1993. « Stimulation of peroxisomal palmitoyl-CoA oxidase activity by ciprofibrate in hepatic cell lines: comparative studies in Fao, MH1C1 and HepG2 cells ». *Biology of the Cell* 77 (1) : 37-41. [https://doi.org/10.1016/s0248-4900\(05\)80172-8](https://doi.org/10.1016/s0248-4900(05)80172-8).
- Brömme, D., K. Okamoto, B. B. Wang, et S. Biroc. 1996. « Human cathepsin O2, a matrix protein-degrading cysteine protease expressed in osteoclasts. Functional expression of human cathepsin O2 in *Spodoptera frugiperda* and characterization of the enzyme ». *The Journal of Biological Chemistry* 271 (4) : 2126-32. <https://doi.org/10.1074/jbc.271.4.2126>.
- Brown, Guy C., et Jonas J. Neher. 2014. « Microglial phagocytosis of live neurons ». *Nature Reviews Neuroscience* 15 (4) : 209-16. <https://doi.org/10.1038/nrn3710>.
- Brown, Sheena D., Lou Ann Brown, Susan Stephenson, Jennifer C. Dodds, Shaneka L. Douglas, Hongyan Qu, et Anne M. Fitzpatrick. 2015. « Characterization of a high TNF- α phenotype in children with moderate-to-severe asthma ». *The Journal of Allergy and Clinical Immunology* 135 (6) : 1651-54. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2014.08.054>.
- Budinsky, A., R. Wolfram, A. Oguogho, Y. Efthimiou, Y. Stamatopoulos, et H. Sinzinger. 2001. « Regular ingestion of *Opuntia robusta* lowers oxidation injury ». *Prostaglandins, Leukotrienes, and Essential Fatty Acids* 65 (1) : 45-50. <https://doi.org/10.1054/plef.2001.0287>.
- Bureau, Genevieve, Fanny Longpré, et M.-G. Martinoli. 2008. « Resveratrol and quercetin, two natural polyphenols, reduce apoptotic neuronal cell death induced by neuroinflammation ». *Journal of Neuroscience Research* 86 (2) : 403-10. <https://doi.org/10.1002/jnr.21503>.
- Burke, Sarah M., Thomas B. Issekutz, Karkada Mohan, Patrick W. K. Lee, Maya Shmulevitz, et Jean S. Marshall. 2008. « Human mast cell activation with virus-associated stimuli leads to the selective chemotaxis of natural killer cells by a CXCL8-dependent mechanism ». *Blood* 111 (12) : 5467-76. <https://doi.org/10.1182/blood-2007-10-118547>.
- Burke, Susan J., Barrett L. Updegraff, Rachel M. Bellich, Matthew R. Goff, Danhong Lu, Steven C. Minkin, Michael D. Karlstad, et J. Jason Collier. 2013. « Regulation of iNOS gene transcription by IL-1 β and IFN- γ requires a coactivator exchange mechanism ». *Molecular Endocrinology (Baltimore, Md.)* 27 (10) : 1724-42. <https://doi.org/10.1210/me.2013-1159>.
- Burns, K., J. Clatworthy, L. Martin, F. Martinon, C. Plumpton, B. Maschera, A. Lewis, K. Ray, J. Tschopp, et F. Volpe. 2000. « Tollip, a new component of the IL-1RI pathway, links IRAK to the IL-1 receptor ». *Nature Cell Biology* 2 (6) : 346-51. <https://doi.org/10.1038/35014038>.
- Butera, Daniela, Luisa Tesoriere, Francesca Di Gaudio, Antonino Bongiorno, Mario Allegra, Anna Maria Pintaudi, Rohn Kohen, et Maria A. Livrea. 2002. « Antioxidant Activities of Sicilian Prickly Pear

- (*Opuntia ficus indica*) Fruit Extracts and Reducing Properties of Its Betalains: Betanin and Indicaxanthin ». *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50 (23) : 6895-6901.
<https://doi.org/10.1021/jf025696p>.
- Butterweck, Veronika, Lydia Semlin, Bjoern Feistel, Ivo Pischel, Katrin Bauer, et Eugen J. Verspohl. 2011. « Comparative evaluation of two different *Opuntia ficus-indica* extracts for blood sugar lowering effects in rats ». *Phytotherapy research: PTR* 25 (3) : 370-75. <https://doi.org/10.1002/ptr.3271>.
- Buttini, M., S. Limonta, et H. W. Boddeke. 1996. « Peripheral administration of lipopolysaccharide induces activation of microglial cells in rat brain ». *Neurochemistry International* 29 (1) : 25-35. [https://doi.org/10.1016/0197-0186\(95\)00141-7](https://doi.org/10.1016/0197-0186(95)00141-7).
- Bythrow, Jenna Deanne. 2005. « Vanilla as a Medicinal Plant ». *Seminars in Integrative Medicine* 4 (3) : 129-31. <https://doi.org/10.1016/j.sigm.2006.03.001>.
- Camarena-Ordóñez, Daniel Raul, Janet Gutierrez-Urbe, Carmen Hernandez-Brenes, et Susanne Mertens-Talcott. 2010. « Prickly pear seed extracts with antioxidant and cancer-preventing capacity ». *The FASEB Journal* 24 (S1) : 928.17-928.17. https://doi.org/10.1096/fasebj.24.1_supplement.928.17.
- Campagno, Keith E., et Claire H. Mitchell. 2021. « The P2X7 Receptor in Microglial Cells Modulates the Endolysosomal Axis, Autophagy, and Phagocytosis ». *Frontiers in Cellular Neuroscience* 15 : 645244. <https://doi.org/10.3389/fncel.2021.645244>.
- Candelario Mondragón-Jacobo (ed) and Salvador Pérez-González (ed) et Plant Production and Protection Division. 2002. *Cactus (Opuntia spp.) as forage*. Étude FAO: Production Végétale et Protection des Plantes 1020. Rome, Italy : FAO. <https://www.fao.org/publications/card/fr/c/cefa9d40-eb22-5ce8-a4fb-ade184d0b4ac/>.
- Cano, M. P., A. Gómez-Maqueo, T. García-Cayuela, et J. Welte-Chanes. 2017. « Characterization of carotenoid profile of Spanish Sanguinos and Verdal prickly pear (*Opuntia ficus-indica*, spp.) tissues ». *Food Chemistry* 237 (décembre) : 612-22. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.05.135>.
- Cao, Cheng, Yumei Leng, et Donald Kufe. 2003. « Catalase activity is regulated by c-Abl and Arg in the oxidative stress response ». *The Journal of Biological Chemistry* 278 (32) : 29667-75. <https://doi.org/10.1074/jbc.M301292200>.
- Carbonell, Teresa, et Aldrin V. Gomes. 2020. « MicroRNAs in the regulation of cellular redox status and its implications in myocardial ischemia-reperfusion injury ». *Redox Biology* 36 (septembre) : 101607. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2020.101607>.
- Cartier, Nathalie, Salima Hacin-Bey-Abina, Cynthia C. Bartholomae, Gabor Veres, Manfred Schmidt, Ina Kutschera, Michel Vidaud, et al. 2009. « Hematopoietic stem cell gene therapy with a lentiviral vector in X-linked adrenoleukodystrophy ». *Science (New York, N.Y.)* 326 (5954) : 818-23. <https://doi.org/10.1126/science.1171242>.
- Castle, J. David. 2003. « Purification of organelles from mammalian cells ». *Current Protocols in Immunology* Chapter 8 (novembre) : Unit 8.1B. <https://doi.org/10.1002/0471142735.im0801bs56>.
- . 2004. « Overview of cell fractionation ». *Current Protocols in Protein Science* Chapter 4 (septembre) : Unit 4.1. <https://doi.org/10.1002/0471140864.ps0401s37>.
- Cejudo-Bastante, María Jesús, Makhlof Chaalal, Hayette Louaileche, Juan Parrado, et Francisco J. Heredia. 2014. « Betalain profile, phenolic content, and color characterization of different parts and varieties of *Opuntia ficus-indica* ». *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 62 (33) : 8491-99. <https://doi.org/10.1021/jf502465g>.
- Chaalal, Makhlof, Nouredine Touati, et Hayette Louaileche. 2012. « Extraction of phenolic compounds and in vitro antioxidant capacity of prickly pear seeds ». *Acta Botanica Gallica* 159 (4) : 467-75. <https://doi.org/10.1080/12538078.2012.758495>.

- Chaplin, David D. 2010. « Overview of the immune response ». *The Journal of Allergy and Clinical Immunology* 125 (2 Suppl 2) : S3-23. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2009.12.980>.
- Chauhan, Anil Kumar, Jieun Kim, Yeongjoon Lee, Pavithra K. Balasubramanian, et Yangmee Kim. 2019. « Isorhamnetin Has Potential for the Treatment of Escherichia coli-Induced Sepsis ». *Molecules (Basel, Switzerland)* 24 (21) : E3984. <https://doi.org/10.3390/molecules24213984>.
- Chauvet, Sylvain, Marielle Boonen, Mireille Chevallet, Louis Jarvis, Addis Abebe, Mohamed Benharouga, Peter Faller, Michel Jadot, et Alexandre Bouron. 2015. « The Na⁺/K⁺-ATPase and the amyloid-beta peptide aβ1-40 control the cellular distribution, abundance and activity of TRPC6 channels ». *Biochimica Et Biophysica Acta* 1853 (11 Pt A) : 2957-65. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2015.09.004>.
- Chawla, Ajay. 2010. « Control of macrophage activation and function by PPARs ». *Circulation Research* 106 (10) : 1559-69. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.110.216523>.
- Chazotte, Brad. 2011. « Labeling nuclear DNA using DAPI ». *Cold Spring Harbor Protocols* 2011 (1) : pdb.prot5556. <https://doi.org/10.1101/pdb.prot5556>.
- Chen, Huang-Hui, Tai-Chi Wang, Yen-Chen Lee, Pei-Ting Shen, Jang-Yang Chang, Teng-Kuang Yeh, Chih-Hsiang Huang, et al. 2015. « Novel Nrf2/ARE activator, trans-Coniferylaldehyde, induces a HO-1-mediated defense mechanism through a dual p38α/MAPKAPK-2 and PK-N3 signaling pathway ». *Chemical Research in Toxicology* 28 (9) : 1681-92. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrestox.5b00085>.
- Chen, Lingyang, Jianbin Cao, Donghang Cao, Mingcang Wang, Haifei Xiang, Yanqing Yang, Tingting Ying, et Haitao Cong. 2019. « Protective effect of dexmedetomidine against diabetic hyperglycemia-exacerbated cerebral ischemia/reperfusion injury: An in vivo and in vitro study ». *Life Sciences* 235 (octobre) : 116553. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2019.116553>.
- Chen, Linlin, Huidan Deng, Hengmin Cui, Jing Fang, Zhicai Zuo, Junliang Deng, Yinglun Li, Xun Wang, et Ling Zhao. 2018. « Inflammatory responses and inflammation-associated diseases in organs ». *Oncotarget* 9 (6) : 7204-18. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.23208>.
- Chen, Xueping, Chunyan Guo, et Jiming Kong. 2012. « Oxidative stress in neurodegenerative diseases ». *Neural Regeneration Research* 7 (5) : 376-85. <https://doi.org/10.3969/j.issn.1673-5374.2012.05.009>.
- Cheng, Wen-Yu, Shih-Lu Wu, Chien-Yun Hsiang, Chia-Cheng Li, Tung-Yuan Lai, Hsin-Yi Lo, Wei-Shuen Shen, et al. 2008. « Relationship Between San-Huang-Xie-Xin-Tang and its herbal components on the gene expression profiles in HepG2 cells ». *The American Journal of Chinese Medicine* 36 (4) : 783-97. <https://doi.org/10.1142/S0192415X08006235>.
- Cheng, Xiao, Ying-Lin Yang, Huan Yang, Yue-Hua Wang, et Guan-Hua Du. 2018. « Kaempferol alleviates LPS-induced neuroinflammation and BBB dysfunction in mice via inhibiting HMGB1 release and down-regulating TLR4/MyD88 pathway ». *International Immunopharmacology* 56 (mars) : 29-35. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2018.01.002>.
- Chi, Gefu, Weiting Zhong, Yan Liu, Gejin Lu, Hongming Lü, Dacheng Wang, et Fei Sun. 2016. « Isorhamnetin protects mice from lipopolysaccharide-induced acute lung injury via the inhibition of inflammatory responses ». *Inflammation Research: Official Journal of the European Histamine Research Society ... [et Al.]* 65 (1) : 33-41. <https://doi.org/10.1007/s00011-015-0887-9>.
- Chirumbolo, Salvatore. 2010. « The role of quercetin, flavonols and flavones in modulating inflammatory cell function ». *Inflammation & Allergy Drug Targets* 9 (4) : 263-85. <https://doi.org/10.2174/187152810793358741>.
- Chiteva, Rose, et Norman Wairagu. 2013. « Chemical and nutritional content of *Opuntia ficus-indica* (L.) ». *African Journal of Biotechnology* 12 (21). <https://doi.org/10.4314/ajb.v12i21>.

- Chiu, Feng-Lan, et Jen-Kun Lin. 2008. « Tomatidine inhibits iNOS and COX-2 through suppression of NF-kappaB and JNK pathways in LPS-stimulated mouse macrophages ». *FEBS letters* 582 (16) : 2407-12. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2008.05.049>.
- Cho, Chi Heung, Holim Jang, Migi Lee, Hee Kang, Ho Jjn Heo, et Dae-Ok Kim. 2017. « Sea Buckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) Leaf Extracts Protect Neuronal PC-12 Cells from Oxidative Stress ». *Journal of Microbiology and Biotechnology* 27 (7) : 1257-65. <https://doi.org/10.4014/jmb.1704.04033>.
- Choi, Min-Ji, Eun-Jung Lee, Jin-Sun Park, Su-Nam Kim, Eun-Mi Park, et Hee-Sun Kim. 2017. « Anti-inflammatory mechanism of galangin in lipopolysaccharide-stimulated microglia: Critical role of PPAR- γ signaling pathway ». *Biochemical Pharmacology* 144 (novembre) : 120-31. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2017.07.021>.
- Choi, Yung Hyun. 2016. « The cytoprotective effect of isorhamnetin against oxidative stress is mediated by the upregulation of the Nrf2-dependent HO-1 expression in C2C12 myoblasts through scavenging reactive oxygen species and ERK inactivation ». *General Physiology and Biophysics* 35 (2) : 145-54. https://doi.org/10.4149/gpb_2015034.
- Chougui, Nadia, Abderezak Tamendjari, Wahiba Hamidj, Salima Hallal, Alexandre Barras, Tristan Richard, et Romain Lariat. 2013a. « Oil composition and characterisation of phenolic compounds of *Opuntia ficus-indica* seeds ». *Food Chemistry* 139 (1-4) : 796-803. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.01.054>.
- . 2013b. « Oil composition and characterisation of phenolic compounds of *Opuntia ficus-indica* seeds ». *Food Chemistry* 139 (1-4) : 796-803. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.01.054>.
- Chrast, Roman, Gesine Saher, Klaus-Armin Nave, et Mark H. G. Verheijen. 2011. « Lipid metabolism in myelinating glial cells: lessons from human inherited disorders and mouse models ». *Journal of Lipid Research* 52 (3) : 419-34. <https://doi.org/10.1194/jlr.R009761>.
- Christofides, Anthos, Eirini Konstantinidou, Chinmay Jani, et Vassiliki A. Boussiotis. 2021. « The role of peroxisome proliferator-activated receptors (PPAR) in immune responses ». *Metabolism: Clinical and Experimental* 114 (janvier) : 154338. <https://doi.org/10.1016/j.metabol.2020.154338>.
- Chung, Hyung-Lok, Michael F. Wangler, Paul C. Marcogliese, Juyeon Jo, Thomas A. Ravenscroft, Zhongyuan Zuo, Lita Duraine, et al. 2020. « Loss- or Gain-of-Function Mutations in ACOX1 Cause Axonal Loss via Different Mechanisms ». *Neuron* 106 (4) : 589-606.e6. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2020.02.021>.
- Chung, Jae Heun, Arnold Y. Seo, Sang Woon Chung, Mi Kyung Kim, Christiaan Leeuwenburgh, Byung Pal Yu, et Hae Young Chung. 2008. « Molecular mechanism of PPAR in the regulation of age-related inflammation ». *Ageing Research Reviews* 7 (2) : 126-36. <https://doi.org/10.1016/j.arr.2008.01.001>.
- Coelho, Ana L., Cory M. Hogaboam, et Steven L. Kunkel. 2005. « Chemokines provide the sustained inflammatory bridge between innate and acquired immunity ». *Cytokine & Growth Factor Reviews* 16 (6) : 553-60. <https://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2005.03.004>.
- Coetzer, Gesine, Ntsane Sekoebetlana, et Herman Fouche. 2008. « Comparison of Cactus Pear (*Opuntia* spp.) Cultivars for Fruit Yield and Quality in the Central Free State, South Africa », janvier.
- Colonna, Marco, et Oleg Butovsky. 2017. « Microglia Function in the Central Nervous System During Health and Neurodegeneration ». *Annual Review of Immunology* 35 : 441-68. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-051116-052358>.
- Comalada, Mònica, Isabel Ballester, Elvira Bailón, Saleta Sierra, Jordi Xaus, Julio Gálvez, Fermín Sánchez de Medina, et Antonio Zarzuelo. 2006. « Inhibition of pro-inflammatory markers in primary bone marrow-derived mouse macrophages by naturally occurring flavonoids: analysis of the structure-activity relationship ». *Biochemical Pharmacology* 72 (8) : 1010-21. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2006.07.016>.

- Cornejo-Villegas, M. A., A. A. Acosta-Osorio, I. Rojas-Molina, E. Gutiérrez-Cortéz, M. A. Quiroga, M. Gaytán, G. Herrera, et M. E. Rodríguez-García. 2010. « Study of the physicochemical and pasting properties of instant corn flour added with calcium and fibers from nopal powder ». *Journal of Food Engineering* 96 (3) : 401-9. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2009.08.014>.
- Coşkuner, Yalçın, et Aziz Tekin. 2003. « Monitoring of seed composition of prickly pear (*Opuntia ficus-indica* L) fruits during maturation period ». *Journal of the Science of Food and Agriculture* 83 (8) : 846-49. <https://doi.org/10.1002/jsfa.1423>.
- Coussens, Lisa M., et Zena Werb. 2002. « Inflammation and cancer ». *Nature* 420 (6917) : 860-67. <https://doi.org/10.1038/nature01322>.
- Creagh, Emma M., Helen Conroy, et Seamus J. Martin. 2003. « Caspase-activation pathways in apoptosis and immunity ». *Immunological Reviews* 193 (juin) : 10-21. <https://doi.org/10.1034/j.1600-065x.2003.00048.x>.
- Crişan, Tania O., Theo S. Plantinga, Frank L. van de Veerdonk, Marius F. Farcaş, Monique Stoffels, Bart-Jan Kullberg, Jos W. M. van der Meer, Leo A. B. Joosten, et Mihai G. Netea. 2011. « Inflammasome-independent modulation of cytokine response by autophagy in human cells ». *PLoS One* 6 (4) : e18666. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0018666>.
- Cuervo, A. M., et J. F. Dice. 2000. « Unique properties of lamp2a compared to other lamp2 isoforms ». *Journal of Cell Science* 113 Pt 24 (décembre) : 4441-50. <https://doi.org/10.1242/jcs.113.24.4441>.
- Cuervo, Ana Maria, et Esther Wong. 2014. « Chaperone-mediated autophagy: roles in disease and aging ». *Cell Research* 24 (1) : 92-104. <https://doi.org/10.1038/cr.2013.153>.
- Dai, Xiao-jing, Na Li, Le Yu, Zi-yang Chen, Rong Hua, Xia Qin, et Yong-Mei Zhang. 2015. « Activation of BV2 microglia by lipopolysaccharide triggers an inflammatory reaction in PC12 cell apoptosis through a toll-like receptor 4-dependent pathway ». *Cell Stress & Chaperones* 20 (2) : 321-31. <https://doi.org/10.1007/s12192-014-0552-1>.
- Das, Amitabh, Jin Choul Chai, Sun Hwa Kim, Kyoung Sun Park, Young Seek Lee, Kyoung Hwa Jung, et Young Gyu Chai. 2015. « Dual RNA sequencing reveals the expression of unique transcriptomic signatures in lipopolysaccharide-induced BV-2 microglial cells ». *PLoS One* 10 (3) : e0121117. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0121117>.
- Das, Gitishree, Kyung Jik Lim, Ourlad Alzeus G. Tantengco, Harold M. Carag, Sandra Gonçalves, Anabela Romano, Swagat Kumar Das, et al. 2021. « Cactus: Chemical, nutraceutical composition and potential bio-pharmacological properties ». *Phytotherapy research: PTR* 35 (3) : 1248-83. <https://doi.org/10.1002/ptr.6889>.
- Dasu, Mohan R., Samuel Park, Sridevi Devaraj, et Ishwarlal Jialal. 2009. « Pioglitazone inhibits Toll-like receptor expression and activity in human monocytes and db/db mice ». *Endocrinology* 150 (8) : 3457-64. <https://doi.org/10.1210/en.2008-1757>.
- Davis, J. Mark, E. Angela Murphy, et Martin D. Carmichael. 2009. « Effects of the dietary flavonoid quercetin upon performance and health ». *Current Sports Medicine Reports* 8 (4) : 206-13. <https://doi.org/10.1249/JSR.0b013e3181ae8959>.
- De Duve, C. 1971. « Tissue fractionation. Past and present ». *The Journal of Cell Biology* 50 (1) : 20d-55d.
- De Duve, C., et P. Baudhuin. 1966. « Peroxisomes (microbodies and related particles) ». *Physiological Reviews* 46 (2) : 323-57. <https://doi.org/10.1152/physrev.1966.46.2.323>.
- De Duve, C., B. C. Pressman, R. Gianetto, R. Wattiaux, et F. Appelmans. 1955. « Tissue fractionation studies. 6. Intracellular distribution patterns of enzymes in rat-liver tissue ». *The Biochemical Journal* 60 (4) : 604-17. <https://doi.org/10.1042/bj0600604>.
- Della Valle, Maria Cecilia, David E. Sleat, Istvan Sohar, Ting Wen, John E. Pintar, Michel Jadot, et Peter Lobel. 2006. « Demonstration of lysosomal localization for the mammalian endymin-related protein using classical approaches combined with a novel density shift method ». *The Journal of Biological Chemistry* 281 (46) : 35436-45. <https://doi.org/10.1074/jbc.M606208200>.

- Della Valle, Maria Cecilia, David E. Sleat, Haiyan Zheng, Dirk F. Moore, Michel Jadot, et Peter Lobel. 2011. « Classification of subcellular location by comparative proteomic analysis of native and density-shifted lysosomes ». *Molecular & cellular proteomics: MCP* 10 (4) : M110.006403. <https://doi.org/10.1074/mcp.M110.006403>.
- Denizot, F., et R. Lang. 1986. « Rapid colorimetric assay for cell growth and survival. Modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability ». *Journal of Immunological Methods* 89 (2) : 271-77. [https://doi.org/10.1016/0022-1759\(86\)90368-6](https://doi.org/10.1016/0022-1759(86)90368-6).
- Devamanoharan, P. S., A. H. Ali, et S. D. Varma. 1998. « Oxidative stress to rat lens in vitro: protection by taurine ». *Free Radical Research* 29 (3) : 189-95. <https://doi.org/10.1080/10715769800300221>.
- Dhanalakshmi, Chinnasamy, Thamilarasan Manivasagam, Jagatheesan Nataraj, Arokiasamy Justin Thenmozhi, et Musthafa Mohamed Essa. 2015. « Neurosupportive Role of Vanillin, a Natural Phenolic Compound, on Rotenone Induced Neurotoxicity in SH-SY5Y Neuroblastoma Cells ». *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine: eCAM* 2015 : 626028. <https://doi.org/10.1155/2015/626028>.
- Di Cara, Francesca, Pierre Andreoletti, Doriane Tromprier, Anne Vejux, Margret H. Bülow, Julia Sellin, Gérard Lizard, Mustapha Cherkaoui-Malki, et Stéphane Savary. 2019. « Peroxisomes in Immune Response and Inflammation ». *International Journal of Molecular Sciences* 20 (16) : E3877. <https://doi.org/10.3390/ijms20163877>.
- « Dictionary - Cell: Peroxisomes - The Human Protein Atlas ». s. d. Consulté le 21 août 2022. <https://www.proteinatlas.org/learn/dictionary/cell/peroxisomes>.
- Didierlaurent, Arnaud, Brian Brissoni, Dominique Velin, Natalia Aebi, Aubry Tardivel, Edgar Käslin, Jean Claude Sirard, Georgi Angelov, Jürg Tschopp, et Kimberly Burns. 2006. « Tollip regulates proinflammatory responses to interleukin-1 and lipopolysaccharide ». *Molecular and Cellular Biology* 26 (3) : 735-42. <https://doi.org/10.1128/MCB.26.3.735-742.2006>.
- Dinarello, C. A. 1994. « The interleukin-1 family: 10 years of discovery ». *FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 8 (15) : 1314-25.
- Dinarello, C A, L Renfer, et S M Wolff. 1977. « Human leukocytic pyrogen: purification and development of a radioimmunoassay. » *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 74 (10) : 4624-27.
- Dinarello, Charles A. 2009. « Immunological and inflammatory functions of the interleukin-1 family ». *Annual Review of Immunology* 27 : 519-50. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.021908.132612>.
- Dixit, Sayali S., Michel Jadot, Istvan Sohar, David E. Sleat, Ann M. Stock, et Peter Lobel. 2011. « Loss of Niemann-Pick C1 or C2 protein results in similar biochemical changes suggesting that these proteins function in a common lysosomal pathway ». *PloS One* 6 (8) : e23677. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0023677>.
- Dobrian, Anca D., David C. Lieb, Banumathi K. Cole, David A. Taylor-Fishwick, Swarup K. Chakrabarti, et Jerry L. Nadler. 2011. « Functional and pathological roles of the 12- and 15-lipoxygenases ». *Progress in Lipid Research* 50 (1) : 115-31. <https://doi.org/10.1016/j.plipres.2010.10.005>.
- Dok-Go, Hyang, Kwang Heun Lee, Hyoung Ja Kim, Eun Ha Lee, Jiyong Lee, Yun Seon Song, Yong-Ha Lee, Changbae Jin, Yong Sup Lee, et Jungsook Cho. 2003a. « Neuroprotective effects of antioxidative flavonoids, quercetin, (+)-dihydroquercetin and quercetin 3-methyl ether, isolated from *Opuntia ficus-indica* var. *saboten* ». *Brain Research* 965 (1) : 130-36. [https://doi.org/10.1016/S0006-8993\(02\)04150-1](https://doi.org/10.1016/S0006-8993(02)04150-1).
- . 2003b. « Neuroprotective effects of antioxidative flavonoids, quercetin, (+)-dihydroquercetin and quercetin 3-methyl ether, isolated from *Opuntia ficus-indica* var. *saboten* ». *Brain Research* 965 (1-2) : 130-36. [https://doi.org/10.1016/s0006-8993\(02\)04150-1](https://doi.org/10.1016/s0006-8993(02)04150-1).

- Domiciano, Talita P., Daiko Wakita, Heather D. Jones, Timothy R. Crother, Waldiceu A. Verri, Moshe Arditi, et Kenichi Shimada. 2017. « Quercetin Inhibits Inflammasome Activation by Interfering with ASC Oligomerization and Prevents Interleukin-1 Mediated Mouse Vasculitis ». *Scientific Reports* 7 (février) : 41539. <https://doi.org/10.1038/srep41539>.
- Dong, Hongbo, Min Wu, Yingying Wang, Weihong Du, Yujiao He, et Zheng Shi. 2021. « Total Syntheses and Anti-inflammatory Activities of Syringin and Its Natural Analogues ». *Journal of Natural Products* 84 (11) : 2866-74. <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.1c00585>.
- Dora, Mohamed F., Nabil M. Taha, Mohamed A. Lebda, Aml E. Hashem, Mohamed S. Elfeky, Yasser S. El-Sayed, Soad Al Jaouni, et Ali H. El-Far. 2021. « Quercetin Attenuates Brain Oxidative Alterations Induced by Iron Oxide Nanoparticles in Rats ». *International Journal of Molecular Sciences* 22 (8) : 3829. <https://doi.org/10.3390/ijms22083829>.
- Dou, Wei, Jingjing Zhang, Hao Li, Sandhya Kortagere, Katherine Sun, Lili Ding, Gaiyan Ren, Zhengtao Wang, et Sridhar Mani. 2014. « Plant flavonol isorhamnetin attenuates chemically induced inflammatory bowel disease via a PXR-dependent pathway ». *The Journal of Nutritional Biochemistry* 25 (9) : 923-33. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2014.04.006>.
- Doyle, Sean E., Ryan M. O'Connell, Gustavo A. Miranda, Sagar A. Vaidya, Edward K. Chow, Philip T. Liu, Shinobu Suzuki, et al. 2004. « Toll-like receptors induce a phagocytic gene program through p38 ». *The Journal of Experimental Medicine* 199 (1) : 81-90. <https://doi.org/10.1084/jem.20031237>.
- Dröge, Wulf. 2002. « Free radicals in the physiological control of cell function ». *Physiological Reviews* 82 (1) : 47-95. <https://doi.org/10.1152/physrev.00018.2001>.
- Durafourt, Bryce A., Craig S. Moore, Domenick A. Zammit, Trina A. Johnson, Fatma Zaguia, Marie-Christine Guiot, Amit Bar-Or, et Jack P. Antel. 2012. « Comparison of polarization properties of human adult microglia and blood-derived macrophages ». *Glia* 60 (5) : 717-27. <https://doi.org/10.1002/glia.22298>.
- Duynhoven, John van, Elaine E. Vaughan, Doris M. Jacobs, Robèr A. Kemperman, Ewoud J. J. van Velzen, Gabriele Gross, Laure C. Roger, et al. 2011. « Metabolic fate of polyphenols in the human superorganism ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108 Suppl 1 (mars) : 4531-38. <https://doi.org/10.1073/pnas.1000098107>.
- Eaton, S., K. Bartlett, et M. Pourfarzam. 1996. « Mammalian mitochondrial beta-oxidation ». *The Biochemical Journal* 320 (Pt 2) (décembre) : 345-57. <https://doi.org/10.1042/bj3200345>.
- Egert, Sarah, Anja Bosity-Westphal, Jasmin Seiberl, Claudia Kürbitz, Uta Settler, Sandra Plachta-Danielzik, Anika E. Wagner, et al. 2009. « Quercetin reduces systolic blood pressure and plasma oxidised low-density lipoprotein concentrations in overweight subjects with a high-cardiovascular disease risk phenotype: a double-blinded, placebo-controlled cross-over study ». *The British Journal of Nutrition* 102 (7) : 1065-74. <https://doi.org/10.1017/S0007114509359127>.
- El Hajj, H. I., A. Vluggens, P. Andreoletti, K. Ragot, S. Mandard, S. Kersten, H. R. Waterham, et al. 2012. « The inflammatory response in acyl-CoA oxidase 1 deficiency (pseudoneonatal adrenoleukodystrophy) ». *Endocrinology* 153 (6) : 2568-75. <https://doi.org/10.1210/en.2012-1137>.
- El Kamouni, Soufiane, Riad El Kebbaj, Pierre Andreoletti, Abderrahim El Ktaibi, Issam Rharrassi, Abdelkhalid Essamadi, M'Hammed Saïd El Kebbaj, et al. 2017. « Protective effect of argan and olive oils against Ips-induced oxidative stress and inflammation in mice livers ». *International Journal of Molecular Sciences* 18 (10). <https://doi.org/10.3390/ijms18102181>.
- El Kebbaj, Riad, Pierre Andreoletti, Hammam I. El Hajj, Youssef El Kharrassi, Joseph Vamecq, Stéphane Mandard, Fatima Ezzahra Saih, et al. 2015. « Argan oil prevents down-regulation induced by endotoxin on liver fatty acid oxidation and gluconeogenesis and on peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator-1 α , (PGC-1 α), peroxisome proliferator-activated receptor

- α (PPAR α) and estrogen r ». *Biochimie Open* 1 : 51-59.
<https://doi.org/10.1016/j.biopen.2015.10.002>.
- El Kharrassi, Youssef, Nadia Maata, Mouaad Amine Mazri, Soufiane El Kamouni, Meryem Talbi, Riad El Kebbaj, Khadija Moustaid, et al. 2018. « Chemical and phytochemical characterizations of argan oil (*Argania spinosa* L. skeels), olive oil (*Olea europaea* L. cv. Moroccan picholine), cactus pear (*Opuntia megacantha* salm-dyck) seed oil and cactus cladode essential oil ». *Journal of Food Measurement and Characterization* 12 (2) : 747-54. <https://doi.org/10.1007/s11694-017-9688-x>.
- El Kharrassi, Youssef, Mohammad Samadi, Tatiana Lopez, Thomas Nury, Riad El Kebbaj, Pierre Andreoletti, Hammam I. El Hajj, et al. 2014a. « Biological activities of Schottenol and Spinasterol, two natural phytosterols present in argan oil and in cactus pear seed oil, on murine microglial BV2 cells ». *Biochemical and Biophysical Research Communications* 446 (3) : 798-804.
<https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2014.02.074>.
- . 2014b. « Biological activities of Schottenol and Spinasterol, two natural phytosterols present in argan oil and in cactus pear seed oil, on murine microglial BV2 cells ». *Biochemical and Biophysical Research Communications, Oxysterols*, 446 (3) : 798-804.
<https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2014.02.074>.
- El Kossori, R. L., C. Villaume, E. El Boustani, Y. Sauvaire, et L. Méjean. 1998. « Composition of pulp, skin and seeds of prickly pears fruit (*Opuntia ficus indica* sp.) ». *Plant Foods for Human Nutrition (Dordrecht, Netherlands)* 52 (3) : 263-70. <https://doi.org/10.1023/a:1008000232406>.
- El Mannoubi, I., S. Barrek, T. Skanji, H. Casabianca, et H. Zarrouk. 2009. « Characterization of *Opuntia ficus indica* seed oil from Tunisia ». *Chemistry of Natural Compounds* 45 (5) : 616.
<https://doi.org/10.1007/s10600-009-9448-1>.
- El-Beltagi, Hossam. 2019. « PHYTOCHEMICAL SCREENING, ANTIMICROBIAL, ANTIOXIDANT, ANTICANCER ACTIVITIES AND NUTRITIONAL VALUES OF CACTUS (*OPUNTIA FICUS INDICIA*) PULP AND PEEL ». *Fresenius Environmental Bulletin* 28 (2A) : 1534-51.
- El-Hawary, Seham S., Mansour Sobeh, Wafaa K. Badr, Mohamed A. O. Abdelfattah, Zeinab Y. Ali, Mona E. El-Tantawy, Mohamed A. Rabeh, et Michael Wink. 2020. « HPLC-PDA-MS/MS profiling of secondary metabolites from *Opuntia ficus-indica* cladode, peel and fruit pulp extracts and their antioxidant, neuroprotective effect in rats with aluminum chloride induced neurotoxicity ». *Saudi Journal of Biological Sciences* 27 (10) : 2829-38.
<https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2020.07.003>.
- El-Mostafa, Karym, Youssef El Kharrassi, Asmaa Badreddine, Pierre Andreoletti, Joseph Vamecq, M'Hammed Saïd El Kebbaj, Norbert Latruffe, Gérard Lizard, Boubker Nasser, et Mustapha Cherkaoui-Malki. 2014. « Nopal cactus (*Opuntia ficus-indica*) as a source of bioactive compounds for nutrition, health and disease ». *Molecules (Basel, Switzerland)* 19 (9) : 14879-901.
<https://doi.org/10.3390/molecules190914879>.
- El-Said, Nesreen M., A. Nagib, Z. Rahman, et S. Deraz. 2010. « Prickly Pear [*Opuntia ficus-indica* (L .) Mill] Peels : Chemical Composition , Nutritional Value and Protective Effects on Liver and Kidney Functions and Cholesterol in Rats ». 2010. [https://www.semanticscholar.org/paper/Prickly-Pear-%5B-Opuntia-ficus-indica-\(-L.-\)-Mill-%5D-El-Said-Nagib/73b02f9675cecd69ec4cd3c5cbddf87b657e57a7](https://www.semanticscholar.org/paper/Prickly-Pear-%5B-Opuntia-ficus-indica-(-L.-)-Mill-%5D-El-Said-Nagib/73b02f9675cecd69ec4cd3c5cbddf87b657e57a7).
- El-Samahy, S., Khaled M. Youssef, et Tamer Moussa Ayoub. 2009. « Producing ice cream with concentrated cactus pear pulp: A preliminary study ». *Journal of the Professional Association for Cactus Development* 11 (janvier).
- « Encyclopedia of Dietary Supplements 2nd edition.pdf ». s. d. Pdfcoffee.com. Consulté le 16 août 2022.
<https://pdfcoffee.com/encyclopedia-of-dietary-supplements-2nd-editionpdf-5-pdf-free.html>.

- Ennouri, Monia, Bourret Evelyne, Mondolot Laurence, et Attia Hamadi. 2005. « Fatty acid composition and rheological behaviour of prickly pear seed oils ». *Food Chemistry* 93 (3) : 431-37. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2004.10.020>.
- Ennouri, Monia, Hamadi Fetoui, Evelyne Bourret, Najiba Zeghal, et Hamadi Attia. 2006a. « Evaluation of some biological parameters of *Opuntia ficus indica*. 1. Influence of a seed oil supplemented diet on rats ». *Bioresource Technology* 97 (12) : 1382-86. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2005.07.010>.
- . 2006b. « Evaluation of some biological parameters of *Opuntia ficus indica*. 1. Influence of a seed oil supplemented diet on rats ». *Bioresource Technology* 97 (12) : 1382-86. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2005.07.010>.
- Eskelinen, Eeva-Liisa. 2006. « Roles of LAMP-1 and LAMP-2 in lysosome biogenesis and autophagy ». *Molecular Aspects of Medicine* 27 (5-6) : 495-502. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2006.08.005>.
- Fan, C. Y., J. Pan, R. Chu, D. Lee, K. D. Kluckman, N. Usuda, I. Singh, et al. 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) : 24698-710. <https://doi.org/10.1074/jbc.271.40.24698>.
- Fan, C. Y., J. Pan, N. Usuda, A. V. Yeldandi, M. S. Rao, et J. K. Reddy. 1998. « Steatohepatitis, spontaneous peroxisome proliferation and liver tumors in mice lacking peroxisomal fatty acyl-CoA oxidase. Implications for peroxisome proliferator-activated receptor alpha natural ligand metabolism ». *The Journal of Biological Chemistry* 273 (25) : 15639-45. <https://doi.org/10.1074/jbc.273.25.15639>.
- Fang, Wen-Feng, Jae Hwa Cho, Qianbin He, Meng-Chih Lin, Chao-Chien Wu, Norbert F. Voelkel, et Ivor S. Douglas. 2007. « Lipid A fraction of LPS induces a discrete MAPK activation in acute lung injury ». *American Journal of Physiology. Lung Cellular and Molecular Physiology* 293 (2) : L336-344. <https://doi.org/10.1152/ajplung.00011.2007>.
- Farag, Mohamed A., Ibrahim E. Sallam, Mostafa I. Fekry, Soumaya S. Zaghloul, et Riham S. El-Dine. 2020. « Metabolite profiling of three *Opuntia ficus-indica* fruit cultivars using UPLC-QTOF-MS in relation to their antioxidant potential ». *Food Bioscience* 36 (août) : 100673. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2020.100673>.
- Farghali, H., J. Hodis, N. Kutinová-Canová, P. Potmesil, E. Kmoníčková, et Z. Zídek. 2008. « Glucose release as a response to glucagon in rat hepatocyte culture: involvement of NO signaling ». *Physiological Research* 57 (4) : 569-75. <https://doi.org/10.33549/physiolres.931232>.
- Farzaei, Mohammad Hosein, Zahra Shahpiri, Mohammad Reza Mehri, Roodabeh Bahramsoltani, Mahdi Rezaei, Azade Raesdana, et Roja Rahimi. 2018. « Medicinal Plants in Neurodegenerative Diseases: Perspective of Traditional Persian Medicine ». *Current Drug Metabolism* 19 (5) : 429-42. <https://doi.org/10.2174/1389200219666180305150256>.
- Ferdinandusse, Sacha, Simone Denis, Eveline M. Hogenhout, Janet Koster, Carlo W. T. van Roermund, Lodewijk IJlst, Ann B. Moser, Ronald J. A. Wanders, et Hans R. Waterham. 2007. « Clinical, biochemical, and mutational spectrum of peroxisomal acyl-coenzyme A oxidase deficiency ». *Human Mutation* 28 (9) : 904-12. <https://doi.org/10.1002/humu.20535>.
- Ferreira, Ana Elisa, Flavia Sisti, Fabiane Sônego, Suojuan Wang, Luciano Ribeiro Filgueiras, Stephanie Brandt, Ana Paula Moreira Serezani, et al. 2014. « PPAR- γ /IL-10 axis inhibits MyD88 expression and ameliorates murine polymicrobial sepsis ». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 192 (5) : 2357-65. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1302375>.
- Ferreira, Ana Rita, Mariana Marques, et Daniela Ribeiro. 2019. « Peroxisomes and Innate Immunity: Antiviral Response and Beyond ». *International Journal of Molecular Sciences* 20 (15) : E3795. <https://doi.org/10.3390/ijms20153795>.

- Ferri, Paola, Donato Angelino, Lorenzo Gennari, Serena Benedetti, Patrizia Ambrogini, Paolo Del Grande, et Paolino Ninfali. 2015. « Enhancement of flavonoid ability to cross the blood-brain barrier of rats by co-administration with α -tocopherol ». *Food & Function* 6 (2) : 394-400. <https://doi.org/10.1039/c4fo00817k>.
- Feugang, Jean Magloire, Patricia Konarski, Daming Zou, Florian Conrad Stintzing, et Changping Zou. 2006. « Nutritional and medicinal use of Cactus pear (*Opuntia* spp.) cladodes and fruits ». *Frontiers in Bioscience: A Journal and Virtual Library* 11 (septembre) : 2574-89. <https://doi.org/10.2741/1992>.
- Florentino, D. F., A. Zlotnik, T. R. Mosmann, M. Howard, et A. O'Garra. 1991. « IL-10 inhibits cytokine production by activated macrophages ». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 147 (11) : 3815-22.
- Forman, B. M., J. Chen, et R. M. Evans. 1997. « Hypolipidemic drugs, polyunsaturated fatty acids, and eicosanoids are ligands for peroxisome proliferator-activated receptors alpha and delta ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94 (9) : 4312-17. <https://doi.org/10.1073/pnas.94.9.4312>.
- Fortin, Carl F., Patrick P. McDonald, Tàmàs Fülöp, et Olivier Lesur. 2010. « Sepsis, leukocytes, and nitric oxide (NO): an intricate affair ». *Shock (Augusta, Ga.)* 33 (4) : 344-52. <https://doi.org/10.1097/SHK.0b013e3181c0f068>.
- Fournier, B., J. A. Smeitink, L. Dorland, R. Berger, J. M. Saudubray, et B. T. Poll-The. 1994. « Peroxisomal disorders: a review ». *Journal of Inherited Metabolic Disease* 17 (4) : 470-86. <https://doi.org/10.1007/BF00711362>.
- Fransen, Marc, et Celien Lismont. 2018. « Peroxisomes and Cellular Oxidant/Antioxidant Balance: Protein Redox Modifications and Impact on Inter-organelle Communication ». *Sub-Cellular Biochemistry* 89 : 435-61. https://doi.org/10.1007/978-981-13-2233-4_19.
- Fransen, Marc, Marcus Nordgren, Bo Wang, et Oksana Apanasets. 2012. « Role of peroxisomes in ROS/RNS-metabolism: implications for human disease ». *Biochimica Et Biophysica Acta* 1822 (9) : 1363-73. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2011.12.001>.
- Friedman, Mendel, Philip R. Henika, et Robert E. Mandrell. 2003. « Antibacterial activities of phenolic benzaldehydes and benzoic acids against *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, and *Salmonella enterica* ». *Journal of Food Protection* 66 (10) : 1811-21. <https://doi.org/10.4315/0362-028x-66.10.1811>.
- Fu, Ruying, Qingyu Shen, Pengfei Xu, Jin Jun Luo, et Yamei Tang. 2014. « Phagocytosis of microglia in the central nervous system diseases ». *Molecular Neurobiology* 49 (3) : 1422-34. <https://doi.org/10.1007/s12035-013-8620-6>.
- Fujiki, Y, S Fowler, H Shio, AL Hubbard, et Paul Lazarow. 1982. « Polypeptide and phospholipid composition of the membrane of rat liver peroxisomes: comparison with endoplasmic reticulum and mitochondrial membranes ». *The Journal of cell biology* 93 (mai) : 103-10.
- Fujiki, Yukio. 2016. « Peroxisome biogenesis and human peroxisome-deficiency disorders ». *Proceedings of the Japan Academy. Series B, Physical and Biological Sciences* 92 (10) : 463-77. <https://doi.org/10.2183/pjab.92.463>.
- Fulda, Simone, Adrienne M. Gorman, Osamu Hori, et Afshin Samali. 2010. « Cellular Stress Responses: Cell Survival and Cell Death ». *International Journal of Cell Biology* 2010 : 214074. <https://doi.org/10.1155/2010/214074>.
- Gabay, C., et I. Kushner. 1999. « Acute-phase proteins and other systemic responses to inflammation ». *The New England Journal of Medicine* 340 (6) : 448-54. <https://doi.org/10.1056/NEJM199902113400607>.
- Gaikwad, Sadanand, Sergey Larionov, Yiner Wang, Holger Dannenberg, Takashi Matozaki, Alon Monsonego, Dietmar R. Thal, et Harald Neumann. 2009. « Signal regulatory protein-beta1: a

- microglial modulator of phagocytosis in Alzheimer's disease ». *The American Journal of Pathology* 175 (6) : 2528-39. <https://doi.org/10.2353/ajpath.2009.090147>.
- Galati, E. M., M. R. Mondello, E. R. Lauriano, M. F. Taviano, M. Galluzzo, et N. Miceli. 2005. « Opuntia ficus indica (L.) Mill. fruit juice protects liver from carbon tetrachloride-induced injury ». *Phytotherapy research: PTR* 19 (9) : 796-800. <https://doi.org/10.1002/ptr.1741>.
- Galati, Enza Maria, Maria Rita Mondello, Daniele Giuffrida, Giacomo Dugo, Natalizia Miceli, Simona Pergolizzi, et Maria Fernanda Taviano. 2003a. « Chemical characterization and biological effects of Sicilian Opuntia ficus indica (L.) mill. Fruit juice: antioxidant and antiulcerogenic activity ». *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51 (17) : 4903-8. <https://doi.org/10.1021/jf030123d>.
- . 2003b. « Chemical characterization and biological effects of Sicilian Opuntia ficus indica (L.) mill. Fruit juice: antioxidant and antiulcerogenic activity ». *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51 (17) : 4903-8. <https://doi.org/10.1021/jf030123d>.
- Gambino, Giuditta, Mario Allegra, Pierangelo Sardo, Alessandro Attanzio, Luisa Tesoriere, Maria A. Livrea, Giuseppe Ferraro, et Fabio Carletti. 2018. « Brain Distribution and Modulation of Neuronal Excitability by Indicaxanthin From Opuntia Ficus Indica Administered at Nutritionally-Relevant Amounts ». *Frontiers in Aging Neuroscience* 10 : 133. <https://doi.org/10.3389/fnagi.2018.00133>.
- Gao, Hong, Yi-Na Huang, Bo Gao, Peng Li, Chika Inagaki, et Jun Kawabata. 2008. « Inhibitory effect on α -glucosidase by Adhatoda vasica Nees ». *Food Chemistry* 108 (3) : 965-72. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.12.002>.
- Garcia-Bonilla, Lidia, Jamie M. Moore, Gianfranco Racchumi, Ping Zhou, Jason M. Butler, Costantino Iadecola, et Josef Anrather. 2014. « Inducible nitric oxide synthase in neutrophils and endothelium contributes to ischemic brain injury in mice ». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 193 (5) : 2531-37. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1400918>.
- Ge, Yun, Man Huang, et Yong-Ming Yao. 2018. « Autophagy and proinflammatory cytokines: Interactions and clinical implications ». *Cytokine & Growth Factor Reviews* 43 (octobre) : 38-46. <https://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2018.07.001>.
- Gehrmann, J., Y. Matsumoto, et G. W. Kreutzberg. 1995. « Microglia: intrinsic immune effector cell of the brain ». *Brain Research. Brain Research Reviews* 20 (3) : 269-87. [https://doi.org/10.1016/0165-0173\(94\)00015-h](https://doi.org/10.1016/0165-0173(94)00015-h).
- Genestra, Marcelo. 2007. « Oxy radicals, redox-sensitive signalling cascades and antioxidants ». *Cellular Signalling* 19 (9) : 1807-19. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2007.04.009>.
- Genin, Emmanuelle C., Flore Geillon, Catherine Gondcaille, Anne Athias, Philippe Gambert, Doriane Trompier, et Stéphane Savary. 2011. « Substrate specificity overlap and interaction between adrenoleukodystrophy protein (ALDP/ABCD1) and adrenoleukodystrophy-related protein (ALDRP/ABCD2) ». *The Journal of Biological Chemistry* 286 (10) : 8075-84. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.211912>.
- Gentile, C, L Tesoriere, M Allegra, M A Livrea, et P D'alessio. 2004. « Antioxidant Betalains from Cactus Pear (Opuntia ficus-indica) Inhibit Endothelial ICAM-1 Expression ». *Annals of the New York Academy of Sciences* 1028 (1) : 481-86. <https://doi.org/10.1196/annals.1322.057>.
- Germolec, Dori R., Kelly A. Shipkowski, Rachel P. Frawley, et Ellen Evans. 2018. « Markers of Inflammation ». *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)* 1803 : 57-79. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8549-4_5.
- « Gesammelte Abhandlungen zur Wissenschaftlichen Medicin / von Rudolf Virchow. » s. d. Wellcome Collection. Consulté le 7 novembre 2022. <https://wellcomecollection.org/works/m3tp5x6w>.
- Gevrenova, Reneta, Magdalena Kondeva-Burdina, Nikolay Denkov, et Dimitrina Zheleva-Dimitrova. 2015. « Flavonoid profiles of three Bupleurum species and in vitro hepatoprotective activity

- Bupleurum flavum Forsk ». *Pharmacognosy Magazine* 11 (41) : 14-23.
<https://doi.org/10.4103/0973-1296.149680>.
- Gharby, Said, Harish Karthikeyan Ravi, Dominique Guillaume, Maryline Abert Vian, Farid Chemat, et Zoubida Charrouf. 2020. « 2-methyloxolane as alternative solvent for lipid extraction and its effect on the cactus (*Opuntia ficus-indica* L.) seed oil fractions ». *OCL* 27 : 27.
<https://doi.org/10.1051/ocl/2020021>.
- Ghazi, Z, M Ramdani, M Tahri, R Rmili, H Elmsellem, B El Mahi, et M L Fauconnier. 2015. « Chemical Composition and Antioxidant Activity of seeds oils and fruit juice of *Opuntia Ficus Indica* and *Opuntia Dillenii* from Morocco », 8.
- Ghosh, Sudakshina, Allison J. Janocha, Mark A. Aronica, Shadi Swaidani, Suzy A. A. Comhair, Weiling Xu, Lemin Zheng, et al. 2006. « Nitrotyrosine proteome survey in asthma identifies oxidative mechanism of catalase inactivation ». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 176 (9) : 5587-97. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.176.9.5587>.
- Ghzaïel, Imen, Amira Zarrouk, Thomas Nury, Michela Libergoli, Francesca Florio, Souha Hammouda, Franck Ménétrier, et al. 2021. « Antioxidant Properties and Cytoprotective Effect of *Pistacia lentiscus* L. Seed Oil against 7 β -Hydroxycholesterol-Induced Toxicity in C2C12 Myoblasts: Reduction in Oxidative Stress, Mitochondrial and Peroxisomal Dysfunctions and Attenuation of Cell Death ». *Antioxidants (Basel, Switzerland)* 10 (11) : 1772.
<https://doi.org/10.3390/antiox10111772>.
- Gicquel, Thomas, Sacha Robert, Pascal Loyer, Tatiana Victoni, Aude Bodin, Catherine Ribault, Florence Gleonnec, Isabelle Couillin, Elisabeth Boichot, et Vincent Lagente. 2015. « IL-1 β production is dependent on the activation of purinergic receptors and NLRP3 pathway in human macrophages ». *FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 29 (10) : 4162-73. <https://doi.org/10.1096/fj.14-267393>.
- Gilbert, A., M. Jadot, E. Leontieva, S. Wattiaux-De Coninck, et R. Wattiaux. 1998. « Delta F508 CFTR localizes in the endoplasmic reticulum-Golgi intermediate compartment in cystic fibrosis cells ». *Experimental Cell Research* 242 (1) : 144-52. <https://doi.org/10.1006/excr.1998.4101>.
- Godat, Emmanuel, Virginie Hervé-Grvépinet, Florian Veillard, Fabien Lecaille, Maya Belghazi, Dieter Brömme, et Gilles Lalmanach. 2008. « Regulation of cathepsin K activity by hydrogen peroxide ». *Biological Chemistry* 389 (8) : 1123-26. <https://doi.org/10.1515/BC.2008.109>.
- Gong, Gang, Ying-Yun Guan, Zhong-Lin Zhang, Khalid Rahman, Su-Juan Wang, Shuang Zhou, Xin Luan, et Hong Zhang. 2020. « Isorhamnetin: A review of pharmacological effects ». *Biomedicine & Pharmacotherapy = Biomedecine & Pharmacotherapie* 128 (août) : 110301.
<https://doi.org/10.1016/j.biopha.2020.110301>.
- Gong, Xingrui, Yongmei Chen, Bao Fu, Jing Jiang, et Mazhong Zhang. 2017. « Infant nerve injury induces delayed microglial polarization to the M1 phenotype, and exercise reduces delayed neuropathic pain by modulating microglial activity ». *Neuroscience* 349 (mai) : 76-86.
<https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2017.02.051>.
- Gonzales, Amanda M., et Robert A. Orlando. 2008. « Curcumin and resveratrol inhibit nuclear factor-kappaB-mediated cytokine expression in adipocytes ». *Nutrition & Metabolism* 5 (juin) : 17.
<https://doi.org/10.1186/1743-7075-5-17>.
- González Barra, I., M. Escobar, et M. Villarroel Guerra. 1995. « [Influence of intake of vegetable oils on the in vitro intestinal absorption of glucose in golden hamsters] ». *Archivos Latinoamericanos De Nutricion* 45 (4) : 290-94.
- Gorrini, Chiara, Isaac S. Harris, et Tak W. Mak. 2013. « Modulation of oxidative stress as an anticancer strategy ». *Nature Reviews. Drug Discovery* 12 (12) : 931-47. <https://doi.org/10.1038/nrd4002>.

- Gottlieb, Roberta A., et Robert M. Mentzer. 2010. « Autophagy during cardiac stress: joys and frustrations of autophagy ». *Annual Review of Physiology* 72 : 45-59. <https://doi.org/10.1146/annurev-physiol-021909-135757>.
- Graf, E. 1992. « Antioxidant potential of ferulic acid ». *Free Radical Biology & Medicine* 13 (4) : 435-48. [https://doi.org/10.1016/0891-5849\(92\)90184-i](https://doi.org/10.1016/0891-5849(92)90184-i).
- Graham, J. M. 2001a. « Isolation of lysosomes from tissues and cells by differential and density gradient centrifugation ». *Current Protocols in Cell Biology* Chapter 3 (mai) : Unit 3.6. <https://doi.org/10.1002/0471143030.cb0306s07>.
- . 2001b. « Isolation of peroxisomes from tissues and cells by differential and density gradient centrifugation ». *Current Protocols in Cell Biology* Chapter 3 (mai) : Unit 3.5. <https://doi.org/10.1002/0471143030.cb0305s06>.
- Green, S. A., K. P. Zimmer, G. Griffiths, et I. Mellman. 1987. « Kinetics of intracellular transport and sorting of lysosomal membrane and plasma membrane proteins ». *The Journal of Cell Biology* 105 (3) : 1227-40. <https://doi.org/10.1083/jcb.105.3.1227>.
- Grum, D. E., L. R. Hansen, et J. K. Drackley. 1994. « Peroxisomal beta-oxidation of fatty acids in bovine and rat liver ». *Comparative Biochemistry and Physiology. Part B, Biochemistry & Molecular Biology* 109 (2-3) : 281-92. [https://doi.org/10.1016/0305-0491\(94\)90012-4](https://doi.org/10.1016/0305-0491(94)90012-4).
- Guevara-Figueroa, Teresita, Hugo Jiménez-Islas, María L. Reyes-Escogido, Anne G. Mortensen, Bente B. Laursen, Li-Wei Lin, Antonio De León-Rodríguez, Inge S. Fomsgaard, et Ana P. Barba de la Rosa. 2010. « Proximate composition, phenolic acids, and flavonoids characterization of commercial and wild nopal (*Opuntia* spp.) ». *Journal of Food Composition and Analysis, Horticulture, Biodiversity and Nutrition*, 23 (6) : 525-32. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2009.12.003>.
- Guzmán-Gómez, Oscar, Rosa Virginia García-Rodríguez, Lucía Quevedo-Corona, Ricardo Pérez-Pastén-Borja, Nora Lilia Rivero-Ramírez, Emmanuel Ríos-Castro, Salud Pérez-Gutiérrez, Julia Pérez-Ramos, et Germán Alberto Chamorro-Cevallos. 2018. « Amelioration of Ethanol-Induced Gastric Ulcers in Rats Pretreated with Phycobiliproteins of *Arthrospira* (*Spirulina*) *Maxima* ». *Nutrients* 10 (6) : E763. <https://doi.org/10.3390/nu10060763>.
- Ha, Soon-Duck, Andrew Martins, Khashayarsha Khazaie, Jiahuai Han, Bosco M. C. Chan, et Sung Ouk Kim. 2008. « Cathepsin B is involved in the trafficking of TNF-alpha-containing vesicles to the plasma membrane in macrophages ». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 181 (1) : 690-97. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.181.1.690>.
- Haga, Akira, Eri Takahashi, Yasuya Inomata, Koichi Kawahara, et Hidenobu Tanihara. 2016. « Differentiated Expression Patterns and Phagocytic Activities of Type 1 and 2 Microglia ». *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 57 (6) : 2814-23. <https://doi.org/10.1167/iovs.15-18509>.
- Halliwell, B. 2007. « Biochemistry of oxidative stress ». *Biochemical Society Transactions* 35 (Pt 5) : 1147-50. <https://doi.org/10.1042/BST0351147>.
- Hamer, Isabelle, Edouard Delaive, Marc Dieu, Fadi Abdel-Sater, Ludovic Mercy, Michel Jadot, et Thierry Arnould. 2009. « Up-regulation of cathepsin B expression and enhanced secretion in mitochondrial DNA-depleted osteosarcoma cells ». *Biology of the Cell* 101 (1) : 31-41. <https://doi.org/10.1042/BC20080043>.
- Hamer, Isabelle, et Michel Jadot. 2005. « Endolysosomal transport of newly-synthesized cathepsin D in a sucrose model of lysosomal storage ». *Experimental Cell Research* 309 (2) : 284-95. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2005.06.006>.
- Hanhineva, Kati, Riitta Törrönen, Isabel Bondia-Pons, Jenna Pekkinen, Marjukka Kolehmainen, Hannu Mykkänen, et Kaisa Poutanen. 2010. « Impact of dietary polyphenols on carbohydrate metabolism ». *International Journal of Molecular Sciences* 11 (4) : 1365-1402. <https://doi.org/10.3390/ijms11041365>.

- Harauz, George, Noboru Ishiyama, Christopher M. D. Hill, Ian R. Bates, David S. Libich, et Christophe Farès. 2004. « Myelin basic protein-diverse conformational states of an intrinsically unstructured protein and its roles in myelin assembly and multiple sclerosis ». *Micron (Oxford, England: 1993)* 35 (7) : 503-42. <https://doi.org/10.1016/j.micron.2004.04.005>.
- Hashimoto, T. 2000. « Peroxisomal beta-oxidation enzymes ». *Cell Biochemistry and Biophysics* 32 Spring : 63-72. <https://doi.org/10.1385/cbb:32:1-3:63>.
- He, Anyuan, John M. Dean, et Irfan J. Lodhi. 2021. « Peroxisomes as cellular adaptors to metabolic and environmental stress ». *Trends in Cell Biology* 31 (8) : 656-70. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2021.02.005>.
- Hegwood, Donald A. 1990. « Human Health Discoveries with *Opuntia* sp. (Prickly Pear) ». *HortScience* 25 (12) : 1515-16. <https://doi.org/10.21273/HORTSCI.25.12.1515>.
- Heming, Michael, Sandra Gran, Saskia-L. Jauch, Lena Fischer-Riepe, Antonella Russo, Luisa Klotz, Sven Hermann, Michael Schäfers, Johannes Roth, et Katarzyna Barczyk-Kahlert. 2018. « Peroxisome Proliferator-Activated Receptor- γ Modulates the Response of Macrophages to Lipopolysaccharide and Glucocorticoids ». *Frontiers in Immunology* 9 : 893. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.00893>.
- Henn, Anja, Søren Lund, Maj Hedtjärn, André Schratzenholz, Peter Pörzgen, et Marcel Leist. 2009. « The suitability of BV2 cells as alternative model system for primary microglia cultures or for animal experiments examining brain inflammation ». *ALTEX* 26 (2) : 83-94. <https://doi.org/10.14573/altex.2009.2.83>.
- Henry, Christopher J., Yan Huang, Angela M. Wynne, et Jonathan P. Godbout. 2009. « Peripheral lipopolysaccharide (LPS) challenge promotes microglial hyperactivity in aged mice that is associated with exaggerated induction of both pro-inflammatory IL-1 β and anti-inflammatory IL-10 cytokines ». *Brain, Behavior, and Immunity* 23 (3) : 309-17. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2008.09.002>.
- Hentze, H., X. Y. Lin, M. S. K. Choi, et A. G. Porter. 2003. « Critical role for cathepsin B in mediating caspase-1-dependent interleukin-18 maturation and caspase-1-independent necrosis triggered by the microbial toxin nigericin ». *Cell Death and Differentiation* 10 (9) : 956-68. <https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4401264>.
- Hernández-Urbiola, M. I., M. Contreras-Padilla, E. Pérez-Torrero, G. Hernández-Quevedo, J. I. Rojas-Molina, M. E. Cortes, et M. E. Rodríguez-García. 2010. « Study of Nutritional Composition of Nopal (*Opuntia ficus indica* cv. Redonda) at Different Maturity Stages ». *The Open Nutrition Journal* 4 (1). <https://benthamopen.com/ABSTRACT/TONUTRJ-4-11>.
- Hirano, T., T. Taga, N. Nakano, K. Yasukawa, S. Kashiwamura, K. Shimizu, K. Nakajima, K. H. Pyun, et T. Kishimoto. 1985. « Purification to homogeneity and characterization of human B-cell differentiation factor (BCDF or BSFp-2) ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 82 (16) : 5490-94. <https://doi.org/10.1073/pnas.82.16.5490>.
- Hoeffel, Guillaume, et Florent Ginhoux. 2015. « Ontogeny of Tissue-Resident Macrophages ». *Frontiers in Immunology* 6 : 486. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2015.00486>.
- Hollman, P. C., M. N. Bijlsman, Y. van Gameren, E. P. Cnossen, J. H. de Vries, et M. B. Katan. 1999. « The sugar moiety is a major determinant of the absorption of dietary flavonoid glycosides in man ». *Free Radical Research* 31 (6) : 569-73. <https://doi.org/10.1080/10715769900301141>.
- Hotchkiss, Richard S., Lyle L. Moldawer, Steven M. Opal, Konrad Reinhart, Isaiah R. Turnbull, et Jean-Louis Vincent. 2016. « Sepsis and septic shock ». *Nature Reviews. Disease Primers* 2 (juin) : 16045. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2016.45>.
- Howard, M., J. Farrar, M. Hilfiker, B. Johnson, K. Takatsu, T. Hamaoka, et W. E. Paul. 1982. « Identification of a T cell-derived B cell growth factor distinct from interleukin 2 ». *The Journal of Experimental Medicine* 155 (3) : 914-23. <https://doi.org/10.1084/jem.155.3.914>.

- « [Http://www.tilo-botanica.eu/espece-n-q/opuntia-ficus-indica.html](http://www.tilo-botanica.eu/espece-n-q/opuntia-ficus-indica.html) ». s. d. Consulté le 3 août 2022.
<http://www.tilo-botanica.eu/espece-n-q/opuntia-ficus-indica.html>.
- Huang, Chia-Hsin, Mei-Fen Chen, Hsien-Hui Chung, et Juei-Tang Cheng. 2012. « Antihyperglycemic effect of syringaldehyde in streptozotocin-induced diabetic rats ». *Journal of Natural Products* 75 (8) : 1465-68. <https://doi.org/10.1021/np3003723>.
- Huang, Jiansheng, Navin Viswakarma, Songtao Yu, Yuzhi Jia, Liang Bai, Aurore Vluggens, Mustapha Cherkaoui-Malki, et al. 2011. « Progressive endoplasmic reticulum stress contributes to hepatocarcinogenesis in fatty acyl-CoA oxidase 1-deficient mice ». *The American Journal of Pathology* 179 (2) : 703-13. <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2011.04.030>.
- Huang, Ren-Yeong, Yen-Ling Yu, Wan-Chien Cheng, Chun-Nan OuYang, Earl Fu, et Ching-Liang Chu. 2010. « Immunosuppressive effect of quercetin on dendritic cell activation and function ». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 184 (12) : 6815-21. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0903991>.
- Huang, Wendy, et Christopher K. Glass. 2010. « Nuclear receptors and inflammation control: molecular mechanisms and pathophysiological relevance ». *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 30 (8) : 1542-49. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.109.191189>.
- Huang, Xianju, Qin Li, Yingpei Zhang, Qing Lü, Lianjun Guo, Lin Huang, et Zhi He. 2008. « Neuroprotective effects of cactus polysaccharide on oxygen and glucose deprivation induced damage in rat brain slices ». *Cellular and Molecular Neurobiology* 28 (4) : 559-68. <https://doi.org/10.1007/s10571-007-9184-7>.
- Hughes, Virginia. 2012. « Microglia: The constant gardeners ». *Nature* 485 (7400) : 570-72. <https://doi.org/10.1038/485570a>.
- « Human hg18 chr17:71449187-71487039 UCSC Genome Browser v435 ». s. d. Consulté le 22 août 2022.
http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgTracks?db=hg18&lastVirtModeType=default&lastVirtModeExtraState=&virtModeType=default&virtMode=0&nonVirtPosition=&position=chr17%3A71449187%2D71487039&hgsid=1431712405_1E1YZvBAKFG0AM9gb4jM2RdGVvBF.
- Hwang, Joon-Ho, et Sang-Bin Lim. 2017. « Immunostimulatory Activity of *Opuntia ficus-indica* var. Saboten Cladodes Fermented by *Lactobacillus plantarum* and *Bacillus subtilis* in RAW 264.7 Macrophages ». *Journal of Medicinal Food* 20 (2) : 131-39. <https://doi.org/10.1089/jmf.2016.3831>.
- Ibañez-Camacho, R., et R. Roman-Ramos. 1979. « Hypoglycemic effect of *Opuntia cactus* ». *Archivos De Investigacion Medica* 10 (4) : 223-30.
- Idriss, H. T., et J. H. Naismith. 2000. « TNF alpha and the TNF receptor superfamily: structure-function relationship(s) ». *Microscopy Research and Technique* 50 (3) : 184-95. [https://doi.org/10.1002/1097-0029\(20000801\)50:3<184::AID-JEMT2>3.0.CO;2-H](https://doi.org/10.1002/1097-0029(20000801)50:3<184::AID-JEMT2>3.0.CO;2-H).
- Ienco, Elena Caldarazzo, Annalisa LoGerfo, Cecilia Carlesi, Daniele Orsucci, Giulia Ricci, Michelangelo Mancuso, et Gabriele Siciliano. 2011. « Oxidative Stress Treatment for Clinical Trials in Neurodegenerative Diseases ». *Journal of Alzheimer's Disease* 24 (s2) : 111-26. <https://doi.org/10.3233/JAD-2011-110164>.
- Inglese, P., G. Barbera, et T. La Mantia. 1995. « Research strategies for the improvement of cactuspear (*Opuntia ficus-indica*) fruit quality and production ». *Journal of Arid Environments* 29 (4) : 455-68. [https://doi.org/10.1016/S0140-1963\(95\)80018-2](https://doi.org/10.1016/S0140-1963(95)80018-2).
- Inoue, Yasushi, Takeshi Otsuka, Hiroaki Niuro, Shuji Nagano, Yojirou Arinobu, Eiichi Ogami, Mitsuteru Akahoshi, et al. 2004. « Novel regulatory mechanisms of CD40-induced prostanoid synthesis by IL-4 and IL-10 in human monocytes ». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 172 (4) : 2147-54. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.172.4.2147>.

- Ishola, Ismail O., Mmesomachukwu O. Osele, Micah C. Chijioke, et Olufunmilayo O. Adeyemi. 2019. « Isorhamnetin enhanced cortico-hippocampal learning and memory capability in mice with scopolamine-induced amnesia: Role of antioxidant defense, cholinergic and BDNF signaling ». *Brain Research* 1712 (juin) : 188-96. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2019.02.017>.
- Ito, Umeo, Jun Nagasao, Emiko Kawakami, et Kiyomitsu Oyanagi. 2007. « Fate of disseminated dead neurons in the cortical ischemic penumbra: ultrastructure indicating a novel scavenger mechanism of microglia and astrocytes ». *Stroke* 38 (9) : 2577-83. <https://doi.org/10.1161/STROKEAHA.107.484394>.
- Jadot, M., C. Colmant, S. Wattiaux-De Coninck, et R. Wattiaux. 1984. « Intralysosomal hydrolysis of glycyl-L-phenylalanine 2-naphthylamide ». *The Biochemical Journal* 219 (3) : 965-70. <https://doi.org/10.1042/bj2190965>.
- Jadot, Michel, Marielle Boonen, Jaqueline Thirion, Nan Wang, Jinchuan Xing, Caifeng Zhao, Abia Tannous, et al. 2017. « Accounting for Protein Subcellular Localization: A Compartmental Map of the Rat Liver Proteome ». *Molecular & cellular proteomics: MCP* 16 (2) : 194-212. <https://doi.org/10.1074/mcp.M116.064527>.
- Jakobek, Lidija. 2015. « Interactions of polyphenols with carbohydrates, lipids and proteins ». *Food Chemistry* 175 (mai) : 556-67. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.12.013>.
- Jakubczyk, Karolina, Karolina Dec, Justyna Kałduńska, Dorota Kawczuga, Joanna Kochman, et Katarzyna Janda. 2020. « Reactive oxygen species - sources, functions, oxidative damage ». *Polski Merkurusz Lekarski: Organ Polskiego Towarzystwa Lekarskiego* 48 (284) : 124-27.
- Jaramillo, Sara, Sergio Lopez, Lourdes M. Varela, Rocio Rodriguez-Arcos, Ana Jimenez, Rocio Abia, Rafael Guillen, et Francisco J. G. Muriana. 2010. « The flavonol isorhamnetin exhibits cytotoxic effects on human colon cancer cells ». *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 58 (20) : 10869-75. <https://doi.org/10.1021/jf102669p>.
- Jaramillo-Flores, M. E., L. González-Cruz, M. Cornejo-Mazón, L. Dorantes-Alvarez, G. F. Gutiérrez-López, et H. Hernández-Sánchez. 2003. « Effect of Thermal Treatment on the Antioxidant Activity and Content of Carotenoids and Phenolic Compounds of Cactus Pear Cladodes (*Opuntia ficus-indica*) ». *Food science and technology international*. <http://dx.doi.org/10.1177/108201303036093>.
- Jenner, Peter. 2003. « Oxidative stress in Parkinson's disease ». *Annals of Neurology* 53 Suppl 3 : S26-36; discussion S36-38. <https://doi.org/10.1002/ana.10483>.
- Jensen, Anaïs G., Magali Chemali, Agnès Chapel, Sylvie Kieffer-Jaquinod, Michel Jadot, Jérôme Garin, et Agnès Journet. 2007. « Biochemical characterization and lysosomal localization of the mannose-6-phosphate protein p76 (hypothetical protein LOC196463) ». *The Biochemical Journal* 402 (3) : 449-58. <https://doi.org/10.1042/BJ20061205>.
- Jia, Qingling, Hui Cao, Dingzhu Shen, Shanshan Li, Li Yan, Chuan Chen, Sanli Xing, et Fangfang Dou. 2019. « Quercetin protects against atherosclerosis by regulating the expression of PCSK9, CD36, PPAR γ , LXR α and ABCA1 ». *International Journal of Molecular Medicine* 44 (3) : 893-902. <https://doi.org/10.3892/ijmm.2019.4263>.
- Jiayi, Cheng, Ning Tianyi, Teng Dan, Kang Tingguo, Wang Qingfeng, et Zhang Qianqian. 2019. « Isorhamnetin protects endothelial cells model CRL1730 from oxidative injury by hydrogen peroxide ». *Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences* 32 (1) : 131-36.
- Jnawali, Hum Nath, Dasom Jeon, Min-Cheol Jeong, Eunjung Lee, Bongwhan Jin, Sungweon Ryoo, Jungheon Yoo, et al. 2016. « Antituberculosis Activity of a Naturally Occurring Flavonoid, Isorhamnetin ». *Journal of Natural Products* 79 (4) : 961-69. <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.5b01033>.
- Johnson, Jeffrey A., Delinda A. Johnson, Andrew D. Kraft, Marcus J. Calkins, Rebekah J. Jakel, Marcelo R. Vargas, et Pei-Chun Chen. 2008. « The Nrf2-ARE pathway: an indicator and modulator of

- oxidative stress in neurodegeneration ». *Annals of the New York Academy of Sciences* 1147 (décembre) : 61-69. <https://doi.org/10.1196/annals.1427.036>.
- Jp, Luyendyk, Schabbauer Ga, Tencati M, Holscher T, Pawlinski R, et Mackman N. 2008. « Genetic analysis of the role of the PI3K-Akt pathway in lipopolysaccharide-induced cytokine and tissue factor gene expression in monocytes/macrophages ». *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 180 (6). <https://doi.org/10.4049/jimmunol.180.6.4218>.
- Jung, Hyun-Joo, Yun Seon Song, Chang-Jin Lim, et Eun-Hee Park. 2009. « Anti-inflammatory, anti-angiogenic and anti-nociceptive activities of an ethanol extract of *Salvia plebeia* R. Brown ». *Journal of Ethnopharmacology* 126 (2) : 355-60. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2009.08.031>.
- Kadda, Salma, Abdelmadjid Belabed, El Hassania Loukili, Belkheir Hammouti, et Soufiane Fadlaoui. 2022. « Temperature and extraction methods effects on yields, fatty acids, and tocopherols of prickly pear (*Opuntia ficus-indica* L.) seed oil of eastern region of Morocco ». *Environmental Science and Pollution Research International* 29 (1) : 158-66. <https://doi.org/10.1007/s11356-021-16752-8>.
- Kanaji, Nobuhiro, Amy Nelson, Xingqi Wang, Tadashi Sato, Masanori Nakanishi, Yoko Gunji, Hesham Basma, et al. 2013. « Differential roles of JNK, ERK1/2, and p38 mitogen-activated protein kinases on endothelial cell tissue repair functions in response to tumor necrosis factor- α ». *Journal of Vascular Research* 50 (2) : 145-56. <https://doi.org/10.1159/000345525>.
- Kanaji, Nobuhiro, Tadashi Sato, Amy Nelson, Xingqi Wang, Yingji Li, Miok Kim, Masanori Nakanishi, et al. 2011. « Inflammatory cytokines regulate endothelial cell survival and tissue repair functions via NF- κ B signaling ». *Journal of Inflammation Research* 4 : 127-38. <https://doi.org/10.2147/JIR.S19461>.
- Kang, Jung-Woo, Jun-Kyu Shin, Eun-Ji Koh, Hyojeong Ryu, Hyoung Ja Kim, et Sun-Mee Lee. 2016. « *Opuntia ficus-indica* seed attenuates hepatic steatosis and promotes M2 macrophage polarization in high-fat diet-fed mice ». *Nutrition Research (New York, N.Y.)* 36 (4) : 369-79. <https://doi.org/10.1016/j.nutres.2015.12.007>.
- Kanner, Joseph, Stela Harel, et Rina Granit. 2001. « Betalains A New Class of Dietary Cationized Antioxidants ». *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 49 (11) : 5178-85. <https://doi.org/10.1021/jf010456f>.
- Karabagias, Vassilios K., Ioannis K. Karabagias, Ilias Gatzias, et Anastasia V. Badeka. 2020. « Prickly Pear Seed Oil by Shelf-Grown Cactus Fruits: Waste or Maste? » *Processes* 8 (2) : 132. <https://doi.org/10.3390/pr8020132>.
- Kassmann, Celia M., Corinna Lappe-Siefke, Myriam Baes, Britta Brügger, Alexander Mildner, Hauke B. Werner, Oliver Natt, et al. 2007. « Axonal loss and neuroinflammation caused by peroxisome-deficient oligodendrocytes ». *Nature Genetics* 39 (8) : 969-76. <https://doi.org/10.1038/ng2070>.
- Katunuma, N. 1989. « Mechanisms and regulation of lysosomal proteolysis ». *Revisiones sobre biologia celular: RBC* 20 : 35-61.
- Kawai, Taro, et Shizuo Akira. 2010. « The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors ». *Nature Immunology* 11 (5) : 373-84. <https://doi.org/10.1038/ni.1863>.
- Keegan, Philip M., Suhaas Anbazhakan, Baolin Kang, Betty S. Pace, et Manu O. Platt. 2016. « Biomechanical and biochemical regulation of cathepsin K expression in endothelial cells converge at AP-1 and NF- κ B ». *Biological Chemistry* 397 (5) : 459-68. <https://doi.org/10.1515/hsz-2015-0244>.
- Keegan, Philip M., Catera L. Wilder, et Manu O. Platt. 2012. « Tumor necrosis factor alpha stimulates cathepsin K and V activity via juxtacrine monocyte-endothelial cell signaling and JNK activation ». *Molecular and Cellular Biochemistry* 367 (1-2) : 65-72. <https://doi.org/10.1007/s11010-012-1320-0>.

- Kemp, Stephan, et Ronald J. A. Wanders. 2007. « X-linked adrenoleukodystrophy: very long-chain fatty acid metabolism, ABC half-transporters and the complicated route to treatment ». *Molecular Genetics and Metabolism* 90 (3) : 268-76. <https://doi.org/10.1016/j.ymgme.2006.10.001>.
- Kerckaert, I., D. De Craemer, et G. Van Limbergen. 1995. « Practical guide for morphometry of human peroxisomes on electron micrographs ». *Journal of Inherited Metabolic Disease* 18 Suppl 1 : 172-80. <https://doi.org/10.1007/BF00711438>.
- Khaled, Souad, Farid Dahmoune, Khodir Madani, José Santiago Urieta, et Ana Maria Mainar. 2020. « Supercritical fractionation of antioxidants from algerian *Opuntia ficus-indica* (L.) Mill. seeds ». *Journal of Food Processing and Preservation* 44 (3) : e14343. <https://doi.org/10.1111/jfpp.14343>.
- Khan, M., M. Contreras, et I. Singh. 2000. « Endotoxin-induced alterations of lipid and fatty acid compositions in rat liver peroxisomes ». *Journal of Endotoxin Research* 6 (1) : 41-50. <https://doi.org/10.1177/09680519000060010601>.
- Khan, Mohammad Imtiyaj. 2016. « Stabilization of betalains: A review ». *Food Chemistry* 197 Pt B (avril) : 1280-85. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.11.043>.
- Khémiri, Ikram, et Lotfi Bitri. 2019. « Effectiveness of *Opuntia ficus indica* L. inermis Seed Oil in the Protection and the Healing of Experimentally Induced Gastric Mucosa Ulcer ». *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 2019 : 1568720. <https://doi.org/10.1155/2019/1568720>.
- Khémiri, Ikram, Badaia Essghaier Hédi, Najla Sadfi Zouaoui, Neyla Ben Gdara, et Lotfi Bitri. 2019. « The Antimicrobial and Wound Healing Potential of *Opuntia ficus indica* L. inermis Extracted Oil from Tunisia ». *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* 2019 (avril) : e9148782. <https://doi.org/10.1155/2019/9148782>.
- Kim, Jung Wha, Tae Bum Kim, Hyun Woo Kim, Sang Wook Park, Hong Pyo Kim, et Sang Hyun Sung. 2017. « Hepatoprotective Flavonoids in *Opuntia ficus-indica* Fruits by Reducing Oxidative Stress in Primary Rat Hepatocytes ». *Pharmacognosy Magazine* 13 (51) : 472-76. https://doi.org/10.4103/pm.pm_232_16.
- Kim, Jung-Hoon, Shin-Mi Park, Hyun-Joo Ha, Chang-Jong Moon, Tae-Kyun Shin, Jung-Mi Kim, Nam-Ho Lee, Hyoung-Chun Kim, Kyung-Jin Jang, et Myung-Bok Wie. 2006a. « *Opuntia ficus-indica* attenuates neuronal injury in in vitro and in vivo models of cerebral ischemia ». *Journal of Ethnopharmacology* 104 (1) : 257-62. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2005.09.017>.
- . 2006b. « *Opuntia ficus-indica* attenuates neuronal injury in in vitro and in vivo models of cerebral ischemia ». *Journal of Ethnopharmacology* 104 (1-2) : 257-62. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2005.09.017>.
- Kim, Junghyun, Ohn Soon Kim, Chan-Sik Kim, Nan Hee Kim, et Jin Sook Kim. 2010. « Cytotoxic role of methylglyoxal in rat retinal pericytes: Involvement of a nuclear factor-kappaB and inducible nitric oxide synthase pathway ». *Chemico-Biological Interactions* 188 (1) : 86-93. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2010.07.002>.
- Kim, Mi Eun, Ju Yong Na, Yong-Duk Park, et Jun Sik Lee. 2019. « Anti-Neuroinflammatory Effects of Vanillin Through the Regulation of Inflammatory Factors and NF-κB Signaling in LPS-Stimulated Microglia ». *Applied Biochemistry and Biotechnology* 187 (3) : 884-93. <https://doi.org/10.1007/s12010-018-2857-5>.
- Kim, Min, Seung-Cheol Jee, Kyeong-Seok Kim, Hyung-Sik Kim, Kyoung-Nae Yu, et Jung-Suk Sung. 2021. « Quercetin and Isorhamnetin Attenuate Benzo[a]pyrene-Induced Toxicity by Modulating Detoxification Enzymes through the AhR and NRF2 Signaling Pathways ». *Antioxidants (Basel, Switzerland)* 10 (5) : 787. <https://doi.org/10.3390/antiox10050787>.
- Kim, Min Sun, Trevor R. Sweeney, Judy K. Shigenaga, Lisa G. Chui, Arthur Moser, Carl Grunfeld, et Kenneth R. Feingold. 2007. « Tumor necrosis factor and interleukin 1 decrease RXRalpha, PPARalpha, PPARgamma, LXRAalpha, and the coactivators SRC-1, PGC-1alpha, and PGC-1beta in

- liver cells ». *Metabolism: Clinical and Experimental* 56 (2) : 267-79.
<https://doi.org/10.1016/j.metabol.2006.10.007>.
- Kim, N. Y., H. O. Pae, Y. S. Ko, J. C. Yoo, B. M. Choi, C. D. Jun, H. T. Chung, M. Inagaki, R. Higuchi, et Y. C. Kim. 1999. « In vitro inducible nitric oxide synthesis inhibitory active constituents from *Fraxinus rhynchophylla* ». *Planta Medica* 65 (7) : 656-58. <https://doi.org/10.1055/s-2006-960840>.
- Kim, Seung Hyun, Byung Ju Jeon, Dae Hyun Kim, Tae Il Kim, Hee Kyoung Lee, Dae Seob Han, Jong-Hwan Lee, Tae Bum Kim, Jung Wha Kim, et Sang Hyun Sung. 2012. « Prickly pear cactus (*Opuntia ficus indica* var. *saboten*) protects against stress-induced acute gastric lesions in rats ». *Journal of Medicinal Food* 15 (11) : 968-73. <https://doi.org/10.1089/jmf.2012.2282>.
- Kim, Shin Young, Cheng-Yun Jin, Cheol Hong Kim, Young Hyun Yoo, Sung Hyun Choi, Gi-Young Kim, Hyun Min Yoon, Hwan Tae Park, et Yung Hyun Choi. 2019. « Isorhamnetin alleviates lipopolysaccharide-induced inflammatory responses in BV2 microglia by inactivating NF- κ B, blocking the TLR4 pathway and reducing ROS generation ». *International Journal of Molecular Medicine* 43 (2) : 682-92. <https://doi.org/10.3892/ijmm.2018.3993>.
- Kim, Yoona, Jennifer B. Keogh, et Peter M. Clifton. 2016. « Polyphenols and Glycemic Control ». *Nutrients* 8 (1) : 17. <https://doi.org/10.3390/nu8010017>.
- Kim, Young Ho, Kwang-Hae Choi, Jong-Wook Park, et Taeg Kyu Kwon. 2005. « LY294002 inhibits LPS-induced NO production through a inhibition of NF- κ B activation: independent mechanism of phosphatidylinositol 3-kinase ». *Immunology Letters* 99 (1) : 45-50.
<https://doi.org/10.1016/j.imlet.2004.12.007>.
- Kk, Huynh, Eskelinen El, Scott Cc, Malevanets A, Saftig P, et Grinstein S. 2007. « LAMP proteins are required for fusion of lysosomes with phagosomes ». *The EMBO journal* 26 (2).
<https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7601511>.
- Klesney-Tait, Julia, Isaiah R. Turnbull, et Marco Colonna. 2006. « The TREM receptor family and signal integration ». *Nature Immunology* 7 (12) : 1266-73. <https://doi.org/10.1038/ni1411>.
- Koenigsknecht-Talboo, Jessica, et Gary E. Landreth. 2005. « Microglial phagocytosis induced by fibrillar beta-amyloid and IgGs are differentially regulated by proinflammatory cytokines ». *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 25 (36) : 8240-49.
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1808-05.2005>.
- Kolniak-Ostek, Joanna, Agnieszka Kita, Joanna Miedzianka, Lucia Andreu-Coll, Pilar Legua, et Francisca Hernandez. 2020. « Characterization of Bioactive Compounds of *Opuntia ficus-indica* (L.) Mill. Seeds from Spanish Cultivars ». *Molecules* 25 (23) : 5734.
<https://doi.org/10.3390/molecules25235734>.
- Kong, Chang-Suk, Jung-Ae Kim, Zhong-Ji Qian, You Ah Kim, Jung Im Lee, Se-Kwon Kim, Taek Jeong Nam, et Youngwan Seo. 2009. « Protective effect of isorhamnetin 3-O-beta-D-glucopyranoside from *Salicornia herbacea* against oxidation-induced cell damage ». *Food and Chemical Toxicology: An International Journal Published for the British Industrial Biological Research Association* 47 (8) : 1914-20. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2009.05.002>.
- Kong, Ling, et Bao-Xue Ge. 2008. « MyD88-independent activation of a novel actin-Cdc42/Rac pathway is required for Toll-like receptor-stimulated phagocytosis ». *Cell Research* 18 (7) : 745-55.
<https://doi.org/10.1038/cr.2008.65>.
- Koubaa, Mohamed, Houcine Mhemdi, Francisco J. Barba, Armel Angelotti, Fatma Bouaziz, Semia Ellouz Chaabouni, et Eugène Vorobiev. 2017. « Seed oil extraction from red prickly pear using hexane and supercritical CO₂ : assessment of phenolic compound composition, antioxidant and antibacterial activities ». *Journal of the Science of Food and Agriculture* 97 (2) : 613-20.
<https://doi.org/10.1002/jsfa.7774>.
- Kozłowska, Aleksandra, et Dorota Szostak-Wegierek. 2014. « Flavonoids--food sources and health benefits ». *Roczniki Panstwowego Zakladu Higieny* 65 (2) : 79-85.

- Kumar, Subramanian, Pichavaram Prahalathan, et Boobalan Raja. 2011. « Antihypertensive and antioxidant potential of vanillic acid, a phenolic compound in L-NAME-induced hypertensive rats: a dose-dependence study ». *Redox Report: Communications in Free Radical Research* 16 (5) : 208-15. <https://doi.org/10.1179/1351000211Y.0000000009>.
- Kuo, S. C., H. H. Chung, C. H. Huang, et J. T. Cheng. 2014. « Decrease of hyperglycemia by syringaldehyde in diabetic rats ». *Hormone and Metabolic Research = Hormon- Und Stoffwechselforschung = Hormones Et Metabolisme* 46 (1) : 8-13. <https://doi.org/10.1055/s-0033-1351274>.
- Kuti, Joseph O. 2004. « Antioxidant compounds from four Opuntia cactus pear fruit varieties ». *Food Chemistry* 85 (4) : 527-33. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(03\)00184-5](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(03)00184-5).
- Labuschagne, Maryke, et Arnold Hugo. 2010. « Oil content and fatty acid composition of cactus pear seed compared with cotton and grape seed ». *Journal of Food Biochemistry* 34 (janvier) : 93-100. <https://doi.org/10.1111/j.1745-4514.2009.00266.x>.
- Lacy-Hulbert, Adam, et Kathryn J. Moore. 2006. « Designer macrophages: oxidative metabolism fuels inflammation repair ». *Cell Metabolism* 4 (1) : 7-8. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2006.06.001>.
- Larocca, L. M., L. Teofili, N. Maggiano, M. Piantelli, F. O. Ranelletti, et G. Leone. 1996. « Quercetin and the growth of leukemic progenitors ». *Leukemia & Lymphoma* 23 (1-2) : 49-53. <https://doi.org/10.3109/10428199609054801>.
- Laughton, M. J., P. J. Evans, M. A. Moroney, J. R. Houlst, et B. Halliwell. 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) : 1673-81. [https://doi.org/10.1016/0006-2952\(91\)90501-u](https://doi.org/10.1016/0006-2952(91)90501-u).
- Lazarow, P. B., et C. De Duve. 1976. « A fatty acyl-CoA oxidizing system in rat liver peroxisomes; enhancement by clofibrate, a hypolipidemic drug ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 73 (6) : 2043-46. <https://doi.org/10.1073/pnas.73.6.2043>.
- Le Houerou, H. N. 1996. « The role of cacti (Opuntia spp.) in erosion control, land reclamation, rehabilitation and agricultural development in the Mediterranean Basin ». *Journal of Arid Environments (United Kingdom)*. https://scholar.google.com/scholar_lookup?title=The+role+of+cacti+%28Opuntia+spp.%29+in+erosion+control%2C+land+reclamation%2C+rehabilitation+and+agricultural+development+in+the+Mediterranean+Basin&author=Le+Houerou%2C+H.N.+%28327+rue+A.L.+De+Jussieu%2C+F-34090%2C+Montpellier+%28France%29%29&publication_year=1996.
- Lecocq, Michèle, Fanjam Andrianaivo, Marie-Thérèse Warnier, Simone Wattiaux-De Coninck, Robert Wattiaux, et Michel Jadot. 2003. « Uptake by mouse liver and intracellular fate of plasmid DNA after a rapid tail vein injection of a small or a large volume ». *The Journal of Gene Medicine* 5 (2) : 142-56. <https://doi.org/10.1002/jgm.328>.
- Lee, Choon Young, Ajit Sharma, Jae Eun Cheong, et Julie L. Nelson. 2009. « Synthesis and antioxidant properties of dendritic polyphenols ». *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 19 (22) : 6326-30. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2009.09.088>.
- Lee, Eun Ha, Hyoung Ja Kim, Yun Seon Song, Changbae Jin, Kyung-Tae Lee, Jungsook Cho, et Yong Sup Lee. 2003. « Constituents of the stems and fruits of Opuntia ficus-indica var. saboten ». *Archives of Pharmacal Research* 26 (12) : 1018-23. <https://doi.org/10.1007/BF02994752>.
- Lee, Hyunkyung, Min-Jung Pyo, Seong Kyeong Bae, Yunwi Heo, Choul Goo Kim, Changkeun Kang, et Euikyung Kim. 2015. « Improved Therapeutic Profiles of PLA2-Free Bee Venom Prepared by Ultrafiltration Method ». *Toxicological Research* 31 (1) : 33-40. <https://doi.org/10.5487/TR.2015.31.1.033>.
- Lee, Lung-Ta, Ying-Tang Huang, Jiuan-Jiuan Hwang, Ping-Ping H. Lee, Ferng-Chun Ke, Madhavan P. Nair, Chithan Kanadaswam, et Ming-Ting Lee. 2002. « Blockade of the epidermal growth factor

- receptor tyrosine kinase activity by quercetin and luteolin leads to growth inhibition and apoptosis of pancreatic tumor cells ». *Anticancer Research* 22 (3) : 1615-27.
- Lee, Ming Hong, Jae Yeon Kim, Jeong Hoon Yoon, Hyo Jin Lim, Tae Hee Kim, Changbae Jin, Wie-Jong Kwak, Chang-Kyun Han, et Jae-Ha Ryu. 2006. « Inhibition of nitric oxide synthase expression in activated microglia and peroxynitrite scavenging activity by *Opuntia ficus indica* var. *saboten* ». *Phytotherapy research: PTR* 20 (9) : 742-47. <https://doi.org/10.1002/ptr.1942>.
- Lee, Seung-Min, Jiyoung Moon, Yoonsu Cho, Ji Hyung Chung, et Min-Jeong Shin. 2013. « Quercetin up-regulates expressions of peroxisome proliferator-activated receptor γ , liver X receptor α , and ATP binding cassette transporter A1 genes and increases cholesterol efflux in human macrophage cell line ». *Nutrition Research (New York, N.Y.)* 33 (2) : 136-43. <https://doi.org/10.1016/j.nutres.2012.11.010>.
- Lehnardt, Seija, Christian Lachance, Silvia Patrizi, Sharon Lefebvre, Pamela L. Follett, Frances E. Jensen, Paul A. Rosenberg, Joseph J. Volpe, et Timothy Vartanian. 2002. « The toll-like receptor TLR4 is necessary for lipopolysaccharide-induced oligodendrocyte injury in the CNS ». *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 22 (7) : 2478-86. <https://doi.org/20026268>.
- Lei, Xin Gen, Jian-Hong Zhu, Wen-Hsing Cheng, Yongping Bao, Ye-Shih Ho, Amit R. Reddi, Arne Holmgren, et Elias S. J. Arnér. 2016. « Paradoxical Roles of Antioxidant Enzymes: Basic Mechanisms and Health Implications ». *Physiological Reviews* 96 (1) : 307-64. <https://doi.org/10.1152/physrev.00010.2014>.
- Li, Hongxia, Lin Xiao, Hui He, Hongmei Zeng, Jingjing Liu, Chunjie Jiang, Guibin Mei, et al. 2021. « Quercetin Attenuates Atherosclerotic Inflammation by Inhibiting Galectin-3-NLRP3 Signaling Pathway ». *Molecular Nutrition & Food Research* 65 (15) : e2000746. <https://doi.org/10.1002/mnfr.202000746>.
- Li, Jin, Ruishan Wu, Xiaoping Qin, Dongyang Liu, Fenjie Lin, et Qinglu Feng. 2017. « Isorhamnetin inhibits IL-1 β -induced expression of inflammatory mediators in human chondrocytes ». *Molecular Medicine Reports* 16 (4) : 4253-58. <https://doi.org/10.3892/mmr.2017.7041>.
- Li, Yang, Gefu Chi, Bingyu Shen, Ye Tian, et Haihua Feng. 2016. « Isorhamnetin ameliorates LPS-induced inflammatory response through downregulation of NF- κ B signaling ». *Inflammation* 39 (4) : 1291-1301. <https://doi.org/10.1007/s10753-016-0361-z>.
- Li, Yao, Jiaying Yao, Chunyan Han, Jiaxin Yang, Maria Tabassum Chaudhry, Shengnan Wang, Hongnan Liu, et Yulong Yin. 2016. « Quercetin, Inflammation and Immunity ». *Nutrients* 8 (3) : 167. <https://doi.org/10.3390/nu8030167>.
- Liang, Peizhou, et Weidong Le. 2015. « Role of autophagy in the pathogenesis of multiple sclerosis ». *Neuroscience Bulletin* 31 (4) : 435-44. <https://doi.org/10.1007/s12264-015-1545-5>.
- Lim, Kye-Taek. 2010. « Inhibitory effect of glycoprotein isolated from *Opuntia ficus-indica* var. *saboten* MAKINO on activities of allergy-mediators in compound 48/80-stimulated mast cells ». *Cellular Immunology* 264 (1) : 78-85. <https://doi.org/10.1016/j.cellimm.2010.05.001>.
- Lin, Guang, Pei-Tseng Lee, Kuchuan Chen, Dongxue Mao, Kai Li Tan, Zhongyuan Zuo, Wen-Wen Lin, Liping Wang, et Hugo J. Bellen. 2018. « Phospholipase PLA2G6, a Parkinsonism-Associated Gene, Affects Vps26 and Vps35, Retromer Function, and Ceramide Levels, Similar to α -Synuclein Gain ». *Cell Metabolism* 28 (4) : 605-618.e6. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2018.05.019>.
- Lin, Guang, Liping Wang, Paul C. Marcogliese, et Hugo J. Bellen. 2019. « Sphingolipids in the Pathogenesis of Parkinson's Disease and Parkinsonism ». *Trends in endocrinology and metabolism: TEM* 30 (2) : 106-17. <https://doi.org/10.1016/j.tem.2018.11.003>.
- Lin, Neng-Yu, Adrian Stefanica, et Jörg H. W. Distler. 2013. « Autophagy: a key pathway of TNF-induced inflammatory bone loss ». *Autophagy* 9 (8) : 1253-55. <https://doi.org/10.4161/auto.25467>.

- Lindberg, Raija L. P., Corline J. A. De Groot, Ulrich Certa, Rivka Ravid, Francine Hoffmann, Ludwig Kappos, et David Leppert. 2004. « Multiple sclerosis as a generalized CNS disease--comparative microarray analysis of normal appearing white matter and lesions in secondary progressive MS ». *Journal of Neuroimmunology* 152 (1-2) : 154-67. <https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2004.03.011>.
- Lismont, Celien, Iulia Revenco, et Marc Fransen. 2019. « Peroxisomal Hydrogen Peroxide Metabolism and Signaling in Health and Disease ». *International Journal of Molecular Sciences* 20 (15) : E3673. <https://doi.org/10.3390/ijms20153673>.
- Liu, J., et A. Mori. 1993. « Antioxidant and pro-oxidant activities of p-hydroxybenzyl alcohol and vanillin: effects on free radicals, brain peroxidation and degradation of benzoate, deoxyribose, amino acids and DNA ». *Neuropharmacology* 32 (7) : 659-69. [https://doi.org/10.1016/0028-3908\(93\)90079-i](https://doi.org/10.1016/0028-3908(93)90079-i).
- Liu, Ning, Jiao Feng, Xiya Lu, Zhilu Yao, Qing Liu, Yang Lv, Yuru Han, Jingfan Deng, et Yingqun Zhou. 2019. « Isorhamnetin Inhibits Liver Fibrosis by Reducing Autophagy and Inhibiting Extracellular Matrix Formation via the TGF- β 1/Smad3 and TGF- β 1/p38 MAPK Pathways ». *Mediators of Inflammation* 2019 : 6175091. <https://doi.org/10.1155/2019/6175091>.
- Liu, Qiang, Justin Trotter, Juan Zhang, Melinda M. Peters, Hua Cheng, Jianxin Bao, Xianlin Han, Edwin J. Weeber, et Guojun Bu. 2010. « Neuronal LRP1 knockout in adult mice leads to impaired brain lipid metabolism and progressive, age-dependent synapse loss and neurodegeneration ». *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 30 (50) : 17068-78. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4067-10.2010>.
- Liu, Qiang, et Juan Zhang. 2014. « Lipid metabolism in Alzheimer's disease ». *Neuroscience Bulletin* 30 (2) : 331-45. <https://doi.org/10.1007/s12264-013-1410-3>.
- Liu, Shu, Lei Tian, Guangrui Chai, Bo Wen, et Bingyuan Wang. 2018. « Targeting heme oxygenase-1 by quercetin ameliorates alcohol-induced acute liver injury via inhibiting NLRP3 inflammasome activation ». *Food & Function* 9 (8) : 4184-93. <https://doi.org/10.1039/c8fo00650d>.
- Liu, Wei, Yanyan Li, Liyan Bo, Congcong Li, et Faguang Jin. 2021. « Positive regulation of TFEB and mitophagy by PGC-1 α to alleviate LPS-induced acute lung injury in rats ». *Biochemical and Biophysical Research Communications* 577 (novembre) : 1-5. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2021.08.064>.
- López-Romero, Patricia, Edgar Pichardo-Ontiveros, Azalia Avila-Nava, Natalia Vázquez-Manjarrez, Armando R. Tovar, José Pedraza-Chaverri, et Nimbe Torres. 2014. « The Effect of Nopal (*Opuntia Ficus Indica*) on Postprandial Blood Glucose, Incretins, and Antioxidant Activity in Mexican Patients with Type 2 Diabetes after Consumption of Two Different Composition Breakfasts ». *Journal of the Academy of Nutrition and Dietetics* 114 (11) : 1811-18. <https://doi.org/10.1016/j.jand.2014.06.352>.
- LOUDYI (D), WALALI. 1997. « LE FIGUIER DE BARBARIE, ESPECE FRUITIERE D'INTERET SECONDAIRE CULTIVEE AU MAROC ». 1997. <https://plateforme-documentaire.ctifl.fr/Record.htm?idlist=1&record=19425101124912433839>.
- Lowry, Jessica R., et Andis Klegeris. 2018. « Emerging roles of microglial cathepsins in neurodegenerative disease ». *Brain Research Bulletin* 139 (mai) : 144-56. <https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2018.02.014>.
- Lu, Xiya, Tong Liu, Kan Chen, Yujing Xia, Weiqi Dai, Shizan Xu, Ling Xu, et al. 2018. « Isorhamnetin: A hepatoprotective flavonoid inhibits apoptosis and autophagy via P38/PPAR- α pathway in mice ». *Biomedicine & Pharmacotherapy = Biomedecine & Pharmacotherapie* 103 (juillet) : 800-811. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.04.016>.
- Lucin, Kurt M., et Tony Wyss-Coray. 2009. « Immune activation in brain aging and neurodegeneration: too much or too little? ». *Neuron* 64 (1) : 110-22. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2009.08.039>.

- Lv, Qianghua, Xiao Chu, Xinyu Yao, Kelong Ma, Yong Zhang, et Xuming Deng. 2019. « Inhibition of the type III secretion system by syringaldehyde protects mice from Salmonella enterica serovar Typhimurium ». *Journal of Cellular and Molecular Medicine* 23 (7) : 4679-88. <https://doi.org/10.1111/jcmm.14354>.
- Mabotja, Mologadi B., Sonja L. Venter, Christian P. Du Plooy, Tukayi Kudanga, et Stephen O. Amoo. 2021. « Phytochemical Content, Antioxidant, Alpha-Glucosidase Inhibitory and Antibacterial Activities of Spineless Cactus Pear Cultivars ». *Plants* 10 (7) : 1312. <https://doi.org/10.3390/plants10071312>.
- Madrigal-Santillán, Eduardo, Eduardo Madrigal-Bujaidar, Isela Álvarez-González, María Teresa Sumaya-Martínez, José Gutiérrez-Salinas, Mirandeli Bautista, Ángel Morales-González, Manuel García-Luna y González-Rubio, J. Leopoldo Aguilar-Faisal, et José A. Morales-González. 2014. « Review of natural products with hepatoprotective effects ». *World Journal of Gastroenterology* 20 (40) : 14787-804. <https://doi.org/10.3748/wjg.v20.i40.14787>.
- Majdalawieh, Amin, et Hyo-Sung Ro. 2010. « PPARgamma1 and LXRalpha face a new regulator of macrophage cholesterol homeostasis and inflammatory responsiveness, AEBP1 ». *Nuclear Receptor Signaling* 8 (avril) : e004. <https://doi.org/10.1621/nrs.08004>.
- Makni, Mohamed, Yassine Chtourou, Hamadi Fetoui, El Mouldi Garoui, Tahia Boudawara, et Najiba Zeghal. 2011. « Evaluation of the antioxidant, anti-inflammatory and hepatoprotective properties of vanillin in carbon tetrachloride-treated rats ». *European Journal of Pharmacology* 668 (1-2) : 133-39. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2011.07.001>.
- Malçok, Ümit A., Adem B. Aras, Müşerref H. Şehitoğlu, Tarık Akman, et Yasemin Yüksel. 2020. « Therapeutic effects of syringaldehyde on spinal cord ischemia in rabbits ». *Saudi Medical Journal* 41 (4) : 341-50. <https://doi.org/10.15537/smj.2020.4.24993>.
- Manjeet K, R., et B. Ghosh. 1999. « Quercetin inhibits LPS-induced nitric oxide and tumor necrosis factor-alpha production in murine macrophages ». *International Journal of Immunopharmacology* 21 (7) : 435-43. [https://doi.org/10.1016/s0192-0561\(99\)00024-7](https://doi.org/10.1016/s0192-0561(99)00024-7).
- Mannaerts, G. P., L. J. Debeer, J. Thomas, et P. J. De Schepper. 1979. « Mitochondrial and peroxisomal fatty acid oxidation in liver homogenates and isolated hepatocytes from control and clofibrate-treated rats ». *The Journal of Biological Chemistry* 254 (11) : 4585-95.
- Mannoubi, I., S. Barrek, T. Skanji, H. Casabianca, et H. Zarrouk. 2009. « Characterization of Opuntia ficus indica seed oil from Tunisia ». *Chemistry of Natural Compounds* 45 (5) : 616-20.
- Mantzaris, Konstantinos, Vasiliki Tsolaki, et Epaminondas Zakynthinos. 2017. « Role of Oxidative Stress and Mitochondrial Dysfunction in Sepsis and Potential Therapies ». *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 2017 : 5985209. <https://doi.org/10.1155/2017/5985209>.
- Maron, Barry J., William C. Roberts, Michael Arad, Tammy S. Haas, Paolo Spirito, Gregory B. Wright, Adrian K. Almquist, et al. 2009. « Clinical outcome and phenotypic expression in LAMP2 cardiomyopathy ». *JAMA* 301 (12) : 1253-59. <https://doi.org/10.1001/jama.2009.371>.
- Maruf, Abdullah Al, HoYin Lip, Horace Wong, et Peter J. O'Brien. 2015. « Protective effects of ferulic acid and related polyphenols against glyoxal- or methylglyoxal-induced cytotoxicity and oxidative stress in isolated rat hepatocytes ». *Chemico-Biological Interactions* 234 (juin) : 96-104. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2014.11.007>.
- Mashima, Ryuichi, Paul K. Witting, et Roland Stocker. 2001. « Oxidants and antioxidants in atherosclerosis ». *Current Opinion in Lipidology* 12 (4) : 411-18.
- Masocha, Willias. 2009. « Systemic lipopolysaccharide (LPS)-induced microglial activation results in different temporal reduction of CD200 and CD200 receptor gene expression in the brain ». *Journal of Neuroimmunology* 214 (1-2) : 78-82. <https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2009.06.022>.
- Matias, A., S. L. Nunes, J. Poejo, E. Mecha, A. T. Serra, Paulo J. Amorim Madeira, M. R. Bronze, et C. M. M. Duarte. 2014. « Antioxidant and anti-inflammatory activity of a flavonoid-rich concentrate

- recovered from *Opuntia ficus-indica* juice ». *Food & Function* 5 (12) : 3269-80.
<https://doi.org/10.1039/c4fo00071d>.
- Matthäus, Bertrand, et Mehmet Musa Özcan. 2011. « Habitat effects on yield, fatty acid composition and tocopherol contents of prickly pear (*Opuntia ficus-indica* L.) seed oils ». *Scientia Horticulturae Complete* (131) : 95-98. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2011.09.027>.
- McCarthy, Ryan C., Dah-Yuu Lu, Ahmed Alkhateeb, Andrew M. Gardeck, Chih-Hao Lee, et Marianne Wessling-Resnick. 2016. « Characterization of a novel adult murine immortalized microglial cell line and its activation by amyloid-beta ». *Journal of Neuroinflammation* 13 (janvier) : 21.
<https://doi.org/10.1186/s12974-016-0484-z>.
- McInnes, Iain B., et Georg Schett. 2007. « Cytokines in the pathogenesis of rheumatoid arthritis ». *Nature Reviews. Immunology* 7 (6) : 429-42. <https://doi.org/10.1038/nri2094>.
- McQueney, M. S., B. Y. Amegadzie, K. D'Alessio, C. R. Hanning, M. M. McLaughlin, D. McNulty, S. A. Carr, C. Ijames, J. Kurdyla, et C. S. Jones. 1997. « Autocatalytic activation of human cathepsin K ». *The Journal of Biological Chemistry* 272 (21) : 13955-60. <https://doi.org/10.1074/jbc.272.21.13955>.
- Mecca, Carmen, Ileana Giambanco, Rosario Donato, et Cataldo Arcuri. 2018. « Microglia and Aging: The Role of the TREM2-DAP12 and CX3CL1-CX3CR1 Axes ». *International Journal of Molecular Sciences* 19 (1) : E318. <https://doi.org/10.3390/ijms19010318>.
- Medina, E. M. Díaz, E. M. Rodríguez Rodríguez, et C. Díaz Romero. 2007. « Chemical characterization of *Opuntia dillenii* and *Opuntia ficus indica* fruits ». *Food Chemistry* 103 (1) : 38.
- Medzhitov, Ruslan. 2008. « Origin and physiological roles of inflammation ». *Nature* 454 (7203) : 428-35.
<https://doi.org/10.1038/nature07201>.
- Meiler, Flurina, Judith Zumkehr, Sven Klunker, Beate Rückert, Cezmi A. Akdis, et Mübeccel Akdis. 2008. « In vivo switch to IL-10-secreting T regulatory cells in high dose allergen exposure ». *The Journal of Experimental Medicine* 205 (12) : 2887-98. <https://doi.org/10.1084/jem.20080193>.
- Méndez, Lorena Pérez, Fidel Tejera Flores, Jacinto Darias Martín, Elena M. Rodríguez Rodríguez, et Carlos Díaz Romero. 2015. « Physicochemical characterization of cactus pads from *Opuntia dillenii* and *Opuntia ficus indica* ». *Food Chemistry* 188 (décembre) : 393-98.
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.05.011>.
- « Metabolic pathway information for ACOX1 - The Human Protein Atlas ». s. d. Consulté le 22 août 2022.
<https://www.proteinatlas.org/ENSG00000161533-ACOX1/metabolic>.
- Michelucci, Alessandro, Tony Heurtaux, Luc Grandbarbe, Eleonora Morga, et Paul Heuschling. 2009. « Characterization of the microglial phenotype under specific pro-inflammatory and anti-inflammatory conditions: Effects of oligomeric and fibrillar amyloid-beta ». *Journal of Neuroimmunology* 210 (1-2) : 3-12. <https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2009.02.003>.
- Mills, C. D., K. Kincaid, J. M. Alt, M. J. Heilman, et A. M. Hill. 2000. « M-1/M-2 macrophages and the Th1/Th2 paradigm ». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 164 (12) : 6166-73.
<https://doi.org/10.4049/jimmunol.164.12.6166>.
- Mizunoe, Yuhei, Masaki Kobayashi, Shunsuke Hoshino, Ryoma Tagawa, Rei Itagawa, Ayana Hoshino, Naoyuki Okita, et al. 2020. « Cathepsin B overexpression induces degradation of perilipin 1 to cause lipid metabolism dysfunction in adipocytes ». *Scientific Reports* 10 (1) : 634.
<https://doi.org/10.1038/s41598-020-57428-6>.
- Morimoto, A., T. Nakamori, T. Watanabe, T. Ono, et N. Murakami. 1988. « Pattern differences in experimental fevers induced by endotoxin, endogenous pyrogen, and prostaglandins ». *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 254 (4) : R633-40. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.1988.254.4.R633>.
- Mosser, J., A. M. Douar, C. O. Sarde, P. Kioschis, R. Feil, H. Moser, A. M. Poustka, J. L. Mandel, et P. Aubourg. 1993. « Putative X-linked adrenoleukodystrophy gene shares unexpected homology with ABC transporters ». *Nature* 361 (6414) : 726-30. <https://doi.org/10.1038/361726a0>.

- Mrvová, Nataša, Martin Škandík, Marcela Kuniaková, et Lucia Račková. 2015. « Modulation of BV-2 microglia functions by novel quercetin pivaloyl ester ». *Neurochemistry International* 90 (novembre) : 246-54. <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2015.09.005>.
- Msaddak, Lotfi, Ola Abdelhedi, Amani Kridene, Mostafa Rateb, Lassaâd Belbahri, Emna Ammar, Moncef Nasri, et Nacim Zouari. 2017. « Opuntia ficus-indica cladodes as a functional ingredient: bioactive compounds profile and their effect on antioxidant quality of bread ». *Lipids in Health and Disease* 16 (1) : 32. <https://doi.org/10.1186/s12944-016-0397-y>.
- Msaddak, Lotfi, Rayda Siala, Nahed Fakhfakh, M. A. Ayadi, Moncef Nasri, et Nacim Zouari. 2015. « Cladodes from prickly pear as a functional ingredient: effect on fat retention, oxidative stability, nutritional and sensory properties of cookies ». *International Journal of Food Sciences and Nutrition* 66 (8) : 851-57. <https://doi.org/10.3109/09637486.2015.1095862>.
- Mueller, Monika, Stefanie Hobiger, et Alois Jungbauer. 2010. « Anti-inflammatory activity of extracts from fruits, herbs and spices ». *Food Chemistry* 122 (octobre) : 987-96. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.03.041>.
- Mulati, Aiziguli, Xin Zhang, Tong Zhao, Bo Ren, Luanfeng Wang, Xiaoning Liu, Ying Lan, et Xuebo Liu. 2021. « Isorhamnetin attenuates high-fat and high-fructose diet induced cognitive impairments and neuroinflammation by mediating MAPK and NFκB signaling pathways ». *Food & Function* 12 (19) : 9261-72. <https://doi.org/10.1039/d0fo03165h>.
- Murakami, Akira, Takashi Nishizawa, Kahori Egawa, Teruo Kawada, Yasushi Nishikawa, Kazuo Uenakai, et Hajime Ohigashi. 2005. « New class of linoleic acid metabolites biosynthesized by corn and rice lipoxygenases: suppression of proinflammatory mediator expression via attenuation of MAPK- and Akt-, but not PPARγ-, dependent pathways in stimulated macrophages ». *Biochemical Pharmacology* 70 (9) : 1330-42. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2005.07.032>.
- Murakami, Yukio, Atsushi Hirata, Shigeru Ito, Masao Shoji, Shoji Tanaka, Toshikazu Yasui, Mamoru Machino, et Seiichiro Fujisawa. 2007. « Re-evaluation of cyclooxygenase-2-inhibiting activity of vanillin and guaiacol in macrophages stimulated with lipopolysaccharide ». *Anticancer Research* 27 (2) : 801-7.
- Nakahira, Kiichi, Jeffrey Adam Haspel, Vijay A. K. Rathinam, Seon-Jin Lee, Tamas Dolinay, Hilaire C. Lam, Joshua A. Englert, et al. 2011. « Autophagy proteins regulate innate immune responses by inhibiting the release of mitochondrial DNA mediated by the NALP3 inflammasome ». *Nature Immunology* 12 (3) : 222-30. <https://doi.org/10.1038/ni.1980>.
- Nakanishi, Hiroshi. 2003. « Microglial functions and proteases ». *Molecular Neurobiology* 27 (2) : 163-76. <https://doi.org/10.1385/MN:27:2:163>.
- . 2020a. « Microglial cathepsin B as a key driver of inflammatory brain diseases and brain aging ». *Neural Regeneration Research* 15 (1) : 25-29. <https://doi.org/10.4103/1673-5374.264444>.
- . 2020b. « Cathepsin regulation on microglial function ». *Biochimica Et Biophysica Acta. Proteins and Proteomics* 1868 (9) : 140465. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2020.140465>.
- Napoli, Isabella, et Harald Neumann. 2010. « Protective effects of microglia in multiple sclerosis ». *Experimental Neurology* 225 (1) : 24-28. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2009.04.024>.
- Narala, Venkata R., Ravi K. Adapala, Madathilparambil V. Suresh, Thomas G. Brock, Marc Peters-Golden, et Raju C. Reddy. 2010. « Leukotriene B4 is a physiologically relevant endogenous peroxisome proliferator-activated receptor-α agonist ». *The Journal of Biological Chemistry* 285 (29) : 22067-74. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.085118>.
- Naselli, Flores, Luisa Tesoriere, Fabio Caradonna, Daniele Bellavia, Alessandro Attanzio, Carla Gentile, et Maria A. Livrea. 2014. « Anti-proliferative and pro-apoptotic activity of whole extract and isolated indicaxanthin from Opuntia ficus-indica associated with re-activation of the onco-suppressor p16^{INK4a} gene in human colorectal carcinoma (Caco-2) cells ». *Biochemical and*

- Biophysical Research Communications* 450 (1) : 652-58.
<https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2014.06.029>.
- National Research Council (US) Committee for the Update of the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. 2011. *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals*. 8th éd. The National Academies Collection: Reports Funded by National Institutes of Health. Washington (DC) : National Academies Press (US). <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK54050/>.
- Nayak, Debasis, Theodore L. Roth, et Dorian B. McGavern. 2014. « Microglia development and function ». *Annual Review of Immunology* 32 : 367-402. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-032713-120240>.
- Nazzaro, Filomena, Florinda Fratianni, Antonio d’Acerno, Lucia Caputo, Vincenzo De Feo, et Raffaele Coppola. 2021. « Antibiofilm Properties Exhibited by the Prickly Pear (*Opuntia ficus-indica*) Seed Oil ». *Proceedings* 66 (1) : 29. <https://doi.org/10.3390/proceedings2020066029>.
- Neniskyte, Urte, Anna Vilalta, et Guy C. Brown. 2014. « Tumour necrosis factor alpha-induced neuronal loss is mediated by microglial phagocytosis ». *FEBS letters* 588 (17) : 2952-56. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2014.05.046>.
- Neumann, H., M. R. Kotter, et R. J. M. Franklin. 2009. « Debris clearance by microglia: an essential link between degeneration and regeneration ». *Brain: A Journal of Neurology* 132 (Pt 2) : 288-95. <https://doi.org/10.1093/brain/awn109>.
- Ni, Junjun, Zhou Wu, Christoph Peterts, Kenji Yamamoto, Hong Qing, et Hiroshi Nakanishi. 2015. « The Critical Role of Proteolytic Relay through Cathepsins B and E in the Phenotypic Change of Microglia/Macrophage ». *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 35 (36) : 12488-501. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1599-15.2015>.
- Ni, X., S. S. Quisenberry, T. Heng-Moss, J. Markwell, G. Sarath, R. Klucas, et F. Baxendale. 2001. « Oxidative responses of resistant and susceptible cereal leaves to symptomatic and nonsymptomatic cereal aphid (Hemiptera: Aphididae) feeding ». *Journal of Economic Entomology* 94 (3) : 743-51. <https://doi.org/10.1603/0022-0493-94.3.743>.
- Nimmerjahn, Axel, Frank Kirchhoff, et Fritjof Helmchen. 2005. « Resting microglial cells are highly dynamic surveillants of brain parenchyma in vivo ». *Science (New York, N.Y.)* 308 (5726) : 1314-18. <https://doi.org/10.1126/science.1110647>.
- Nishino, I., J. Fu, K. Tanji, T. Yamada, S. Shimojo, T. Koori, M. Mora, et al. 2000. « Primary LAMP-2 deficiency causes X-linked vacuolar cardiomyopathy and myopathy (Danon disease) ». *Nature* 406 (6798) : 906-10. <https://doi.org/10.1038/35022604>.
- Nishioku, Tsuyoshi, Shinya Dohgu, Fuyuko Takata, Tomoaki Eto, Naoko Ishikawa, Kota B. Kodama, Shinsuke Nakagawa, Atsushi Yamauchi, et Yasufumi Kataoka. 2009. « Detachment of brain pericytes from the basal lamina is involved in disruption of the blood-brain barrier caused by lipopolysaccharide-induced sepsis in mice ». *Cellular and Molecular Neurobiology* 29 (3) : 309-16. <https://doi.org/10.1007/s10571-008-9322-x>.
- Nobel, Park S., et Professor of Biology and Associate Director of the UCLA-Doe Laboratory Park S. Nobel. 2002. *Cacti: Biology and Uses*. University of California Press.
- Norris, Callie A., Mu He, Liang-I. Kang, Michael Qi Ding, Josiah E. Radder, Meagan M. Haynes, Yu Yang, et al. 2014. « Synthesis of IL-6 by hepatocytes is a normal response to common hepatic stimuli ». *PLoS One* 9 (4) : e96053. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0096053>.
- Nounah, Issmail, Malika Chbani, Bertrand Matthäus, Zoubida Charrouf, Ahmed Hajib, et Ina Willenberg. 2020a. « Profile of Volatile Aroma-Active Compounds of Cactus Seed Oil (*Opuntia ficus-indica*) from Different Locations in Morocco and Their Fate during Seed Roasting ». *Foods* 9 (9) : 1280. <https://doi.org/10.3390/foods9091280>.

- . 2020b. « Profile of Volatile Aroma-Active Compounds of Cactus Seed Oil (*Opuntia ficus-indica*) from Different Locations in Morocco and Their Fate during Seed Roasting ». *Foods (Basel, Switzerland)* 9 (9) : E1280. <https://doi.org/10.3390/foods9091280>.
- Oaxaca-Castillo, D., P. Andreoletti, A. Vluggens, S. Yu, P. P. van Veldhoven, J. K. Reddy, et M. Cherkaoui-Malki. 2007. « Biochemical characterization of two functional human liver acyl-CoA oxidase isoforms 1a and 1b encoded by a single gene. » *Biochem Biophys Res Commun* 360 (2) : 314-19. [https://doi.org/S0006-291X\(07\)01215-6](https://doi.org/S0006-291X(07)01215-6) [pii] 10.1016/j.bbrc.2007.06.059.
- Oaxaca-Castillo, David, Pierre Andreoletti, Aurore Vluggens, Sangtao Yu, Paul P. van Veldhoven, Janardan K. Reddy, et Mustapha Cherkaoui-Malki. 2007. « Biochemical characterization of two functional human liver acyl-CoA oxidase isoforms 1a and 1b encoded by a single gene ». *Biochemical and Biophysical Research Communications* 360 (2) : 314-19. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2007.06.059>.
- Okinaga, Toshinori, Wataru Ariyoshi, et Tatsuji Nishihara. 2015. « *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* Invasion Induces Interleukin-1 β Production Through Reactive Oxygen Species and Cathepsin B ». *Journal of Interferon & Cytokine Research: The Official Journal of the International Society for Interferon and Cytokine Research* 35 (6) : 431-40. <https://doi.org/10.1089/jir.2014.0127>.
- Oniszczyk, Anna, Agnieszka Wójtowicz, Tomasz Oniszczyk, Arkadiusz Matwijczuk, Ahlem Dib, et Ewa Markut-Miotła. 2020. « Opuntia Fruits as Food Enriching Ingredient, the First Step towards New Functional Food Products ». *Molecules (Basel, Switzerland)* 25 (4) : E916. <https://doi.org/10.3390/molecules25040916>.
- Ono, Koh, Sung O. Kim, et Jiahuai Han. 2003. « Susceptibility of lysosomes to rupture is a determinant for plasma membrane disruption in tumor necrosis factor alpha-induced cell death ». *Molecular and Cellular Biology* 23 (2) : 665-76. <https://doi.org/10.1128/MCB.23.2.665-676.2003>.
- Orsolić, Nada, Anica Horvat Knezević, Lidija Sver, Svjetlana Terzić, et Ivan Basić. 2004. « Immunomodulatory and antimetastatic action of propolis and related polyphenolic compounds ». *Journal of Ethnopharmacology* 94 (2-3) : 307-15. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2004.06.006>.
- Ortega-Ortega, María de los Angeles, Nelly del Socorro Cruz-Cansino, Ernesto Alanís-García, Luis Delgado-Olivares, José Alberto Ariza-Ortega, Esther Ramírez-Moreno, et José de Jesús Manríquez-Torres. 2017. « Optimization of Ultrasound Extraction of Cactus Pear (*Opuntia ficus indica*) Seed Oil Based on Antioxidant Activity and Evaluation of Its Antimicrobial Activity ». *Journal of Food Quality* 2017 (avril) : e9315360. <https://doi.org/10.1155/2017/9315360>.
- Özcan, Mehmet Musa, et Fahad Y. Al Juhaimi. 2011. « Nutritive value and chemical composition of prickly pear seeds (*Opuntia ficus indica* L.) growing in Turkey ». *International Journal of Food Sciences and Nutrition* 62 (5) : 533-36. <https://doi.org/10.3109/09637486.2011.552569>.
- Padilla-Camberos, Eduardo, Jose Miguel Flores-Fernandez, Ofelia Fernandez-Flores, Yanet Gutierrez-Mercado, Joel Carmona-de la Luz, Fabiola Sandoval-Salas, Carlos Mendez-Carreto, et Kirk Allen. 2015. « Hypocholesterolemic Effect and In Vitro Pancreatic Lipase Inhibitory Activity of an *Opuntia ficus-indica* Extract ». *BioMed Research International* 2015 : 837452. <https://doi.org/10.1155/2015/837452>.
- Paintlia, Manjeet K., Ajaib S. Paintlia, Mushfiquddin Khan, Inderjit Singh, et Avtar K. Singh. 2008. « Modulation of peroxisome proliferator-activated receptor-alpha activity by N-acetyl cysteine attenuates inhibition of oligodendrocyte development in lipopolysaccharide stimulated mixed glial cultures ». *Journal of Neurochemistry* 105 (3) : 956-70. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2007.05199.x>.

- Palomares, O., M. Martín-Fontecha, R. Lauener, C. Traidl-Hoffmann, O. Cavkaytar, M. Akdis, et C. A. Akdis. 2014. « Regulatory T cells and immune regulation of allergic diseases: roles of IL-10 and TGF- β ». *Genes and Immunity* 15 (8) : 511-20. <https://doi.org/10.1038/gene.2014.45>.
- Pang, Manhui, Ariel F. Martinez, Isabel Fernandez, Wayne Balkan, et Bruce R. Troen. 2007. « AP-1 stimulates the cathepsin K promoter in RAW 264.7 cells ». *Gene* 403 (1-2) : 151-58. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2007.08.007>.
- Panico, A. M., V. Cardile, F. Garufi, C. Puglia, F. Bonina, et S. Ronsisvalle. 2007. « Effect of hyaluronic acid and polysaccharides from *Opuntia ficus indica* (L.) cladodes on the metabolism of human chondrocyte cultures ». *Journal of Ethnopharmacology* 111 (2) : 315-21. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2006.11.020>.
- Pantaleón, D. M. García, M. Flores Ortiz, M. J. Moreno Álvarez, D. R. Belén Camacho, C. A. Medina Martínez, C. E. Ojeda Escalona, et C. A. Padrón Pereira. 2009. « Chemical, biochemical, and fatty acids composition of seeds of *Opuntia boldinghii* Britton et Rose ». *Journal of the Professional Association for Cactus Development* 11 (janvier) : 45-52.
- Park, E. H., J. H. Kahng, S. H. Lee, et K. H. Shin. 2001. « An anti-inflammatory principle from cactus ». *Fitoterapia* 72 (3) : 288-90. [https://doi.org/10.1016/s0367-326x\(00\)00287-2](https://doi.org/10.1016/s0367-326x(00)00287-2).
- Parsons, M. E., et R. J. Pennington. 1976. « Separation of rat muscle aminopeptidases ». *The Biochemical Journal* 155 (2) : 375-81. <https://doi.org/10.1042/bj1550375>.
- Patel, Seema, Ahmad Homaei, Hesham R. El-Seedi, et Nadeem Akhtar. 2018. « Cathepsins: Proteases that are vital for survival but can also be fatal ». *Biomedicine & Pharmacotherapy = Biomedecine & Pharmacotherapie* 105 (septembre) : 526-32. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.05.148>.
- Pautz, Andrea, Julia Art, Susanne Hahn, Sebastian Nowag, Cornelia Voss, et Hartmut Kleinert. 2010. « Regulation of the expression of inducible nitric oxide synthase ». *Nitric Oxide: Biology and Chemistry* 23 (2) : 75-93. <https://doi.org/10.1016/j.niox.2010.04.007>.
- Peng, Xiaoyao, Zhixuan Luo, Shuang He, Luhua Zhang, et Ying Li. 2021. « Blood-Brain Barrier Disruption by Lipopolysaccharide and Sepsis-Associated Encephalopathy ». *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* 11 : 768108. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2021.768108>.
- Pengfei, Liu, Deng Tiansheng, Hou Xianglin, et Wang Jianguo. 2009. « Antioxidant properties of isolated isorhamnetin from the sea buckthorn marc ». *Plant Foods for Human Nutrition (Dordrecht, Netherlands)* 64 (2) : 141-45. <https://doi.org/10.1007/s11130-009-0116-1>.
- Penissi, Alicia B., María I. Rudolph, et Ramón S. Piezzi. 2003. « Role of mast cells in gastrointestinal mucosal defense ». *Biocell: Official Journal of the Sociedades Latinoamericanas De Microscopia Electronica ... Et. Al* 27 (2) : 163-72.
- Pereira, Fernanda dos Santos, Ursula Matte, Clarissa Troller Habekost, Raphael Machado de Castilhos, Antonette Souto El Husny, Charles Marques Lourenço, Angela M. Vianna-Morgante, et al. 2012. « Mutations, Clinical Findings and Survival Estimates in South American Patients with X-Linked Adrenoleukodystrophy ». *PLoS ONE* 7 (3) : e34195. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0034195>.
- Périchon, R., J. M. Bourre, J. F. Kelly, et G. S. Roth. 1998. « The role of peroxisomes in aging ». *Cellular and molecular life sciences: CMLS* 54 (7) : 641-52. <https://doi.org/10.1007/s000180050192>.
- Perkins, Neil D. 2007. « Integrating cell-signalling pathways with NF-kappaB and IKK function ». *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 8 (1) : 49-62. <https://doi.org/10.1038/nrm2083>.
- Pham, Anh Thu, Karl Egil Malterud, Berit Smestad Paulsen, Drissa Diallo, et Helle Wangensteen. 2014. « α -Glucosidase inhibition, 15-lipoxygenase inhibition, and brine shrimp toxicity of extracts and isolated compounds from *Terminalia macroptera* leaves ». *Pharmaceutical Biology* 52 (9) : 1166-69. <https://doi.org/10.3109/13880209.2014.880486>.
- Piga, Antonio. 2004. « Cactus Pear: a Fruit of nutraceutical and functional importance ». *Journal of the Professional Association for Cactus Development*, octobre, 9-22.

- Plaza-Zabala, Ainhoa, Virginia Sierra-Torre, et Amanda Sierra. 2017. « Autophagy and Microglia: Novel Partners in Neurodegeneration and Aging ». *International Journal of Molecular Sciences* 18 (3) : E598. <https://doi.org/10.3390/ijms18030598>.
- Poirier, Yves, Vasily D. Antonenkov, Tuomo Glumoff, et J. Kalervo Hiltunen. 2006. « Peroxisomal beta-oxidation--a metabolic pathway with multiple functions ». *Biochimica Et Biophysica Acta* 1763 (12) : 1413-26. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2006.08.034>.
- Poltorak, A., X. He, I. Smirnova, M. Y. Liu, C. Van Huffel, X. Du, D. Birdwell, et al. 1998. « Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in Tlr4 gene ». *Science (New York, N.Y.)* 282 (5396) : 2085-88. <https://doi.org/10.1126/science.282.5396.2085>.
- Potapovich, M. V., V. P. Kurchenko, D. I. Metelitsa, et O. I. Shadyro. 2011. « [Antioxidant activity of oxygen-containing aromatic compounds] ». *Prikladnaia Biokhimiia I Mikrobiologiya* 47 (4) : 386-96.
- Prinz, Marco, et Josef Priller. 2014. « Microglia and brain macrophages in the molecular age: from origin to neuropsychiatric disease ». *Nature Reviews. Neuroscience* 15 (5) : 300-312. <https://doi.org/10.1038/nrn3722>.
- Psahoulia, Faiy H., Konstantinos G. Drosopoulos, Lenka Doubravska, Ladislav Andera, et Alexander Pintzas. 2007. « Quercetin enhances TRAIL-mediated apoptosis in colon cancer cells by inducing the accumulation of death receptors in lipid rafts ». *Molecular Cancer Therapeutics* 6 (9) : 2591-99. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-07-0001>.
- PubChem. s. d. « 4-Hydroxy-3-methoxycinnamaldehyde ». Consulté le 17 août 2022a. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/5280536>.
- . s. d. « Isorhamnetin ». Consulté le 16 août 2022b. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/5281654>.
- . s. d. « Narcissoside ». Consulté le 16 août 2022c. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/5481663>.
- . s. d. « Quercetin ». Consulté le 17 août 2022d. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/5280343>.
- . s. d. « Syringaldehyde ». Consulté le 16 août 2022e. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/8655>.
- . s. d. « Vanillin ». Consulté le 17 août 2022f. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/1183>.
- Puissant, Emeline, et Marielle Boonen. 2016. « Monocytes/Macrophages Upregulate the Hyaluronidase HYAL1 and Adapt Its Subcellular Trafficking to Promote Extracellular Residency upon Differentiation into Osteoclasts ». *PLoS One* 11 (10) : e0165004. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0165004>.
- Puissant, Emeline, Florentine Gilis, Sophie Dogné, Bruno Flamion, Michel Jadot, et Marielle Boonen. 2014. « Subcellular trafficking and activity of Hyal-1 and its processed forms in murine macrophages ». *Traffic (Copenhagen, Denmark)* 15 (5) : 500-515. <https://doi.org/10.1111/tra.12162>.
- Pun, Nirmala Tiliya, Amit Subedi, Mi Jin Kim, et Pil-Hoon Park. 2015. « Globular Adiponectin Causes Tolerance to LPS-Induced TNF- α Expression via Autophagy Induction in RAW 264.7 Macrophages: Involvement of SIRT1/FoxO3A Axis ». *PLoS One* 10 (5) : e0124636. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0124636>.
- Qi, Feng, Ji-Hao Sun, Jia-Qun Yan, Chun-Mei Li, et Xue-Chao Lv. 2018. « Anti-inflammatory effects of isorhamnetin on LPS-stimulated human gingival fibroblasts by activating Nrf2 signaling pathway ». *Microbial Pathogenesis* 120 (juillet) : 37-41. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2018.04.049>.

- Qin, Liya, Xuefei Wu, Michelle L. Block, Yuxin Liu, George R. Breese, Jau-Shyong Hong, Darin J. Knapp, et Fulton T. Crews. 2007a. « Systemic LPS causes chronic neuroinflammation and progressive neurodegeneration ». *Glia* 55 (5) : 453-62. <https://doi.org/10.1002/glia.20467>.
- . 2007b. « Systemic LPS causes chronic neuroinflammation and progressive neurodegeneration ». *Glia* 55 (5) : 453-62. <https://doi.org/10.1002/glia.20467>.
- Qin, Yongwei, Xiaolei Sun, Xiaoyi Shao, Ming Xia Hu, Jinrong Feng, Zhan Chen, Jie Sun, Zhou Zhou, Yinong Duan, et Chun Cheng. 2016. « Lipopolysaccharide Preconditioning Induces an Anti-inflammatory Phenotype in BV2 Microglia ». *Cellular and Molecular Neurobiology* 36 (8) : 1269-77. <https://doi.org/10.1007/s10571-015-0324-1>.
- Qiu, Shujuan, Guiling Sun, Yunxia Zhang, Xiangling Li, et Rong Wang. 2016. « Involvement of the NF- κ B signaling pathway in the renoprotective effects of isorhamnetin in a type 2 diabetic rat model ». *Biomedical Reports* 4 (5) : 628-34. <https://doi.org/10.3892/br.2016.636>.
- Quan, Ning, et William A. Banks. 2007. « Brain-immune communication pathways ». *Brain, Behavior, and Immunity* 21 (6) : 727-35. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2007.05.005>.
- Raas, Q., C. Gondcaille, Y. Hamon, V. Leoni, C. Caccia, F. Ménétrier, G. Lizard, D. Trompier, et S. Savary. 2019. « CRISPR/Cas9-mediated knockout of Abcd1 and Abcd2 genes in BV-2 cells: novel microglial models for X-linked Adrenoleukodystrophy ». *Biochimica Et Biophysica Acta. Molecular and Cell Biology of Lipids* 1864 (5) : 704-14. <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2019.02.006>.
- Raas, Q., F. E. Saih, C. Gondcaille, D. Trompier, Y. Hamon, V. Leoni, C. Caccia, B. Nasser, M. Jadot, F. Menétrier, et al. 2019. « A microglial cell model for acyl-CoA oxidase 1 deficiency ». *Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids* 1864 (4) : 567-76. <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2018.10.005>.
- Raas, Q., F.-E. Saih, C. Gondcaille, D. Trompier, Y. Hamon, V. Leoni, C. Caccia, B. Nasser, M. Jadot, F. Ménétrier, et al. 2019. « A microglial cell model for acyl-CoA oxidase 1 deficiency ». *Biochimica Et Biophysica Acta. Molecular and Cell Biology of Lipids* 1864 (4) : 567-76. <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2018.10.005>.
- Radnai, Balazs, Zsuzsanna Tucsek, Zita Bogнар, Csenge Antus, Laszlo Mark, Zoltan Berente, Ferenc Gallyas, Balazs Sumegi, et Balazs Veres. 2009. « Ferulaldehyde, a water-soluble degradation product of polyphenols, inhibits the lipopolysaccharide-induced inflammatory response in mice ». *The Journal of Nutrition* 139 (2) : 291-97. <https://doi.org/10.3945/jn.108.097386>.
- Rafikov, Ruslan, Sanjiv Kumar, Saurabh Aggarwal, Yali Hou, Archana Kangath, Daniel Pardo, Jeffrey R. Fineman, et Stephen M. Black. 2014. « Endothelin-1 stimulates catalase activity through the PKC δ -mediated phosphorylation of serine 167 ». *Free Radical Biology & Medicine* 67 (février) : 255-64. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2013.10.814>.
- Ramachandran, Lalitha, Kanjoormana Aryan Manu, Muthu K. Shanmugam, Feng Li, Kodappully Sivaraman Siveen, Shireen Vali, Shweta Kapoor, et al. 2012. « Isorhamnetin inhibits proliferation and invasion and induces apoptosis through the modulation of peroxisome proliferator-activated receptor γ activation pathway in gastric cancer ». *The Journal of Biological Chemistry* 287 (45) : 38028-40. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.388702>.
- Ramadan, M., et J. Mörsel. 2003. « Lipid profile of prickly pear pulp fractions ». *Undefined*. <https://www.semanticscholar.org/paper/Lipid-profile-of-prickly-pear-pulp-fractions-Ramadan-M%3B%rsel/89689b42b18e7a37c730800f5cd04ab2318fc157>.
- Ramadan, Mohamed Fawzy, et Jörg-Thomas Mörsel. 2003a. « Oil cactus pear (*Opuntia ficus-indica* L.) ». *Food Chemistry* 82 (3) : 339-45. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(02\)00550-2](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(02)00550-2).
- . 2003b. « 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) : 447-56. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(03\)00128-6](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(03)00128-6).

- Ramírez-Moreno, Esther, Raquel Cariño-Cortés, Nelly del Socorro Cruz-Cansino, Luis Delgado-Olivares, José Alberto Ariza-Ortega, Vanessa Yelina Montañez-Izquierdo, María Manuela Hernández-Herrero, et Tomás Filardo-Kerstupp. 2017. « Antioxidant and Antimicrobial Properties of Cactus Pear (*Opuntia*) Seed Oils ». *Journal of Food Quality* 2017 (avril) : e3075907. <https://doi.org/10.1155/2017/3075907>.
- Ramyaa, Periasamy, Rajashree Krishnaswamy, et Viswanadha Vijaya Padma. 2014. « Quercetin modulates OTA-induced oxidative stress and redox signalling in HepG2 cells - up regulation of Nrf2 expression and down regulation of NF- κ B and COX-2 ». *Biochimica Et Biophysica Acta* 1840 (1) : 681-92. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2013.10.024>.
- Read, M. A. 1995. « Flavonoids: naturally occurring anti-inflammatory agents ». *The American Journal of Pathology* 147 (2) : 235-37.
- Reddy, J. K., et T. Hashimoto. 2001. « Peroxisomal beta-oxidation and peroxisome proliferator-activated receptor alpha: an adaptive metabolic system ». *Annual Review of Nutrition* 21 : 193-230. <https://doi.org/10.1146/annurev.nutr.21.1.193>.
- Reddy, Muntha K., Ruby L. Alexander-Lindo, et Muraleedharan G. Nair. 2005. « Relative inhibition of lipid peroxidation, cyclooxygenase enzymes, and human tumor cell proliferation by natural food colors ». *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53 (23) : 9268-73. <https://doi.org/10.1021/jf051399j>.
- Regalado-Rentería, Evelyn, Juan Rogelio Aguirre-Rivera, Marco Martín González-Chávez, Roberto Sánchez-Sánchez, Fidel Martínez-Gutiérrez, et Bertha Irene Juárez-Flores. 2020. « Assessment of Extraction Methods and Biological Value of Seed Oil from Eight Variants of Prickly Pear Fruit (*Opuntia* spp.) ». *Waste and Biomass Valorization* 11 (3) : 1181-89. <https://doi.org/10.1007/s12649-018-0409-4>.
- Reiser, Jochen, Brian Adair, et Thomas Reinheckel. 2010. « Specialized roles for cysteine cathepsins in health and disease ». *The Journal of Clinical Investigation* 120 (10) : 3421-31. <https://doi.org/10.1172/JCI42918>.
- Remans, Tony, Els Keunen, Geert Jan Bex, Karen Smeets, Jaco Vangronsveld, et Ann Cuypers. 2014. « Reliable gene expression analysis by reverse transcription-quantitative PCR: reporting and minimizing the uncertainty in data accuracy ». *The Plant Cell* 26 (10) : 3829-37. <https://doi.org/10.1105/tpc.114.130641>.
- Ren, Kun, Ting Jiang, et Guo-Jun Zhao. 2018. « Quercetin induces the selective uptake of HDL-cholesterol via promoting SR-BI expression and the activation of the PPAR γ /LXR α pathway ». *Food & Function* 9 (1) : 624-35. <https://doi.org/10.1039/c7fo01107e>.
- Ren, Xiaojie, Longyin Han, Yongxing Li, Huanyi Zhao, Ziyin Zhang, Yuerong Zhuang, Ming Zhong, Qiang Wang, Wuhua Ma, et Yong Wang. 2021. « Isorhamnetin attenuates TNF- α -induced inflammation, proliferation, and migration in human bronchial epithelial cells via MAPK and NF- κ B pathways ». *Anatomical Record (Hoboken, N.J.: 2007)* 304 (4) : 901-13. <https://doi.org/10.1002/ar.24506>.
- Rgui, Laila, Lourdes Casas Cardoso, M^a Fernández, C. Mantell, Zoubaïda Fadly, Redouane Metni, et Enrique Martinez de la Ossa. 2014. *SUPERCRITICAL FLUID EXTRACTION OF OIL OBTAINED FROM *Opuntia ficus indica**. <https://doi.org/10.13140/RG.2.2.33612.21125>.
- Rhodin, Johannes 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. » Stockholm : Dept. of Anatomy, Karolinska Institutet.
- Ribeiro, Daniela, Marisa Freitas, Sara M. Tomé, Artur M. S. Silva, Stefan Laufer, José L. F. C. Lima, et Eduarda Fernandes. 2015. « Flavonoids inhibit COX-1 and COX-2 enzymes and cytokine/chemokine production in human whole blood ». *Inflammation* 38 (2) : 858-70. <https://doi.org/10.1007/s10753-014-9995-x>.

- Ribeiro Xavier, Anna L., Benjamin T. Kress, Steven A. Goldman, João R. Lacerda de Menezes, et Maiken Nedergaard. 2015. « A Distinct Population of Microglia Supports Adult Neurogenesis in the Subventricular Zone ». *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 35 (34) : 11848-61. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1217-15.2015>.
- Roberts, Tania Michelle, Fabian Rudolf, Andreas Meyer, Rene Pellaux, Ellis Whitehead, Sven Panke, et Martin Held. 2016. « Identification and Characterisation of a pH-stable GFP ». *Scientific Reports* 6 (juin) : 28166. <https://doi.org/10.1038/srep28166>.
- Rodriguez, Ana, et Helena Costa. 2006. « Analysis of carotenoids in vegetable and plasma samples: A review ». *Journal of Food Composition and Analysis* 19 (mars) : 97-111. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2005.04.004>.
- Roediger, Ben, Ryan Kyle, Szun S. Tay, Andrew J. Mitchell, Holly A. Bolton, Thomas V. Guy, Sioh-Yang Tan, et al. 2015. « IL-2 is a critical regulator of group 2 innate lymphoid cell function during pulmonary inflammation ». *The Journal of Allergy and Clinical Immunology* 136 (6) : 1653-1663.e7. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2015.03.043>.
- Ronchetti, Daniela, Francesco Impagnatiello, Massimiliano Guzzetta, Laura Gasparini, Monica Borgatti, Roberto Gambari, et Ennio Ongini. 2006. « Modulation of iNOS expression by a nitric oxide-releasing derivative of the natural antioxidant ferulic acid in activated RAW 264.7 macrophages ». *European Journal of Pharmacology* 532 (1-2) : 162-69. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2005.12.034>.
- Ross, Julie A., et Christine M. Kasum. 2002. « Dietary flavonoids: bioavailability, metabolic effects, and safety ». *Annual Review of Nutrition* 22 : 19-34. <https://doi.org/10.1146/annurev.nutr.22.111401.144957>.
- Rotshenker, Shlomo. 2003. « Microglia and macrophage activation and the regulation of complement-receptor-3 (CR3/MAC-1)-mediated myelin phagocytosis in injury and disease ». *Journal of molecular neuroscience: MN* 21 (1) : 65-72. <https://doi.org/10.1385/JMN:21:1:65>.
- Roux, Philippe P., et John Blenis. 2004. « ERK and p38 MAPK-activated protein kinases: a family of protein kinases with diverse biological functions ». *Microbiology and molecular biology reviews: MMBR* 68 (2) : 320-44. <https://doi.org/10.1128/MMBR.68.2.320-344.2004>.
- Rubin, Emanuel, et Howard M Reisner. 2014. *Essentials of Rubin's pathology*. Philadelphia : Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins.
- Saih, F. E., P. Andreoletti, S. Mandard, N. Latruffe, M. S. El Kebbaj, G. Lizard, B. Nasser, et M. Cherkaoui-Malki. 2017. « Protective Effect of Cactus Cladode Extracts on Peroxisomal Functions in Microglial BV-2 Cells Activated by Different Lipopolysaccharides ». *Molecules* 22 (1). <https://doi.org/ARTN 102 10.3390/molecules22010102>.
- Saih, Fatima-Ezzahra, Pierre Andreoletti, Stéphane Mandard, Norbert Latruffe, M'Hammed Saïd El Kebbaj, Gérard Lizard, Boubker Nasser, et Mustapha Cherkaoui-Malki. 2017. « Protective Effect of Cactus Cladode Extracts on Peroxisomal Functions in Microglial BV-2 Cells Activated by Different Lipopolysaccharides ». *Molecules (Basel, Switzerland)* 22 (1) : E102. <https://doi.org/10.3390/molecules22010102>.
- Sakai, S., H. Ochiai, K. Nakajima, et K. Terasawa. 1997. « Inhibitory effect of ferulic acid on macrophage inflammatory protein-2 production in a murine macrophage cell line, RAW264.7 ». *Cytokine* 9 (4) : 242-48. <https://doi.org/10.1006/cyto.1996.0160>.
- Salau, Veronica F., Ochuko L. Erukainure, Collins U. Ibeji, Tosin A. Olasehinde, Neil A. Koobanally, et Md Shahidul Islam. 2020. « Vanillin and vanillic acid modulate antioxidant defense system via amelioration of metabolic complications linked to Fe²⁺-induced brain tissues damage ». *Metabolic Brain Disease* 35 (5) : 727-38. <https://doi.org/10.1007/s11011-020-00545-y>.

- Saleem, Muhammad, Hyoung Ja Kim, Chang Kyun Han, Changbae Jin, et Yong Sup Lee. 2006. « Secondary metabolites from *Opuntia ficus-indica* var. *saboten* ». *Phytochemistry* 67 (13) : 1390-94. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2006.04.009>.
- Salem, Jamila Hadj. 2009. « Extraction, identification, caractérisation des activités biologiques de flavonoïdes de *Nitraria retusa* et synthèse de dérivés acylés de ces molécules par voie enzymatique ». Phdthesis, Institut National Polytechnique de Lorraine. <https://hal.univ-lorraine.fr/tel-01748769>.
- Salim, Nebbache, Abdelwaheb Chibani, Chadli Rabah, et Bouznad Ahcene. 2010. « Chemical composition of *Opuntia ficus-indica* (L.) fruit ». *Af J Biotech* 8 (janvier).
- Salvo, Francesco, Enza Galati, S. Curto, et Maria Tripodo. 2002. « Chemical characterization of *Opuntia ficus-indica* seed oil ». *Acta Horticulturae* 581 (août) : 283-89. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2002.581.33>.
- Saraiva, Margarida, et Anne O'Garra. 2010. « The regulation of IL-10 production by immune cells ». *Nature Reviews. Immunology* 10 (3) : 170-81. <https://doi.org/10.1038/nri2711>.
- Sato, Kaoru. 2015. « Effects of Microglia on Neurogenesis ». *Glia* 63 (8) : 1394-1405. <https://doi.org/10.1002/glia.22858>.
- Sawaya, W. N., J. K. Khalil, et M. M. Al-Mohammad. 1983. « Nutritive value of prickly pear seeds, *Opuntia ficus-indica* ». *Plant Foods for Human Nutrition* 33 (1) : 91-97. <https://doi.org/10.1007/BF01093742>.
- Sawaya, W. N., et P. Khan. 1982. « Chemical Characterization of Prickly Pear Seed Oil, *Opuntia ficus-indica* ». *Journal of Food Science* 47 (6) : 2060-61. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1982.tb12946.x>.
- Sawaya, W. N., H. A. Khatchadourian, W. M. Safi, et H. M. Al-Muhammad. 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) : 183-93. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1983.tb00259.x>.
- Schaffer, S., S. Schmitt-Schillig, W. E. Müller, et G. P. Eckert. 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 (mars) : 115-24.
- Schilcher, Katrin, Federica Andreoni, Satoshi Uchiyama, Taiji Ogawa, Reto A. Schuepbach, et Annelies S. Zinkernagel. 2014. « Increased neutrophil extracellular trap-mediated *Staphylococcus aureus* clearance through inhibition of nuclease activity by clindamycin and immunoglobulin ». *The Journal of Infectious Diseases* 210 (3) : 473-82. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiu091>.
- Schneider, Isabella, et Franz Bucar. 2005. « Lipoxygenase inhibitors from natural plant sources. Part 1: Medicinal plants with inhibitory activity on arachidonate 5-lipoxygenase and 5-lipoxygenase[sol]cyclooxygenase ». *Phytotherapy research: PTR* 19 (2) : 81-102. <https://doi.org/10.1002/ptr.1603>.
- Schoonjans, K., G. Martin, B. Staels, et J. Auwerx. 1997. « Peroxisome proliferator-activated receptors, orphans with ligands and functions ». *Current Opinion in Lipidology* 8 (3) : 159-66. <https://doi.org/10.1097/00041433-199706000-00006>.
- Schrader, Michael, et H. Dariush Fahimi. 2004. « Mammalian peroxisomes and reactive oxygen species ». *Histochemistry and Cell Biology* 122 (4) : 383-93. <https://doi.org/10.1007/s00418-004-0673-1>.
- . 2006a. « Growth and division of peroxisomes ». *International Review of Cytology* 255 : 237-90. [https://doi.org/10.1016/S0074-7696\(06\)55005-3](https://doi.org/10.1016/S0074-7696(06)55005-3).
- . 2006b. « Peroxisomes and oxidative stress ». *Biochimica Et Biophysica Acta* 1763 (12) : 1755-66. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2006.09.006>.

- . 2008. « The peroxisome: still a mysterious organelle ». *Histochemistry and Cell Biology* 129 (4) : 421-40. <https://doi.org/10.1007/s00418-008-0396-9>.
- Selkrig, Joel, Nan Li, Annika Hausmann, Matthew S. J. Mangan, Matylda Zietek, André Mateus, Jacob Bobonis, et al. 2020. « Spatiotemporal proteomics uncovers cathepsin-dependent macrophage cell death during Salmonella infection ». *Nature Microbiology* 5 (9) : 1119-33. <https://doi.org/10.1038/s41564-020-0736-7>.
- Shahidi, Fereidoon, et Priyatharini Ambigaipalan. 2018. « Omega-3 Polyunsaturated Fatty Acids and Their Health Benefits ». *Annual Review of Food Science and Technology* 9 (mars) : 345-81. <https://doi.org/10.1146/annurev-food-111317-095850>.
- Shahzad, Sumayya, Somaiya Mateen, Tasneem Kausar, Syed Shariq Naeem, Asif Hasan, Minhal Abidi, Shahid M. Nayeem, Abul Faiz Faizy, et Shagufta Moin. 2020. « Effect of syringic acid and syringaldehyde on oxidative stress and inflammatory status in peripheral blood mononuclear cells from patients of myocardial infarction ». *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology* 393 (4) : 691-704. <https://doi.org/10.1007/s00210-019-01768-2>.
- Shahzad, Sumayya, Somaiya Mateen, P. M. Mubeena Mariyath, Syed Shariq Naeem, Kafil Akhtar, Waseem Rizvi, et Shagufta Moin. 2018. « Protective effect of syringaldehyde on biomolecular oxidation, inflammation and histopathological alterations in isoproterenol induced cardiotoxicity in rats ». *Biomedicine & Pharmacotherapy = Biomedecine & Pharmacotherapie* 108 (décembre) : 625-33. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.09.055>.
- Sharma, Deep Raj, Aditya Sunkaria, Willayat Yousuf Wani, Reeta Kumari Sharma, Deepika Verma, Kumari Priyanka, Amanjit Bal, et Kiran Dip Gill. 2015. « Quercetin protects against aluminium induced oxidative stress and promotes mitochondrial biogenesis via activation of the PGC-1 α signaling pathway ». *NeuroToxicology* 51 (décembre) : 116-37. <https://doi.org/10.1016/j.neuro.2015.10.002>.
- Sharshar, Tarek, Djillali Annane, Geoffroy Lorin de la Grandmaison, Jean Philippe Brouland, Nicholas S. Hopkinson, et Gray Françoise. 2004. « The neuropathology of septic shock ». *Brain Pathology (Zurich, Switzerland)* 14 (1) : 21-33. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3639.2004.tb00494.x>.
- Shen, Chien-Chang, Ching-Li Ni, Yuh-Chiang Shen, Yu-Ling Huang, Ching-Hsia Kuo, Tian-Shung Wu, et Chien-Chih Chen. 2009. « Phenolic constituents from the stem bark of *Magnolia officinalis* ». *Journal of Natural Products* 72 (1) : 168-71. <https://doi.org/10.1021/np800494e>.
- Shimazu, R., S. Akashi, H. Ogata, Y. Nagai, K. Fukudome, K. Miyake, et M. Kimoto. 1999. « MD-2, a molecule that confers lipopolysaccharide responsiveness on Toll-like receptor 4 ». *The Journal of Experimental Medicine* 189 (11) : 1777-82. <https://doi.org/10.1084/jem.189.11.1777>.
- Shimizu, Takao. 2009. « Lipid mediators in health and disease: enzymes and receptors as therapeutic targets for the regulation of immunity and inflammation ». *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* 49 : 123-50. <https://doi.org/10.1146/annurev.pharmtox.011008.145616>.
- Shin, Ji-Sun, Hye-Eun Choi, Soo-Dong Kim, Yong Sup Lee, Young-Wuk Cho, et Kyung Tae Lee. 2014. « Anti-inflammatory effects of 7-hydroxyl-1-methylindole-3-acetonitrile, a synthetic arvelexin derivative, on the macrophages through destabilizing mPGES-1 mRNA and suppressing NF- κ B activation ». *Chemico-Biological Interactions* 224 (décembre) : 68-77. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2014.10.004>.
- Shinozaki, Shohei, Cheol Soo Choi, Nobuyuki Shimizu, Marina Yamada, Minhye Kim, Ting Zhang, Goshi Shiota, H. Henry Dong, Young-Bum Kim, et Masao Kaneki. 2011. « Liver-specific inducible nitric-oxide synthase expression is sufficient to cause hepatic insulin resistance and mild hyperglycemia in mice ». *The Journal of Biological Chemistry* 286 (40) : 34959-75. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.187666>.

- Shivachandra, S. B., K. N. Viswas, et A. A. Kumar. 2011. « A review of hemorrhagic septicemia in cattle and buffalo ». *Animal Health Research Reviews* 12 (1) : 67-82.
<https://doi.org/10.1017/S146625231100003X>.
- Sierra, Amanda, Juan M. Encinas, Juan J. P. Deudero, Jessica H. Chancey, Grigori Enikolopov, Linda S. Overstreet-Wadiche, Stella E. Tsirka, et Mirjana Maletic-Savatic. 2010. « Microglia shape adult hippocampal neurogenesis through apoptosis-coupled phagocytosis ». *Cell Stem Cell* 7 (4) : 483-95. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2010.08.014>.
- Silva, Mafalda Alexandra, Tânia Gonçalves Albuquerque, Paula Pereira, Renata Ramalho, Filipa Vicente, Maria Beatriz P. P. Oliveira, et Helena S. Costa. 2021. « Opuntia ficus-indica (L.) Mill.: A Multi-Benefit Potential to Be Exploited ». *Molecules (Basel, Switzerland)* 26 (4) : 951.
<https://doi.org/10.3390/molecules26040951>.
- Singh, Inderjit, et Aurora Pujol. 2010. « Pathomechanisms underlying X-adrenoleukodystrophy: a three-hit hypothesis ». *Brain Pathology (Zurich, Switzerland)* 20 (4) : 838-44.
<https://doi.org/10.1111/j.1750-3639.2010.00392.x>.
- Slimen, Imen, Taha Najjar, et Manef Abderrabba. 2016. « Opuntia ficus-indica as a Source of Bioactive and Nutritional Phytochemicals ». *Journal of Food and Nutrition Sciences* 2016; 4(6): 162-169 (décembre) : : 162-169. <https://doi.org/10.11648/j.jfns.20160406.14>.
- Smith, M. E. 1999. « Phagocytosis of myelin in demyelinating disease: a review ». *Neurochemical Research* 24 (2) : 261-68. <https://doi.org/10.1023/a:1022566121967>.
- Soobrattee, M. A., V. S. Neergheen, A. Luximon-Ramma, O. I. Aruoma, et T. Bahorun. 2005. « Phenolics as potential antioxidant therapeutic agents: mechanism and actions ». *Mutation Research* 579 (1-2) : 200-213. <https://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2005.03.023>.
- Spencer, Jeremy P. E., Katerina Vafeiadou, Robert J. Williams, et David Vauzour. 2012. « Neuroinflammation: modulation by flavonoids and mechanisms of action ». *Molecular Aspects of Medicine* 33 (1) : 83-97. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2011.10.016>.
- Spolarics, Z. 1998. « Endotoxemia, pentose cycle, and the oxidant/antioxidant balance in the hepatic sinusoid ». *Journal of Leukocyte Biology* 63 (5) : 534-41. <https://doi.org/10.1002/jlb.63.5.534>.
- Srinual, Songpol, Pithi Chanvorachote, et Varisa Pongrakhananon. 2017. « Suppression of cancer stem-like phenotypes in NCI-H460 lung cancer cells by vanillin through an Akt-dependent pathway ». *International Journal of Oncology* 50 (4) : 1341-51. <https://doi.org/10.3892/ijo.2017.3879>.
- Sriskandan, S., et D. M. Altmann. 2008. « The immunology of sepsis ». *The Journal of Pathology* 214 (2) : 211-23. <https://doi.org/10.1002/path.2274>.
- Stalińska, K., A. Guzdek, M. Rokicki, et A. Koj. 2005. « Transcription factors as targets of the anti-inflammatory treatment. A cell culture study with extracts from some Mediterranean diet plants ». *Journal of Physiology and Pharmacology: An Official Journal of the Polish Physiological Society* 56 Suppl 1 (mars) : 157-69.
- Stanic, Barbara, Willem van de Veen, Oliver F. Wirz, Beate Rückert, Hideaki Morita, Stefan Söllner, Cezmi A. Akdis, et Mübeccel Akdis. 2015. « IL-10-overexpressing B cells regulate innate and adaptive immune responses ». *The Journal of Allergy and Clinical Immunology* 135 (3) : 771-780.e8.
<https://doi.org/10.1016/j.jaci.2014.07.041>.
- Stanikunaite, Rita, Shabana I. Khan, James M. Trappe, et Samir A. Ross. 2009. « Cyclooxygenase-2 inhibitory and antioxidant compounds from the truffle *Elaphomyces granulatus* ». *Phytotherapy research: PTR* 23 (4) : 575-78. <https://doi.org/10.1002/ptr.2698>.
- Stintzing, Florian C., et Reinhold Carle. 2005. « Cactus stems (*Opuntia* spp.): a review on their chemistry, technology, and uses ». *Molecular Nutrition & Food Research* 49 (2) : 175-94.
<https://doi.org/10.1002/mnfr.200400071>.
- Stintzing, Florian C., Kirsten M. Herbach, Markus R. Mosshammer, Reinhold Carle, Weiguang Yi, Subramani Sellappan, Casimir C. Akoh, Ron Bunch, et Peter Felker. 2005. « Color, betalain

- pattern, and antioxidant properties of cactus pear (*Opuntia* spp.) clones ». *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53 (2) : 442-51. <https://doi.org/10.1021/jf048751y>.
- Stintzing, Florian C., Andreas Schieber, et Reinhold Carle. 1999. « Amino Acid Composition and Betaxanthin Formation in Fruits from *Opuntia ficus-indica* ». *Planta Medica* 65 (07) : 632-35. <https://doi.org/10.1055/s-1999-14037>.
- Stradowska, Tresa J. 2018. « [Peroxisomal disorders] ». *Postepy Biochemii* 64 (4) : 359-67. https://doi.org/10.18388/pb.2018_150.
- Streit, Wolfgang J., Qing-Shan Xue, Jasmin Tischer, et Ingo Bechmann. 2014. « Microglial pathology ». *Acta Neuropathologica Communications* 2 (septembre) : 142. <https://doi.org/10.1186/s40478-014-0142-6>.
- Su, Bao-Ning, Alison D. Pawlus, Hyun-Ah Jung, William J. Keller, Jerry L. McLaughlin, et A. Douglas Kinghorn. 2005. « Chemical constituents of the fruits of *Morinda citrifolia* (Noni) and their antioxidant activity ». *Journal of Natural Products* 68 (4) : 592-95. <https://doi.org/10.1021/np0495985>.
- Su, Jun-Feng, Chang-Jiang Guo, Jing-Yu Wei, Ji-Jun Yang, Yu-Gang Jiang, et Yun-Feng Li. 2003. « Protection against hepatic ischemia-reperfusion injury in rats by oral pretreatment with quercetin ». *Biomedical and environmental sciences: BES* 16 (1) : 1-8.
- Suk, KyoungHo. 2005. « Regulation of neuroinflammation by herbal medicine and its implications for neurodegenerative diseases. A focus on traditional medicines and flavonoids ». *Neuro-Signals* 14 (1-2) : 23-33. <https://doi.org/10.1159/000085383>.
- Sukhova, G. K., G. P. Shi, D. I. Simon, H. A. Chapman, et P. Libby. 1998. « Expression of the elastolytic cathepsins S and K in human atheroma and regulation of their production in smooth muscle cells ». *The Journal of Clinical Investigation* 102 (3) : 576-83. <https://doi.org/10.1172/JCI181>.
- Sul, Ok-Joo, et Seung Won Ra. 2021. « Quercetin Prevents LPS-Induced Oxidative Stress and Inflammation by Modulating NOX2/ROS/NF- κ B in Lung Epithelial Cells ». *Molecules (Basel, Switzerland)* 26 (22) : 6949. <https://doi.org/10.3390/molecules26226949>.
- Summers, William K., Roy L. Martin, Michael Cunningham, Velda L. DeBoynton, et Gary M. Marsh. 2010. « Complex antioxidant blend improves memory in community-dwelling seniors ». *Journal of Alzheimer's disease: JAD* 19 (2) : 429-39. <https://doi.org/10.3233/JAD-2010-1229>.
- Sun, Liqiang, En Li, Feng Wang, Tao Wang, Zhiping Qin, Shaohui Niu, et Chunguang Qiu. 2015. « Quercetin increases macrophage cholesterol efflux to inhibit foam cell formation through activating PPAR γ -ABCA1 pathway ». *International Journal of Clinical and Experimental Pathology* 8 (9) : 10854-60.
- Sun, Y., et L. W. Oberley. 1989. « The inhibition of catalase by glutathione ». *Free Radical Biology & Medicine* 7 (6) : 595-602. [https://doi.org/10.1016/0891-5849\(89\)90140-8](https://doi.org/10.1016/0891-5849(89)90140-8).
- Surace, Michael J., et Michelle L. Block. 2012. « Targeting microglia-mediated neurotoxicity: the potential of NOX2 inhibitors ». *Cellular and molecular life sciences: CMLS* 69 (14) : 2409-27. <https://doi.org/10.1007/s00018-012-1015-4>.
- Suzuki, Yasuyuki, Mizue Iai, Atsushi Kamei, Yuzo Tanabe, Shoichi Chida, Seiji Yamaguchi, Zhongyi Zhang, Yasuhiko Takemoto, Nobuyuki Shimozawa, et Naomi Kondo. 2002. « Peroxisomal acyl CoA oxidase deficiency ». *The Journal of Pediatrics* 140 (1) : 128-30. <https://doi.org/10.1067/mpd.2002.120511>.
- Sweeney, Melanie D., Zhen Zhao, Axel Montagne, Amy R. Nelson, et Berislav V. Zlokovic. 2019. « Blood-Brain Barrier: From Physiology to Disease and Back ». *Physiological Reviews* 99 (1) : 21-78. <https://doi.org/10.1152/physrev.00050.2017>.
- Szwajgier, Dominik, Kamila Borowiec, et Katarzyna Pustelniak. 2017. « The Neuroprotective Effects of Phenolic Acids: Molecular Mechanism of Action ». *Nutrients* 9 (5) : E477. <https://doi.org/10.3390/nu9050477>.

- Takahashi, Waka, Eizo Watanabe, Lisa Fujimura, Haruko Watanabe-Takano, Hiroyuki Yoshidome, Paul E. Swanson, Takeshi Tokuhisa, Shigeto Oda, et Masahiko Hatano. 2013. « Kinetics and protective role of autophagy in a mouse cecal ligation and puncture-induced sepsis ». *Critical Care (London, England)* 17 (4) : R160. <https://doi.org/10.1186/cc12839>.
- Takano, H., T. Nagai, M. Asakawa, T. Toyozaki, T. Oka, I. Komuro, T. Saito, et Y. Masuda. 2000. « Peroxisome proliferator-activated receptor activators inhibit lipopolysaccharide-induced tumor necrosis factor-alpha expression in neonatal rat cardiac myocytes ». *Circulation Research* 87 (7) : 596-602. <https://doi.org/10.1161/01.res.87.7.596>.
- Talaat, Roba, Waheba El-Sayed, Hussein S. Agwa, Amira M. Gamal-Eldeen, Shaden Moawia, et Magdy A. H. Zahran. 2015. « Anti-inflammatory effect of thalidomide dithiocarbamate and dithioate analogs ». *Chemico-Biological Interactions* 238 (août) : 74-81. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2015.05.017>.
- Tanaka, Y., G. Guhde, A. Suter, E. L. Eskelinen, D. Hartmann, R. Lüllmann-Rauch, P. M. Janssen, J. Blanz, K. von Figura, et P. Saftig. 2000. « Accumulation of autophagic vacuoles and cardiomyopathy in LAMP-2-deficient mice ». *Nature* 406 (6798) : 902-6. <https://doi.org/10.1038/35022595>.
- Tang, Jie, Ping Diao, Xiaohong Shu, Li Li, et Lidan Xiong. 2019. « Quercetin and Quercitrin Attenuates the Inflammatory Response and Oxidative Stress in LPS-Induced RAW264.7 Cells: In Vitro Assessment and a Theoretical Model ». *BioMed Research International* 2019 : 7039802. <https://doi.org/10.1155/2019/7039802>.
- Taoufik, F., S. Zine, M. El Hadek, L. M. Idrissi Hassani, S. Gharby, H. Harhar, et B. Matthäus. 2015. « Oil content and main constituents of cactus seed oils *Opuntia Ficus Indica* of different origin in Morocco ». *Mediterranean Journal of Nutrition and Metabolism* 8 (2) : 85-92. <https://doi.org/10.3233/MNM-150036>.
- Tawbeh, Ali, Catherine Gondcaille, et Doriane Trompier. 2021. « Peroxisomal ABC Transporters : An Update ».
- Terada, Kayo, Jun Yamada, Yoshinori Hayashi, Zhou Wu, Yasuo Uchiyama, Christoph Peters, et Hiroshi Nakanishi. 2010. « Involvement of cathepsin B in the processing and secretion of interleukin-1beta in chromogranin A-stimulated microglia ». *Glia* 58 (1) : 114-24. <https://doi.org/10.1002/glia.20906>.
- Tesoriere, Luisa, Daniela Butera, Anna Maria Pintaudi, Mario Allegra, et Maria A. Livrea. 2004. « Supplementation with cactus pear (*Opuntia ficus-indica*) fruit decreases oxidative stress in healthy humans: a comparative study with vitamin C ». *The American Journal of Clinical Nutrition* 80 (2) : 391-95. <https://doi.org/10.1093/ajcn/80.2.391>.
- Timur, Zehra Kevser, Secil Akyildiz Demir, et Volkan Seyrantepe. 2016. « Lysosomal Cathepsin A Plays a Significant Role in the Processing of Endogenous Bioactive Peptides ». *Frontiers in Molecular Biosciences* 3 : 68. <https://doi.org/10.3389/fmolb.2016.00068>.
- Toshniwal, P. K., et E. J. Zarling. 1992. « Evidence for increased lipid peroxidation in multiple sclerosis ». *Neurochemical Research* 17 (2) : 205-7. <https://doi.org/10.1007/BF00966801>.
- Trang, Tuan, Simon Beggs, et Michael W. Salter. 2012. « ATP receptors gate microglia signaling in neuropathic pain ». *Experimental Neurology* 234 (2) : 354-61. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2011.11.012>.
- Trivedi, Purvi C., Jordan J. Bartlett, et Thomas Pulnilkunnil. 2020. « Lysosomal Biology and Function: Modern View of Cellular Debris Bin ». *Cells* 9 (5) : E1131. <https://doi.org/10.3390/cells9051131>.
- Trompier, D., A. Vejux, A. Zarrouk, C. Gondcaille, F. Geillon, T. Nury, S. Savary, et G. Lizard. 2014. « Brain peroxisomes ». *Biochimie* 98 (mars) : 102-10. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2013.09.009>.
- Tsai, Kuen-Daw, Wei Chen, Sue-Hong Wang, Yu-Wei Hsiao, Jih-Ying Chi, Hsing-Yu Wu, Yi-Ju Lee, Ho-Yiu Wong, Min-Jen Tseng, et Ting-Hui Lin. 2014. « Downregulation of connective tissue growth factor by LPS/IFN-γ-induced nitric oxide is reversed by aristolochic acid treatment in glomerular

- mesangial cells via STAT-1 α and NF- κ B signaling ». *Chemico-Biological Interactions* 210 (mars) : 86-95. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2013.12.017>.
- Tsui-Pierchala, Brian A., Mario Encinas, Jeffrey Milbrandt, et Eugene M. Johnson. 2002. « Lipid rafts in neuronal signaling and function ». *Trends in Neurosciences* 25 (8) : 412-17. [https://doi.org/10.1016/s0166-2236\(02\)02215-4](https://doi.org/10.1016/s0166-2236(02)02215-4).
- Tucsek, Zsuzsanna, Balazs Radnai, Boglarka Racz, Balazs Debreceni, Janos K. Priber, Tamas Dolowschiak, Tamas Palkovics, Ferenc Gallyas, Balazs Sumegi, et Balazs Veres. 2011. « Suppressing LPS-induced early signal transduction in macrophages by a polyphenol degradation product: a critical role of MKP-1 ». *Journal of Leukocyte Biology* 89 (1) : 105-11. <https://doi.org/10.1189/jlb.0610355>.
- Turk, Vito, Veronika Stoka, Olga Vasiljeva, Miha Renko, Tao Sun, Boris Turk, et Dušan Turk. 2012. « Cysteine cathepsins: from structure, function and regulation to new frontiers ». *Biochimica Et Biophysica Acta* 1824 (1) : 68-88. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2011.10.002>.
- Turner, Mark D., Belinda Nedjai, Tara Hurst, et Daniel J. Pennington. 2014. « Cytokines and chemokines: At the crossroads of cell signalling and inflammatory disease ». *Biochimica Et Biophysica Acta* 1843 (11) : 2563-82. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2014.05.014>.
- Ulloa, Luis, et Kevin J. Tracey. 2005. « The "cytokine profile": a code for sepsis ». *Trends in Molecular Medicine* 11 (2) : 56-63. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2004.12.007>.
- Uzor, Ndidi-Ese, Louise D. McCullough, et Andrey S. Tsvetkov. 2020. « Peroxisomal Dysfunction in Neurological Diseases and Brain Aging ». *Frontiers in Cellular Neuroscience* 14 : 44. <https://doi.org/10.3389/fncel.2020.00044>.
- Vaes, Gilbert. 1966. « [87] Subcellular localization of glycosidases in lysosomes ». Dans *Methods in Enzymology*, 8 : 509-14. Complex Carbohydrates. Academic Press. [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(66\)08092-3](https://doi.org/10.1016/0076-6879(66)08092-3).
- Vafeiadou, K., D. Vauzour, et J. P. E. Spencer. 2007. « Neuroinflammation and its modulation by flavonoids ». *Endocrine, Metabolic & Immune Disorders Drug Targets* 7 (3) : 211-24. <https://doi.org/10.2174/187153007781662521>.
- Valente, Ana, Tânia Gonçalves Albuquerque, Ana Sanches-Silva, et Helena S. Costa. 2011. « Ascorbic acid content in exotic fruits: A contribution to produce quality data for food composition databases ». *Food Research International, Exotic Fruits: their Composition, Nutraceutical and Agroindustrial Potential*, 44 (7) : 2237-42. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2011.02.012>.
- Valerio, M. S., H. Minderman, T. Mace, et A. B. Awad. 2013. « β -Sitosterol modulates TLR4 receptor expression and intracellular MyD88-dependent pathway activation in J774A.1 murine macrophages ». *Cellular Immunology* 285 (1-2) : 76-83. <https://doi.org/10.1016/j.cellimm.2013.08.007>.
- Valko, M., H. Morris, et M. T. D. Cronin. 2005. « Metals, toxicity and oxidative stress ». *Current Medicinal Chemistry* 12 (10) : 1161-1208. <https://doi.org/10.2174/0929867053764635>.
- Valko, M., C. J. Rhodes, J. Moncol, M. Izakovic, et M. Mazur. 2006. « Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer ». *Chemico-Biological Interactions* 160 (1) : 1-40. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2005.12.009>.
- Vamecq, Joseph, Pierre Andreoletti, Riad El Kebbjaj, Fatima-Ezzahra Saih, Norbert Latruffe, M' Hamed Saïd El Kebbjaj, Gérard Lizard, Boubker Nasser, et Mustapha Cherkaoui-Malki. 2018. « 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 ». *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 2018 : 6986984. <https://doi.org/10.1155/2018/6986984>.
- Van den Worm, E., C. J. Beukelman, A. J. Van den Berg, B. H. Kroes, R. P. Labadie, et H. Van Dijk. 2001. « Effects of methoxylation of apocynin and analogs on the inhibition of reactive oxygen species

- production by stimulated human neutrophils ». *European Journal of Pharmacology* 433 (2-3) : 225-30. [https://doi.org/10.1016/s0014-2999\(01\)01516-3](https://doi.org/10.1016/s0014-2999(01)01516-3).
- Vancompernelle, K., F. Van Herreweghe, G. Pynaert, M. Van de Craen, K. De Vos, N. Totty, A. Sterling, W. Fiers, P. Vandenabeele, et J. Grooten. 1998. « Atractyloside-induced release of cathepsin B, a protease with caspase-processing activity ». *FEBS letters* 438 (3) : 150-58. [https://doi.org/10.1016/s0014-5793\(98\)01275-7](https://doi.org/10.1016/s0014-5793(98)01275-7).
- Varanasi, U., R. Chu, S. Chu, R. Espinosa, M. M. LeBeau, et J. K. Reddy. 1994. « Isolation of the human peroxisomal acyl-CoA oxidase gene: organization, promoter analysis, and chromosomal localization ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91 (8) : 3107-11. <https://doi.org/10.1073/pnas.91.8.3107>.
- Varfolomeev, Eugene, et Domagoj Vucic. 2018. « Intracellular regulation of TNF activity in health and disease ». *Cytokine* 101 (janvier) : 26-32. <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2016.08.035>.
- Vasko, Radovan, et Michael S. Goligorsky. 2013. « Dysfunctional lysosomal autophagy leads to peroxisomal oxidative burnout and damage during endotoxin-induced stress ». *Autophagy* 9 (3) : 442-44. <https://doi.org/10.4161/auto.23344>.
- Vauzour, David. 2014. « Effect of flavonoids on learning, memory and neurocognitive performance: relevance and potential implications for Alzheimer's disease pathophysiology ». *Journal of the Science of Food and Agriculture* 94 (6) : 1042-56. <https://doi.org/10.1002/jsfa.6473>.
- Veerhuis, Robert, Henrietta M. Nielsen, et Andrea J. Tenner. 2011. « Complement in the brain ». *Molecular Immunology* 48 (14) : 1592-1603. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2011.04.003>.
- Venkatesan, Balachandar, Lenin Mahimainathan, Falguni Das, Nandini Ghosh-Choudhury, et Goutam Ghosh Choudhury. 2007. « Downregulation of catalase by reactive oxygen species via PI 3 kinase/Akt signaling in mesangial cells ». *Journal of Cellular Physiology* 211 (2) : 457-67. <https://doi.org/10.1002/jcp.20953>.
- Vinayaga Moorthi, R., Zachariah Bobby, N. Selvaraj, et M. G. Sridhar. 2006. « Vitamin E protects the insulin sensitivity and redox balance in rat L6 muscle cells exposed to oxidative stress ». *Clinica Chimica Acta; International Journal of Clinical Chemistry* 367 (1-2) : 132-36. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2005.12.004>.
- Vishwanath, Vijay A. 2016. « Fatty Acid Beta-Oxidation Disorders: A Brief Review ». *Annals of Neurosciences* 23 (1) : 51-55. <https://doi.org/10.1159/000443556>.
- Vizovišek, Matej, Marko Fonović, et Boris Turk. 2019. « Cysteine cathepsins in extracellular matrix remodeling: Extracellular matrix degradation and beyond ». *Matrix Biology: Journal of the International Society for Matrix Biology* 75-76 (janvier) : 141-59. <https://doi.org/10.1016/j.matbio.2018.01.024>.
- Vluggens, Aurore, Pierre Andreoletti, Navin Viswakarma, Yuzhi Jia, Kojiro Matsumoto, Wim Kulik, Mushfiquddin Khan, et al. 2010. « Reversal of mouse Acyl-CoA oxidase 1 (ACOX1) null phenotype by human ACOX1b isoform [corrected] ». *Laboratory Investigation; a Journal of Technical Methods and Pathology* 90 (5) : 696-708. <https://doi.org/10.1038/labinvest.2010.46>.
- Walker, J. M. 1994. « The biconchonic acid (BCA) assay for protein quantitation ». *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)* 32 : 5-8. <https://doi.org/10.1385/0-89603-268-X:5>.
- Wanders, Ronald J. A., Jos P. N. Ruiten, Lodewijk IJLst, Hans R. Waterham, et Sander M. Houten. 2010. « The enzymology of mitochondrial fatty acid beta-oxidation and its application to follow-up analysis of positive neonatal screening results ». *Journal of Inherited Metabolic Disease* 33 (5) : 479-94. <https://doi.org/10.1007/s10545-010-9104-8>.
- Wanders, Ronald J. A., et Hans R. Waterham. 2006. « Biochemistry of mammalian peroxisomes revisited ». *Annual Review of Biochemistry* 75 : 295-332. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.74.082803.133329>.

- Wang, C., L. Deng, M. Hong, G. R. Akkaraju, J. Inoue, et Z. J. Chen. 2001. « TAK1 is a ubiquitin-dependent kinase of MKK and IKK ». *Nature* 412 (6844) : 346-51. <https://doi.org/10.1038/35085597>.
- Wang, Guangming, et Shobu Namura. 2011. « Effects of chronic systemic treatment with peroxisome proliferator-activated receptor α activators on neuroinflammation induced by intracerebral injection of lipopolysaccharide in adult mice ». *Neuroscience Research* 70 (2) : 230-37. <https://doi.org/10.1016/j.neures.2011.02.001>.
- Wang, Jing, Hui-Min Gong, Hui-Hui Zou, Ling Liang, et Xin-Yi Wu. 2018. « Isorhamnetin prevents H₂O₂-induced oxidative stress in human retinal pigment epithelial cells ». *Molecular Medicine Reports* 17 (1) : 648-52. <https://doi.org/10.3892/mmr.2017.7916>.
- Wang, Zheng, Jia-Peng Xu, Yong-Chao Zheng, Wei Chen, Yong-Wei Sun, Zhi-Yong Wu, et Meng Luo. 2011. « Peroxisome proliferator-activated receptor gamma inhibits hepatic fibrosis in rats ». *Hepatobiliary & pancreatic diseases international: HBPD INT* 10 (1) : 64-71. [https://doi.org/10.1016/s1499-3872\(11\)60009-x](https://doi.org/10.1016/s1499-3872(11)60009-x).
- Wattiaux, R., S. Wattiaux-De Coninck, M. F. Ronveaux-dupal, et F. Dubois. 1978. « Isolation of rat liver lysosomes by isopycnic centrifugation in a metrizamide gradient ». *The Journal of Cell Biology* 78 (2) : 349-68. <https://doi.org/10.1083/jcb.78.2.349>.
- Wattiaux, Robert, Simone Wattiaux-de Coninck, Jacqueline Thirion, Mañe-Christine Gasingirwa, et Michel Jadot. 2007. « Lysosomes and Fas-mediated liver cell death ». *The Biochemical Journal* 403 (1) : 89-95. <https://doi.org/10.1042/BJ20061738>.
- Wei, Liu, Fu YuJie, Zu YuanGang, Tong MeiHong, Wu Nan, Liu XiaoLei, et Zhang Su. 2009. « Supercritical carbon dioxide extraction of seed oil from *Opuntia dillenii* Haw. and its antioxidant activity. » *Food Chemistry* 114 (1) : 334-39.
- Weinhofer, Isabelle, Bettina Zierfuss, Simon Hametner, Magdalena Wagner, Niko Popitsch, Christian Machacek, Barbara Bartolini, et al. 2018. « Impaired plasticity of macrophages in X-linked adrenoleukodystrophy ». *Brain: A Journal of Neurology* 141 (8) : 2329-42. <https://doi.org/10.1093/brain/awy127>.
- Weng, X. C., et W. Wang. 2000. « Antioxidant activity of compounds isolated from *Salvia plebeia* ». *Food Chemistry* 71 (4) : 489-93. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(00\)00191-6](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(00)00191-6).
- Wie, Myung-Bok. 2000. « Protective Effects of *Opuntia Ficus-Indica* and *Saururus Chinensis* on Free Radical-Induced Neuronal Injury in Mouse Cortical Cell Cultures ». *YAKHAK HOEJI* 44 (6) : 613-19.
- Wink, David A., Harry B. Hines, Robert Y. S. Cheng, Christopher H. Switzer, Wilmarie Flores-Santana, Michael P. Vitek, Lisa A. Ridnour, et Carol A. Colton. 2011. « Nitric oxide and redox mechanisms in the immune response ». *Journal of Leukocyte Biology* 89 (6) : 873-91. <https://doi.org/10.1189/jlb.1010550>.
- Wit, Maryna de, Arno Hugo, et Nokuthula Shongwe. 2018. « South African Cactus Pear Seed Oil: A Comprehensive Study on 42 Spineless Burbank *Opuntia ficus-indica* and *Opuntia robusta* Cultivars ». *European Journal of Lipid Science and Technology* 120 (3) : 1700343. <https://doi.org/10.1002/ejlt.201700343>.
- Wit, Maryna de, Arno Hugo, Nokuthula Shongwe, et Rouxlene van der Merwe. 2016. « Effect of cultivar, season and locality on lipid content and fatty acid composition of cactus pear seed oil ». *South African Journal of Plant and Soil* 33 (4) : 279-88. <https://doi.org/10.1080/02571862.2016.1141335>.
- Wolf, Susanne A., H. W. G. M. Boddeke, et Helmut Kettenmann. 2017. « Microglia in Physiology and Disease ». *Annual Review of Physiology* 79 (février) : 619-43. <https://doi.org/10.1146/annurev-physiol-022516-034406>.
- Woo, Kyung Jin, et Taeg Kyu Kwon. 2007. « Sulforaphane suppresses lipopolysaccharide-induced cyclooxygenase-2 (COX-2) expression through the modulation of multiple targets in COX-2 gene

- promoter ». *International Immunopharmacology* 7 (13) : 1776-83.
<https://doi.org/10.1016/j.intimp.2007.09.018>.
- Wu, Q. D., J. H. Wang, F. Fennessy, H. P. Redmond, et D. Bouchier-Hayes. 1999. « Taurine prevents high-glucose-induced human vascular endothelial cell apoptosis ». *The American Journal of Physiology* 277 (6) : C1229-1238. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.1999.277.6.C1229>.
- Wu, Shih-Lu, Jaw-Chyun Chen, Chia-Cheng Li, Hsin-Yi Lo, Tin-Yun Ho, et Chien-Yun Hsiang. 2009. « Vanillin improves and prevents trinitrobenzene sulfonic acid-induced colitis in mice ». *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 330 (2) : 370-76.
<https://doi.org/10.1124/jpet.109.152835>.
- Wu, Yuqin, Lin Fan, Yun Wang, Jing Ding, et Rongfu Wang. 2021. « Isorhamnetin Alleviates High Glucose-Aggravated Inflammatory Response and Apoptosis in Oxygen-Glucose Deprivation and Reoxygenation-Induced HT22 Hippocampal Neurons Through Akt/SIRT1/Nrf2/HO-1 Signaling Pathway ». *Inflammation* 44 (5) : 1993-2005. <https://doi.org/10.1007/s10753-021-01476-1>.
- Wynick, Christopher, Carlene Petes, Alexander Tigert, et Katrina Gee. 2016. « Lipopolysaccharide-Mediated Induction of Concurrent IL-1 β and IL-23 Expression in THP-1 Cells Exhibits Differential Requirements for Caspase-1 and Cathepsin B Activity ». *Journal of Interferon & Cytokine Research: The Official Journal of the International Society for Interferon and Cytokine Research* 36 (8) : 477-87. <https://doi.org/10.1089/jir.2015.0134>.
- Xaus, J., M. Comalada, A. F. Valledor, J. Lloberas, F. López-Soriano, J. M. Argilés, C. Bogdan, et A. Celada. 2000. « LPS induces apoptosis in macrophages mostly through the autocrine production of TNF-alpha ». *Blood* 95 (12) : 3823-31.
- Xu, Sherry L., Roy C. Y. Choi, Kevin Y. Zhu, Ka-Wing Leung, Ava J. Y. Guo, Dan Bi, Hong Xu, David T. W. Lau, Tina T. X. Dong, et Karl W. K. Tsim. 2012. « Isorhamnetin, A Flavonol Aglycone from Ginkgo biloba L., Induces Neuronal Differentiation of Cultured PC12 Cells: Potentiating the Effect of Nerve Growth Factor ». *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine: eCAM* 2012 : 278273. <https://doi.org/10.1155/2012/278273>.
- Xu, Su, David E. Sleat, Michel Jadot, et Peter Lobel. 2010. « Glial fibrillary acidic protein is elevated in the lysosomal storage disease classical late-infantile neuronal ceroid lipofuscinosis, but is not a component of the storage material ». *The Biochemical Journal* 428 (3) : 355-62.
<https://doi.org/10.1042/BJ20100128>.
- Xu, Yan, Chun Tang, Shengyu Tan, Juan Duan, Hongmei Tian, et Yu Yang. 2020. « Cardioprotective effect of isorhamnetin against myocardial ischemia reperfusion (I/R) injury in isolated rat heart through attenuation of apoptosis ». *Journal of Cellular and Molecular Medicine* 24 (11) : 6253-62. <https://doi.org/10.1111/jcmm.15267>.
- Xue, Yansong, Min Du, et Mei-Jun Zhu. 2017. « Quercetin suppresses NLRP3 inflammasome activation in epithelial cells triggered by Escherichia coli O157:H7 ». *Free Radical Biology & Medicine* 108 (juillet) : 760-69. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2017.05.003>.
- Yan, Xuan, Dian-Feng Liu, Xiang-Yang Zhang, Dong Liu, Shi-Yao Xu, Guang-Xin Chen, Bing-Xu Huang, et al. 2017. « Vanillin Protects Dopaminergic Neurons against Inflammation-Mediated Cell Death by Inhibiting ERK1/2, P38 and the NF- κ B Signaling Pathway ». *International Journal of Molecular Sciences* 18 (2) : E389. <https://doi.org/10.3390/ijms18020389>.
- Yang, Bo, Xiao-Ping Li, Yun-Feng Ni, Hong-Yin Du, Rong Wang, Ming-Jiang Li, Wen-Chen Wang, et al. 2016. « Protective Effect of Isorhamnetin on Lipopolysaccharide-Induced Acute Lung Injury in Mice ». *Inflammation* 39 (1) : 129-37. <https://doi.org/10.1007/s10753-015-0231-0>.
- Yeddes, Nizar, Jamila Kalthoum Chérif, Amel Jrad, Danielle Barth, et Malika Trabelsi-Ayadi. 2012. « Supercritical SC-CO₂ and Soxhlet n-Hexane Extract of Tunisian Opuntia ficus indica Seeds and Fatty Acids Analysis ». *Journal of Lipids* 2012 : 914693. <https://doi.org/10.1155/2012/914693>.

- Yeh, Felix L., David V. Hansen, et Morgan Sheng. 2017. « TREM2, Microglia, and Neurodegenerative Diseases ». *Trends in Molecular Medicine* 23 (6) : 512-33. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2017.03.008>.
- Yoo, Guijae, Youngse Oh, Heejung Yang, Tae Bum Kim, Sang Hyun Sung, et Seung Hyun Kim. 2018. « Efficient preparation of narcissin from *Opuntia ficus-indica* fruits by combination of response surface methodology and high-speed countercurrent chromatography ». *Pharmacognosy Magazine* 14 (56) : 338. https://doi.org/10.4103/pm.pm_422_17.
- Yoon, Jin Sook, Min Kyung Chae, Sang Yeul Lee, et Eun Jig Lee. 2012. « Anti-inflammatory effect of quercetin in a whole orbital tissue culture of Graves' orbitopathy ». *The British Journal of Ophthalmology* 96 (8) : 1117-21. <https://doi.org/10.1136/bjophthalmol-2012-301537>.
- Young, I. S., et J. V. Woodside. 2001. « Antioxidants in health and disease ». *Journal of Clinical Pathology* 54 (3) : 176-86. <https://doi.org/10.1136/jcp.54.3.176>.
- Yu, X. X., J. K. Drackley, J. Odle, et X. Lin. 1997. « Response of hepatic mitochondrial and peroxisomal beta-oxidation to increasing palmitate concentrations in piglets ». *Biology of the Neonate* 72 (5) : 284-92. <https://doi.org/10.1159/000244495>.
- Zaidi, Nousheen, Andreas Maurer, Sebastian Nieke, et Hubert Kalbacher. 2008. « Cathepsin D: a cellular roadmap ». *Biochemical and Biophysical Research Communications* 376 (1) : 5-9. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2008.08.099>.
- Zelcer, Noam, et Peter Tontonoz. 2006. « Liver X receptors as integrators of metabolic and inflammatory signaling ». *The Journal of Clinical Investigation* 116 (3) : 607-14. <https://doi.org/10.1172/JCI27883>.
- Zhang, Chaojie, Xiang Li, Lurong Lian, Qiukan Chen, Osheiza Abdulmalik, Vasco Vassilev, Ching-San Lai, et Toshio Asakura. 2004. « Anti-sickling effect of MX-1520, a prodrug of vanillin: an in vivo study using rodents ». *British Journal of Haematology* 125 (6) : 788-95. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2141.2004.04892.x>.
- Zhang, Feng, Desong Kong, Yin Lu, et Shizhong Zheng. 2013. « Peroxisome proliferator-activated receptor- γ as a therapeutic target for hepatic fibrosis: from bench to bedside ». *Cellular and molecular life sciences: CMLS* 70 (2) : 259-76. <https://doi.org/10.1007/s00018-012-1046-x>.
- Zhang, Guolong, et Sankar Ghosh. 2002. « Negative regulation of toll-like receptor-mediated signaling by Tollip ». *The Journal of Biological Chemistry* 277 (9) : 7059-65. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109537200>.
- Zhang, Min, Samuel J. Kenny, Liang Ge, Ke Xu, et Randy Schekman. 2015. « Translocation of interleukin-1 β into a vesicle intermediate in autophagy-mediated secretion ». *ELife* 4 (novembre) : e11205. <https://doi.org/10.7554/eLife.11205>.
- Zhang, Shuai, Yan Qi, Youwei Xu, Xu Han, Jinyong Peng, Kexin Liu, et C. K. Sun. 2013. « Protective effect of flavonoid-rich extract from *Rosa laevigata* Michx on cerebral ischemia-reperfusion injury through suppression of apoptosis and inflammation ». *Neurochemistry International* 63 (5) : 522-32. <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2013.08.008>.
- Zhang, Xuan, Yijia Jia, Yanli Ma, Guiguang Cheng, et Shengbao Cai. 2018. « Phenolic Composition, Antioxidant Properties, and Inhibition toward Digestive Enzymes with Molecular Docking Analysis of Different Fractions from *Prinsepia utilis* Royle Fruits ». *Molecules (Basel, Switzerland)* 23 (12) : E3373. <https://doi.org/10.3390/molecules23123373>.
- Zhang, Yao, Lijuan Zhao, Xiaojiang Guo, Chao Li, Haizhen Li, Hongxiang Lou, et Dongmei Ren. 2016. « Chemical constituents from *Phyllanthus emblica* and the cytoprotective effects on H₂O₂-induced PC12 cell injuries ». *Archives of Pharmacal Research* 39 (9) : 1202-11. <https://doi.org/10.1007/s12272-014-0433-2>.
- Zhang, Yu, Ming Gu, Wujie Cai, Lijing Yu, Li Feng, Lu Zhang, Qingqing Zang, et al. 2016. « Dietary component isorhamnetin is a PPAR γ antagonist and ameliorates metabolic disorders induced by

- diet or leptin deficiency ». *Scientific Reports* 6 (janvier) : 19288.
<https://doi.org/10.1038/srep19288>.
- Zhang, Yueming, Xiaoyu Qu, Huan Gao, Jinghui Zhai, Lina Tao, Jingmeng Sun, Yanqing Song, et Jie Zhang. 2020. « Quercetin attenuates NLRP3 inflammasome activation and apoptosis to protect INH-induced liver injury via regulating SIRT1 pathway ». *International Immunopharmacology* 85 (août) : 106634. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2020.106634>.
- Zhao, Lei, Z. Varghese, J. F. Moorhead, Yaxi Chen, et Xiong Z. Ruan. 2018. « CD36 and lipid metabolism in the evolution of atherosclerosis ». *British Medical Bulletin* 126 (1) : 101-12.
<https://doi.org/10.1093/bmb/ldy006>.
- Zhong, Jian, et John M. Kyriakis. 2007. « Dissection of a signaling pathway by which pathogen-associated molecular patterns recruit the JNK and p38 MAPKs and trigger cytokine release ». *The Journal of Biological Chemistry* 282 (33) : 24246-54. <https://doi.org/10.1074/jbc.M703422200>.
- Zhou, Di, Hongyan Wei, Zhe Jiang, Xuezheng Li, Kun Jiao, Xiaoguang Jia, Yue Hou, et Ning Li. 2017. « Natural potential neuroinflammatory inhibitors from *Alhagi sparsifolia* Shap ». *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 27 (4) : 973-78. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2016.12.075>.
- Zhu, Tao, Wei Zhang, She-Jun Feng, et Hua-Peng Yu. 2016. « Emodin suppresses LPS-induced inflammation in RAW264.7 cells through a PPAR γ -dependent pathway ». *International Immunopharmacology* 34 (mai) : 16-24. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2016.02.014>.
- Zhu, Y., K. Alvares, Q. Huang, M. S. Rao, et J. K. Reddy. 1993. « Cloning of a new member of the peroxisome proliferator-activated receptor gene family from mouse liver ». *The Journal of Biological Chemistry* 268 (36) : 26817-20.
- Zimmermann, Maya, Andrea Koreck, Norbert Meyer, Tomasz Basinski, Flurina Meiler, Burgler Simone, Stefan Woehrl, et al. 2011. « TNF-like weak inducer of apoptosis (TWEAK) and TNF- α cooperate in the induction of keratinocyte apoptosis ». *The Journal of Allergy and Clinical Immunology* 127 (1) : 200-207, 207.e1-10. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2010.11.005>.
- Zito, Pietro, Maurizio Sajeve, Maurizio Bruno, Sergio Rosselli, Antonella Maggio, et Felice Senatore. 2013. « Essential oils composition of two Sicilian cultivars of *Opuntia ficus-indica* (L.) Mill. (Cactaceae) fruits (prickly pear) ». *Natural Product Research* 27 (14) : 1305-14.
<https://doi.org/10.1080/14786419.2012.734823>.
- Zolezzi, Juan M., Manuel J. Santos, Sussy Bastías-Candia, Claudio Pinto, Juan A. Godoy, et Nibaldo C. Inestrosa. 2017. « PPARs in the central nervous system: roles in neurodegeneration and neuroinflammation ». *Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society* 92 (4) : 2046-69. <https://doi.org/10.1111/brv.12320>.
- Zou, Da-ming, Molly Brewer, Francisco Garcia, Jean M. Feugang, Jian Wang, Rongyu Zang, Huaguang Liu, et Changping Zou. 2005. « Cactus pear: a natural product in cancer chemoprevention ». *Nutrition Journal* 4 (septembre) : 25. <https://doi.org/10.1186/1475-2891-4-25>.