

**MINISTERE DE LA JEUNESSE, DE L'EDUCATION NATIONALE
ET DE LA RECHERCHE**

ECOLE PRATIQUE DES HAUTES ETUDES

Sciences de la Vie et de la Terre

MEMOIRE

présenté par

M. Jaoued ET TAOUIL

pour l'obtention du

Diplôme de l'Ecole Pratique des Hautes Etudes (EPHE)

Titre :

**ANALYSE FONCTIONNELLE
DE LA PROTEINE ALDRP :
CREATION D'UN MODELE CELLULAIRE D'ETUDE ET
CARACTERISATION D'UN ANTICORPS SPECIFIQUE**

Présenté et soutenu le Vendredi 10 Juin 2005 devant le jury composé de :

Mme Sylvie DEMIGNOT (Dr., Université Pierre et Marie Curie)	Présidente
M. Ali BETTAIEB (Pr., Université de Bourgogne)	Rapporteur
M. Yannick HAMON (Dr., Université de la Méditerranée)	Examineur
M. Stéphane SAVARY (Dr., Université de Bourgogne)	Examineur
M. Maurice BUGAUT (Pr., Université de Bourgogne)	(À titre posthume)

Laboratoire d'accueil :

Laboratoire de Biologie Moléculaire et Cellulaire (L.B.M.C)
Faculté des Sciences Gabriel
6, Boulevard Gabriel 21000 Dijon
E-mail du Dr. Stéphane Savary : stsavary@u-bourgogne.fr

Directeur : Pr. Norbert Latruffe

Laboratoire EPHE :

Laboratoire d'Immunologie et Immunothérapie des Cancers
Faculté de Médecine
7, Boulevard Jeanne d'Arc 21000 Dijon
E-mail du Pr. Ali Bettaieb : Ali.bettaieb@u-bourgogne.fr

Directeur : Pr. Jean-François Jeannin

**ECOLE PRATIQUE DES HAUTES ETUDES
SCIENCES DE LA VIE ET DE LA TERRE**

ANALYSE FONCTIONNELLE DE LA PROTEINE ALDRP : CREATION D'UN MODELE CELLULAIRE D'ETUDE ET CARACTERISATION D'UN ANTICORPS SPECIFIQUE

Présenté le 10 Juin 2005 par M. Jaoued ET TAOUIL

Résumé

L'adrénoleucodystrophie liée au chromosome X ou X-ALD est une maladie génétique rare, peroxysomiale et neurodégénérative. Elle résulte de mutations au niveau du gène *ABCD1* qui code pour un hémitransporteur ABC de la membrane peroxysomiale appelé ALDP, qui est supposé être impliqué dans le transport des acides gras à très longue chaîne ($C > 22$) dans la matrice peroxysomiale pour leur dégradation par β -oxydation. L'X-ALD est une pathologie neurodégénérative évolutive qui se traduit par une démyélinisation progressive du système nerveux central, une insuffisance surrénalienne et des atteintes testiculaires. D'un point de vue biochimique, elle se caractérise par une déficience de la β -oxydation peroxysomiale des acides gras à très longue chaîne ayant pour conséquence une accumulation plasmatique et tissulaire de ces acides gras. Il n'existe actuellement aucune thérapie satisfaisante.

Au laboratoire, un intérêt particulier est porté à un autre hémitransporteur ABC peroxysomial, l'ALDRP, codé par le gène *ABCD2*, dont la très forte homologie avec l'ALDP laisse pressentir un rôle voisin dans le transport des acides gras à très longue chaîne à travers la membrane du peroxysome. La redondance fonctionnelle partielle du gène *ABCD2* avec *ABCD1* laisse espérer une thérapie basée sur la surexpression pharmacologique du gène *ABCD2* afin de pallier la déficience du gène *ABCD1*.

Dans le cadre de l'étude de la régulation et de la fonction du gène *ABCD2*, mon travail a consisté à mettre au point l'utilisation d'outils qui permettront dans une stratégie à long terme l'étude de la fonction de l'ALDRP. J'ai participé à la première étape de l'établissement d'un modèle cellulaire capable de surexprimer la protéine de fusion ALDRP-EGFP normale ou mutée de façon stable et de manière contrôlée (Système Tet-On, Clontech). J'ai été également chargé de valider les constructions plasmidiques utilisées pour l'obtention de ces modèles cellulaires.

J'ai montré la capacité des séquences *Abcd2-EGFP* normale et mutée à être traduites et exprimées correctement au niveau du compartiment peroxysomial. La fusion avec l'EGFP ne perturbe donc pas l'expression de la protéine normale et mutée. Enfin, j'ai eu en charge la mise au point des conditions d'utilisation d'un nouvel anticorps dirigé contre l'ALDRP qui permettra d'une part de valider ces lignées cellulaires modifiées et d'autre part d'étudier la fonction et l'expression de l'ALDRP. L'anticorps polyclonal de lapin anti-ALDRP de rat fonctionne en immunoprécipitation et en immunofluorescence mais pas en Western Blotting.

Mots clefs

Adrénoleucodystrophie liée au chromosome X (X-ALD), peroxysome, transporteurs ABC, ALDRP, transfectants stables, anticorps.

TABLE DES MATIERES

[ABREVIATIONS](#) 5

I- L'adréno-leucodystrophie liée au chromosome X (ou X-ALD), une pathologie du peroxysome **6****1. Les différentes caractéristiques du peroxysome et sa biogenèse** **6****2. L'adressage des protéines vers le peroxysome** **7**2-1. L'importation des protéines matricielles **7**2-2. L'importation des protéines de la membrane et la prolifération peroxysomiale **7****3. Les principales fonctions métaboliques du peroxysome** **8****4. La β -oxydation des acides gras à très longue chaîne** **10****5. Les caractéristiques biochimiques de l'X-ALD** **10*****II- Une pathologie neurodégénérative évolutive*** **11****1. Les principales formes cliniques** **11****2. L'origine des symptômes** **12****3. Méthodes de diagnostic biologique de la maladie** **12*****III- Une pathologie héréditaire*** **13****1. le gène impliqué dans l'X-ALD** **13****2. ABCD1 code pour un hémitransporteur ABC peroxysomial** **13**2-1. Structure et fonctions des transporteurs ABC **13**2-2. Les transporteurs ABC humains **14**2-3. Les transporteurs ABC peroxysomiaux **14**2-3-1. ALDRP **15**2-3-2. PMP70 **15**2-3-3. PMP69 **15**2-4. Redondance fonctionnelle partielle des transporteurs ABC peroxysomiaux **16*****IV- Les différentes voies thérapeutiques de l'X-ALD*** **16****1. La greffe de moelle osseuse** **16****2. L'huile de Lorenzo** **17****3. La thérapie génique cellulaire** **17****4. La thérapie pharmacologique de gène** **17*****REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES*** **19****ABREVIATIONS**

ABC : « ATP binding cassette » ou cassette de liaison à l'ATP

AG : Acide(s) gras

AGLC : Acide(s) gras à longue chaîne

AGTLC : Acide(s) gras à très longue chaîne

ALD : « Adrenoleukodystrophy gene » ou *ABCD1*
ALDP : « Adrenoleukodystrophy protein »
ALDR : « Adrenoleukodystrophy-related gene » ou *ABCD2*
ALDRP : « Adrenoleukodystrophy-related protein »
AMN : « Adrenomyeloneuropathy »
ATP : « Adenosine triphosphate »
ATS : « Active transport signature »
BHE : Barrière hémato-encéphalique
C: nombre d'atomes de carbone
CoA : Coenzyme A
FAD : « Flavine adenine dinucleotide »
Fibrate : « Phenoxyisobutyrate »
iNOS : « Inductible nitric oxide synthase » ou NO synthase inductible
NAD : « Nicotinamide adenine dinucleotide »
NOD : « Non obese diabetic »
PBA : « Sodium 4-phenylbutyrate »
PEX : « Peroxine »
PEX : « Peroxine gene »
PMP : Protéine(s) de la membrane peroxysomiale
PMP69 : PMP de 69 kDa codée par *ABCD4*
PMP70 : PMP de 70 kDa codée par *ABCD3*
PP: Proliférateurs de peroxysomes
PTS : « Peroxisomal targeting signal »
RE : Reticulum endoplasmique
SCID : « Severe combined immune deficiency »
SNC : Système nerveux central
TM : « Transmembranaire domain »
TPR : « Tetratricopeptide repeat »
TRE : « Tetracycline response element »
VLCS: « Very long-chain fatty acid CoA synthetase » ou Acyl-CoA synthétase spécifique des AGTLC
X-ALD : Adrenoleucodystrophie liée au chromosome X
ZS : syndrome de Zellweger

INTRODUCTION

I- L'adrénoleucodystrophie liée au chromosome X (ou X-ALD), une pathologie du peroxysome

L'X-ALD est une maladie génétique rare à transmission autosomique récessive. Elle est transmise par les femmes et touche essentiellement les enfants de sexe masculin à raison de 1 sur 17000 naissances (<http://www3.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/dispmim.cgi?id=300100>). Il s'agit de la plus

fréquente des maladies peroxysomiales.

1. Les différentes caractéristiques du peroxysome et sa biogenèse

Les peroxysomes sont des organites cytoplasmiques présents dans les cellules animales mais également dans les cellules végétales et sont dans ce cas appelés glyoxysomes (siège du cycle du glyoxylate). Ces organites diffèrent des chloroplastes et des mitochondries par plusieurs aspects. Par exemple, ils ne contiennent ni ADN ni ribosomes. Les peroxysomes sont délimités par une membrane simple qui isole du cytosol une matrice finement granulaire dans laquelle baignent souvent des inclusions à structure cristalline denses aux électrons. Cette structure, renferme un corps cristallin, appelé noyau cristalloïde ou nucléoïde. De forme sphérique ou ovoïde, ces petits organites ont une taille variable, selon l'organisme et l'organe considéré, pouvant aller de 0,2 à 1,5 μm de diamètre. Leur nombre, leur taille, leur composition biochimique ainsi que leur contenu enzymatique varient en fonction du type de cellule et des conditions environnementales.

La biogenèse des peroxysomes est régulée par au moins 23 peroxines (protéines peroxysomiales ou PEX), codées par les gènes *PEX*. La principale voie de biogenèse des peroxysomes a été décrite par Lazarow et Fujiki qui proposèrent le modèle de croissance et division, dans lequel les peroxysomes bourgeonnent à partir de peroxysomes préexistants (*Lazarow et Fujiki, 1985*). Néanmoins, elle est sujette à des discussions (*Brown and Baker, 2003*). En effet, les premières observations en microscopie électronique ont laissé supposer que les peroxysomes étaient issus du bourgeonnement du réticulum endoplasmique (RE). Cette hypothèse n'a pas été confirmée mais ne doit pas être négligée (*Tabak, et al., 2003*). L'existence d'un compartiment vésiculaire pré-peroxysomial qui proviendrait de la membrane nucléaire a également été supposée (*Faber et al., 2002*). Le processus de biogenèse des peroxysomes peut être séparé en 3 événements majeurs : A) la synthèse des membranes peroxysomiales qui a lieu dans le RE et l'importation des protéines membranaires ; B) l'importation des protéines matricielles ; C) la croissance et la multiplication des organites (*Terlecky et Fransen, 2000*).

2. L'adressage des protéines vers le peroxysome

2-1. L'importation des protéines matricielles

Les peroxysomes sont dépourvus d'ADN contrairement aux mitochondries et ne disposent pas d'une machinerie de synthèse protéique indépendante. Toutes les protéines destinées aux peroxysomes (plus d'une cinquantaine) sont donc codées par le génome nucléaire, synthétisées dans le cytosol par les ribosomes libres et importées dans le peroxysome après leur traduction. Le système d'importation des protéines membranaires est distinct de celui des protéines matricielles. Dans les protéines matricielles, il existe des signaux d'adressage appelés « Peroxisomal targeting signal » (PTS) reconnus par des récepteurs spécifiques et qui permettent leur translocation vers la matrice (*Terlecky et Fransen, 2000*). Pour la plupart des protéines de la matrice peroxysomiale, le signal

d'adressage est une simple séquence tripeptidique carboxy-terminale appelée PTS1 dont la séquence consensus est (S/A/C)(K/R/H)(L/M) (*Lametschwandtner et al., 1998*). Il existe également un second signal d'adressage appelé PTS2 qui est représenté par un peptide de 9 acides aminés en position amino-terminale identifié par le motif consensus (R/K)-(L/V/I)-X₅-(Q/H)-(L/A).

Comme dans tout système de transport spécifique, il doit exister une machinerie d'ancrage et de translocation membranaire constituée de plusieurs peroxines. Des récepteurs cytosoliques qui reconnaissent spécifiquement les signaux d'adressage PTS1 ou PTS2 et qui permettent le transport des protéines matricielles du cytosol vers le peroxysome ont été isolés et caractérisés (*Subramani et al., 1998*) : le récepteur PEX5, une protéine de 68 kDa et le récepteur PEX7, une protéine de 42 kDa. La translocation des protéines destinées à la matrice n'est pas très bien connue.

2-2. L'importation des protéines de la membrane et la prolifération peroxysomiale

L'importation des protéines de la membrane peroxysomiale (PMP) vers le peroxysome nécessite un signal d'adressage (mPTS) différent de celui trouvé dans les protéines matricielles. Le processus d'importation des PMP vers la membrane peroxysomiale peut être caractérisé par 2 étapes : d'abord il y a reconnaissance spécifique des PMP par des récepteurs solubles ou associés à la membrane peroxysomiale. Ensuite les protéines s'insèrent dans la membrane et y restent ancrées. Le premier signal d'adressage d'une PMP a été décrit chez *Candida boidinii* au niveau de la PMP47 (*McCammon et al., 1994*). Chez l'homme au niveau de ALDP (« Adrenoleukodystrophy protein ») et de la protéine membranaire peroxysomiale PMP70, un motif conservé de 14 acides aminés a été identifié dans la région nécessaire au ciblage vers le peroxysome (*Langraf et al., 2003*). PEX19, une protéine cytosolique farnésylée, est capable d'interagir avec des transporteurs ABC (« ATP binding cassette ») peroxysomiaux tels que ALDP, PMP70 et la protéine homologue à ALDP, ALDRP (« Adrenoleukodystrophy-related protein »), en se liant à une région N-terminal interne (*Gloeckner et al., 2000*). Cependant le rôle supposé de cette peroxine dans l'importation des protéines membranaires est à reconsidérer car il a été démontré que PEX19 n'intervient pas dans l'insertion de plusieurs PMP à la membrane peroxysomiale (*Fransen et al., 2004*).

Dans des conditions normales, les peroxysomes se multiplient afin de maintenir des fonctions métaboliques suffisantes pour le bon fonctionnement de la cellule. En réponse à certaines drogues appelées proliférateurs de peroxysomes (PP), les cellules peuvent voir le nombre et la taille des peroxysomes fortement augmenté, c'est la prolifération peroxysomiale. En effet, le traitement de rats avec des drogues hypolipémiantes (ex : fibrates) permet une prolifération peroxysomiale, ainsi qu'une induction de l'expression des protéines peroxysomiales, en particulier des enzymes de la β -oxydation peroxysomiale. La PMP PEX11 semble être directement impliquée dans la régulation de la croissance et de la multiplication de ces organites. Chez des levures déficientes en PEX11, les cellules contiennent un nombre limité de peroxysomes de très grande taille (*Marshall et al., 1995*). Au contraire, une surexpression de PEX11 aboutit à une prolifération peroxysomiale. Chez les mammifères, PEX11 existe sous 2 formes, a et b. PEX11a dont l'expression varie entre les différents tissus contrairement à PEX11b, est fortement inductible par les PP chez les rongeurs. Ces 2 formes de

PEX11 contrôleraient la prolifération peroxysomiale (*Shrader et al., 1998*).

3. Les principales fonctions métaboliques du peroxysome

Les peroxysomes participent à de nombreuses fonctions métaboliques qui sont essentielles au développement humain normal et à la physiologie (*Van Den Bosch et al., 1992*). Les peroxysomes sont particulièrement fréquents dans les cellules hépatiques et rénales et plus particulièrement dans les tubes rénaux. Dans ces tissus, ils contribuent très activement à la détoxification. Les peroxysomes interviennent, du fait d'un répertoire enzymatique très large, dans l'oxydation des acides gras et notamment la β -oxydation des acides gras à très longue chaîne (AGTLC, C>22) et d'autres lipides. Ils sont également impliqués dans l' α -oxydation de l'acide phytanique, la détoxification du glyoxylate, la synthèse des acides biliaires et le métabolisme de l'acide pipécolique, un métabolite mineur de la L-Lysine. Les peroxysomes participent aussi aux deux premières étapes de la synthèse des plasmalogènes et à la synthèse du cholestérol. Ils jouent un rôle dans la dégradation du peroxyde d'hydrogène par la catalase mais également dans la régulation énergétique de la cellule et la synthèse des acides aminés.

Une des fonctions du peroxysome, qui nous intéresse plus particulièrement du fait de son implication dans l'X-ALD, est le catabolisme des acides gras et de leurs dérivés à travers la β -oxydation. Les AGTLC (acides gras à très longue chaîne avec C > 22) sont uniquement oxydés dans le peroxysome, alors que les AGLC (acides gras à longue chaîne) peuvent l'être dans le peroxysome (5 à 20%) mais le sont en majorité dans la mitochondrie. Dans l'alimentation, les AGTLC sont relativement rares, on les trouve entre autres dans l'enveloppe des fruits, dans le lait et dans les graines. Ces AG (acides gras) présents en faible quantité, se retrouvent enrichis dans les cires végétales et animales. Une synthèse endogène existe dans le réticulum endoplasmique et ces AG sont des constituants des sphingolipides que l'on retrouve dans la myéline, gaine qui entoure les fibres nerveuses. La β -oxydation des AG branchés (acides pristanique et di- ou tri-hydroxycholestanoïque) a lieu uniquement dans les peroxysomes (*Singh et al., 1992*). A la différence des mitochondries, les peroxysomes ne comportent pas de chaîne respiratoire permettant la réoxydation des cofacteurs flavine adénine dinucléotide (FAD) et nicotinamide adénine dinucléotide (NAD⁺) car la β -oxydation peroxysomiale n'a pas un rôle dans la production d'énergie (apport calorique et carboné).

C'est à travers l'extrême gravité de pathologies associées à un défaut de biogenèse, liées à l'absence de peroxysomes fonctionnels comme le syndrome de Zellweger (ZS) que l'on conçoit l'importance du rôle des peroxysomes (ZS caractérisé par des troubles neuro-sensoriels : cataracte, chorioretinite, atrophie optique, surdité neuro-sensorielle ; par des anomalies hépato-rénales comportant des kystes hépatiques et rénaux ; par une fibrose ou une cirrhose et par une absence de peroxysomes morphologiquement repérables ; le décès survient généralement avant l'âge de 6 mois ; <http://www3.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/dispomim.cgi?id=214100>).

4. La β -oxydation des acides gras à très longue chaîne

La β -oxydation peroxysomiale a été mise en évidence par Lazarow et de Duve en 1976 (*Lazarow et De Duve, 1976*). Les β -oxydations mitochondriales et peroxysomiales coexistent et se complètent dans les cellules eucaryotes supérieures, ainsi que chez les plantes. En effet, chez les mammifères, les peroxysomes initient la β -oxydation des acides gras à très longues chaînes, et des acides gras poly-insaturés, tandis que la dégradation de l'octanoyl-CoA produit se termine dans la mitochondrie. Les AGTLC cytosoliques entreraient dans le peroxysome à travers la membrane plasmique grâce à un transporteur ABC, l'ALDP dont le rôle exact n'est cependant pas connu. Au niveau de la membrane peroxysomiale (côté matrice), ils sont activés en AGTLC-CoA (*Watkins et al., 1999*). Cette réaction ATP-dépendante est catalysée par une acyl-CoA synthétase spécifique (VLCS, « Very long-chain fatty acids CoA synthetase »). Ces acides gras subissent alors plusieurs cycles de β -oxydation. Chaque cycle comprend quatre étapes qui mènent au raccourcissement de la chaîne de 2 atomes de carbone et libère une molécule d'acétyl-CoA.

5. Les caractéristiques biochimiques de l'X-ALD

D'un point de vue biochimique, l'X-ALD se caractérise par une accumulation plasmatique et tissulaire de l'acide lignocérique (C24:0) et l'acide cérotique (C26:0) (le taux est multiplié par un facteur variant de 3 à 5). Dans les fibroblastes de patient, cette accumulation s'accompagne d'une déficience de la β -oxydation peroxysomiale des AGTLC. Le gène responsable de la maladie est le gène *ABCD1* codant pour un hémitransporteur ABC de la membrane peroxysomiale, l'ALDP. Les mécanismes par lesquels la déficience de l'ALDP conduirait à l'accumulation des AGTLC ne sont pas connus. Cependant, on suppose que l'ALDP interagirait avec la VLCS et assurerait le transport des AGTLC (*Mosser et al., 1993*). La déficience en ALDP se traduirait donc par un blocage de l'entrée des AGTLC dans le peroxysome.

II- Une pathologie neurodégénérative évolutive

1. Les principales formes cliniques

Bien que l'on retrouve chez tous les patients X-ALD une mutation dans le gène *ABCD1* et une accumulation plasmatique et tissulaire des AGTLC, il existe en fait une très grande variabilité de phénotypes cliniques (*Dubois-Dalcq et al., 1999 ; Moser et al., 2004*). L'absence d'une relation génotype-phénotype apparente suggère l'intervention de différents gènes et/ou de facteurs

environnementaux.

Suivant les symptômes cliniques, on peut distinguer 5 grandes formes de l'X-ALD chez l'homme :

- Une forme infantile cérébrale qui est la forme la plus sévère. Elle touche en majorité les enfants âgés de 3 ans à 10 ans (35 % des cas de l'X-ALD) mais peut toucher également les adolescents et jeunes adultes de 11 à 21 ans (7 % des malades). D'une part, elle se traduit par une démyélinisation inflammatoire progressive du système nerveux central et d'autre part elle peut s'accompagner d'une insuffisance surrénalienne (maladie d'Addison) et d'atteintes testiculaires. La maladie se manifeste dans un premier temps par des déficits cognitifs modérés puis, avec l'aggravation de l'atteinte du système nerveux central (SNC), par une diminution de l'acuité visuelle, une surdité centrale, une ataxie cérébelleuse, une hémiplégie, des convulsions et une démence conduisant à un état végétatif ou à la mort en quelques années.
- Une forme adulte peu ou pas inflammatoire, l'adrénomyélongueuropathie (AMN), semble être le phénotype le plus répandu et ne conduit pas à une dégénérescence cérébrale. L'âge d'apparition de la maladie chez l'adulte est de 28 ans \pm 9 ans (46 % des cas). Cette forme se traduit principalement par une atteinte de la moelle épinière.
- Une forme adulte cérébrale dans laquelle le SNC est touché (5 % des cas) et qui présente la même progression que la forme cérébrale de l'enfant.
- La maladie d'Addison qui touche plus de 50% des enfants de moins de 8 ans. Elle se caractérise par une insuffisance surrénalienne pouvant aboutir à une AMN au bout d'un certain âge.
- Une forme asymptomatique ne présentant aucun signe clinique bien que le défaut biochimique associé à la mutation du gène *ABCD1* soit présent.

Bien que l'adrénoleucodystrophie soit lié au chromosome X, des symptômes neurologiques, généralement moins graves que chez l'homme, ont pu être observés chez des femmes hétérozygotes. Cas très rare, une fille âgée de 8 ans et demi a montré les mêmes symptômes cliniques que ceux observés chez des garçons développant une forme cérébrale infantile (*Hershkovitz et al., 2002*).

2. L'origine des symptômes

L'accumulation excessive des AGTLC, chez les patients ayant une forme cérébrale de l'X-ALD, initierait une cascade de réactions contrôlées par les cytokines proinflammatoires. Celle-ci, conduirait à un processus neuroinflammatoire dans lequel l'activation des microglies et des astrocytes aboutit à une destruction de la myéline et des oligodendrocytes (*Paintlia et al., 2003*). En effet, la microglie et les astrocytes, ainsi que les lymphocytes T sécrètent du TNF α (« Tumor necrosis factor alpha »), cytotoxique pour les oligodendrocytes, ce qui induit la démyélinisation (*Aubourg et Dubois-Dalq, 2000 ; McGuinness et al., 1997*). Par ailleurs, de nombreuses études soulignent également l'importance de la iNOS (« Inductible nitric oxide synthase » ou monoxyde d'azote synthase) dans des pathologies neurodégénératives comme la forme infantile de l'X-ALD

(McGuinness *et al.*, 1995 ; Gilg *et al.*, 2000 ; Powers *et al.*, 1992). De même, dans le cerveau de patients X-ALD, l'expression de la iNOS serait induite par une production excessive de NO (monoxyde d'azote) dans les astrocytes et les macrophages/ microglies (Gilg *et al.*, 2000).

3. Méthodes de diagnostic biologique de la maladie

Le diagnostic est affirmé par la démonstration d'une augmentation des acides gras à très longue chaîne (augmentation de l'acide cérotique saturé (C26:0) et du rapport C26:0/C22:0, C22:0 étant l'acide docosanoïque dont la concentration reste inchangée) dans le plasma ou les fibroblastes des patients. Le diagnostic prénatal est systématiquement proposé aux femmes possédant des mutations au niveau du gène *ABCD1*. Il se fait par ponction de trophoblastes (11ème semaine de grossesse) ou ponction amniotique (15ème semaine de grossesse). Les méthodes de diagnostic utilisées reposent sur la mise en évidence de l'ALDP et le dosage des AGTLC sur cellules cultivées et la recherche directe de la mutation lorsque celle-ci est connue. Les méthodes courantes utilisées pour déterminer les taux d'AGTLC étant laborieuses et longues, une nouvelle méthode rapide a été mise au point : les AGTLC sont hydrolysés, extraits et quantifiés en moins de 4 heures (Valianpour *et al.*, 2003).

III- Une pathologie héréditaire

1. le gène impliqué dans l'X-ALD

Cette maladie génétique est la conséquence de mutations au niveau du gène *ABCD1*, localisé sur le chromosome X en position q28, qui code pour un hémitransporteur ABC (« ATP binding cassette ») peroxysomial de 745 acides aminés, l'ALDP (Mosser *et al.*, 1993). Les nouvelles mutations découvertes au niveau du gène *ABCD1* sont répertoriées sur le site Internet (www.x-ald.nl). Les mutations faux-sens sont les plus représentées, suivies des mutations entraînant un décalage du cadre de lecture, puis des mutations non-sens et enfin les délétions et les insertions. Elles affectent la stabilité et la localisation de l'ALDP (Watkins *et al.*, 1995). Différents phénotypes cliniques de l'X-ALD ont été identifiés pour une même mutation génétique et un même degré d'accumulation d'AGTLC (Moser, 1997), ce qui en fait une maladie très complexe. Les défauts génétiques et biochimiques semblent être nécessaires mais pas suffisants pour expliquer la démyélinisation inflammatoire caractéristique des lésions cérébrales suggérant que d'autres facteurs environnementaux ou génétiques sont impliqués.

2. ABCD1 code pour un hémitransporteur ABC peroxysomial

L'ALDP fait partie de la superfamille des transporteurs ABC qui sont des protéines intégrales de membrane à plusieurs domaines. Ces transporteurs utilisent comme source d'énergie l'hydrolyse de l'ATP pour permettre le passage de composés divers (ions, sucres, acides aminés, vitamines, peptides, polysaccharides, hormones, lipides et xénobiotiques) à travers les membranes cellulaires.

2-1. Structure et fonctions des transporteurs ABC

-

Malgré la diversité des solutés transportés et les différentes fonctions des transporteurs ABC, ils ont une structure très conservée entre les espèces. Ils sont composés de 4 domaines : 2 domaines transmembranaires hydrophobes (domaine TM) et 2 domaines cytosoliques hydrophiles (domaine ABC) (*Jones P.M. et George A.M., 2004*). Chez les eucaryotes, les protéines ABC sont classées soit en tant que transporteur entier si ses 4 domaines sont codés par un seul gène, soit en tant qu'hémitransporteur dans le cas où il y a une association d'un domaine TM avec un domaine ABC. Pour être fonctionnel, cela nécessite donc une dimérisation d'hémitransporteurs. Des études réalisées sur la drosophile montrent que certains hémitransporteurs ABC peuvent s'assembler en différents hétérodimères avec des fonctions différentes suivant les combinaisons (*Ewart et al., 1994*). Au niveau de la séquence primaire en acides aminés, les domaines transmembranaires présentent une grande variabilité contrairement aux domaines cytosoliques qui sont conservés entre les transporteurs ABC. Les domaines ABC contiennent 3 motifs consensus conservés, Walker A, Walker B et ATS (« Active Transport Signature ») qui contribuent à la fixation de l'ATP : le motif Walker A (G-X-X-G-X-G-K-S/T), où X est un acide aminé quelconque ; le motif Walker B (h-h-h-h-D-E-A/T-S-A-L-D), où h est un acide aminé hydrophobe ; le motif ATS (LSGGQ) qui est la séquence de signature des transporteurs ABC.

Les protéines ABC montrent différentes propriétés dans la liaison et l'hydrolyse de l'ATP, ce qui pourrait expliquer leurs différentes fonctions. Le cycle de liaison et d'hydrolyse de l'ATP induit des changements conformationnels du transporteur ABC (*Jones P.M. et George A.M., 2002*). Les propriétés de liaison de l'ATP et la cinétique de son hydrolyse pourraient être importantes pour le transport des substrats. Les protéines ABC ont différentes fonctions et peuvent être classés comme des transporteurs, des canaux et des régulateurs, alors que la structure de leur domaine de liaison à l'ATP est conservée. Une des fonctions les mieux connues est la résistance aux drogues chez les bactéries, les champignons, les levures, les parasites et les mammifères. Plus particulièrement chez l'homme, certains transporteurs ABC, comme la glycoprotéine-P, interviennent dans la résistance aux agents anticancéreux.

2-2. Les transporteurs ABC humains

Sur la base de donnée (<http://nutrigene.4t.com/humanabc.htm>), 48 transporteurs ABC sont répertoriés et répartis en 7 sous-familles structurales (ABCA à ABCG). Chez l'homme, on connaît ou soupçonne les fonctions d'une quinzaine de gènes ABC car ils sont associés à des maladies génétiques ou à des phénomènes de résistance aux drogues.

2-3. Les transporteurs ABC peroxysomiaux

Les transporteurs ABC peroxysomiaux sont classés dans le sous-groupe D et ce sont des hémitransporteurs avec un seul domaine transmembranaire et un seul domaine de liaison à l'ATP. Ces hémitransporteurs ABC sont supposés être actifs après homo (*Guimaraes et al., 2004*) ou hétérodimérisation (*Liu et al., 1999*). La combinatoire résultant de ces associations pourrait permettre d'augmenter la diversité des substrats transportés. Le gène responsable de l'X-ALD code une protéine de la membrane peroxysomiale de 75 kDa, l'ALDP. L'extrémité carboxyterminale

hydrophile de l'ALDP, contenant le domaine de liaison à l'ATP, est située du côté cytosolique (Watkins *et al.*, 1995 ; Mosser *et al.*, 1994 ; Contreras *et al.*, 1996). Chez les mammifères, 3 autres hémitransporteurs ABC peroxysomiaux ont été identifiés : la protéine homologue à l'ALDP (ALDRP, codée par *ABCD2*, présente 66 % d'identité en acide aminé (AA) avec ALDP chez la souris) (Lombard-Platet *et al.*, 1996), la protéine membranaire peroxysomiale de 70 kDa (PMP70, codée par *ABCD3*, présente 38 % d'identité en acide aminé chez le rat) (Kamijo *et al.*, 1990) et la protéine homologue à PMP70 (PMP69 ou PMP70R, codée par *ABCD4*, présente 27 % d'identité en acide aminé chez l'homme) (Shani *et al.*, 1997).

2-3-1. ALDRP

C'est une protéine de 83,3 kDa (741 acides aminés) codée par le gène *ABCD2* qui s'étend sur environ 33kb chez l'homme. *ABCD2* est localisé sur le chromosome 12 en position q11 chez l'homme (Savary *et al.*, 1997 ; Holzinger *et al.*, 1999). Plusieurs transcrits de différentes longueurs sont produits à partir du même gène, leur nombre et leur taille varient selon les espèces (Albet *et al.*, 2001). Dans le cerveau, un taux relativement élevé d'ARNm *ABCD2* a été détecté (Berger *et al.*, 1999). Cependant, l'expression d'*ABCD2* est majoritairement détectée dans les neurones et les astrocytes (Troffer-Charlier *et al.*, 1998) alors que les oligodendrocytes, cellules principalement affectées dans l'X-ALD, montrent une faible expression d'*ABCD2*. Dans le foie, son expression est très faible, contrairement à *ABCD1*. De plus, il a été observé une expression en miroir entre ALDRP et ALDP dans un tissu donné, ce qui laisse supposer des fonctions similaires entre ces transporteurs (Troffer-Charlier *et al.*, 1998).

2-3-2. PMP70

-

C'est la protéine la plus représentée au niveau de la membrane peroxysomiale. Chez l'homme, elle est constituée de 659 acides aminés et elle est codée par le gène *ABCD3* qui s'étend sur 65 kb. Ce gène est localisé sur le chromosome 1 en position p21 (Kamijo *et al.*, 1992). Un seul transcrit d'environ 3,6 kb est produit et exprimé majoritairement dans le foie.

2-3-3. PMP69

Chez l'homme, la protéine homologue à PMP70, exprimée de façon ubiquiste, est composée de 606 acides aminés. Elle est codée par le gène *ABCD4* qui s'étend sur 16 kb et qui est localisé sur le chromosome 14 en position q24 (Holzinger *et al.*, 1997 ; Holzinger *et al.*, 1998). D'un point de vue transcriptionnel, chez la souris le transcrit d'*Abcd4* a une taille de 2,7 kb (Berger *et al.*, 1999).

2-4. Redondance fonctionnelle partielle des transporteurs ABC peroxysomiaux

La forte homologie de l'ALDRP avec l'ALDP suggère des fonctions similaires dans la membrane peroxysomiale. En effet, une surexpression des gènes *Abcd2* et *Abcd3* par transfection cellulaire dans des fibroblastes X-ALD permet de restaurer partiellement le phénotype biochimique et donc favorise

la normalisation du taux d'AGTLC (*Braiterman et al., 1998 ; Kemp et al., 1998 ; Flavigny et al., 1999 ; Netik et al., 1999*). Reposant sur l'hypothèse que les transporteurs ABC peroxysomiaux sont impliqués dans l'importation d'acides gras dans la matrice peroxysomiale, l'ALDRP serait donc capable, dans une certaine mesure, de transporter des AGTLC comme l'ALDP. La redondance fonctionnelle partielle des gènes *ABCD2* et *ABCD3* avec *ABCD1* laisse espérer une thérapie pharmacologique de gène basée sur la surexpression pharmacologique des gènes homologues afin de pallier la déficience du gène responsable de la maladie.

IV- Les différentes voies thérapeutiques de l'X-ALD

Il est possible de diagnostiquer l'X-ALD chez des patients ayant une forme asymptomatique, chez ceux atteints par la maladie d'Addison et chez les sujets hétérozygotes. Le développement du diagnostic néonatal est primordial car il permet d'identifier et de traiter tous les patients X-ALD avant l'apparition d'anomalies neurologiques et surrénaliennes.

1. La greffe de moelle osseuse

La greffe allogénique (ou allogreffe) de moelle osseuse, c'est-à-dire au sein de la même espèce, permet de stabiliser et même de corriger les lésions de démyélinisation des formes cérébrales de l'enfant lorsqu'elle est effectuée à un stade précoce de la maladie (*Shapiro et al., 2000*). En effet, la présence de cellules de moelle osseuse de personnes saines chez des patients X-ALD permet de rétablir le catabolisme des AGTLC. La greffe nécessite cependant un donneur sain histocompatible et reste associée à une mortalité et une morbidité importantes surtout quand le donneur n'est pas apparenté.

2. L'huile de Lorenzo

L'huile de Lorenzo, formé d'un mélange d'acide érucique (C22:1) et d'acide oléique (C18:1) dans un rapport 1/4, permet de normaliser les taux plasmatiques d'AGTLC mais n'a aucun effet sur les concentrations intracérébrales d'AGTLC. L'utilisation de l'huile de Lorenzo repose sur l'observation que les AG insaturés entrent en compétition avec des AGLC saturés (C18:0 à C20:0) dans l'élongation des AGTLC saturés (> C22:0) (*Rizzo et al., 1986 ; Rizzo et al., 1989*). L'utilisation d'AG insaturés pour bloquer la synthèse des AGTLC est basée sur la supposition que les AG insaturés sont non toxiques. Un régime à base d'huile de Lorenzo et donc pauvre en acides gras à très longue chaîne (AGTLC) reste néanmoins inefficace sur l'amélioration de l'état clinique des patients X-ALD (*Moser et al., 1995 ; Van Geel et al., 1999*). Cependant, à titre préventif, l'huile de Lorenzo continue à être administrée à des garçons de moins de 6 ans, porteur d'une forme asymptomatique de l'X-ALD et ayant une IRM (imagerie par résonance magnétique) normale. Ceci permettrait de réduire la probabilité de développement d'anomalies neurologiques ultérieurement (*Moser et al., 2003*).

3. La thérapie génique cellulaire

Cette thérapie repose sur l'introduction du gène *ABCD1* dans des cellules précurseurs hématopoïétiques de patients X-ALD et leur autotransplantation pour leur permettre de pallier la déficience de la β -oxydation des AGTLC. Récemment, chez des souris (NOD/SCID) (« Non obese diabetic/Severe combined immune deficiency »), il a été possible de faire surexprimer de façon stable l'ALDP dans des cellules de moelle osseuse (30 à 85%) pendant 18 semaines par l'intermédiaire d'un vecteur rétroviral (*Benhamida et al., 2003*). Des essais cliniques sont prévus pendant l'année 2005.

4. La thérapie pharmacologique de gène

Une surexpression pharmacologique du gène *ABCD2* pourrait devenir une voie thérapeutique pour l'X-ALD. En effet, il a été suggéré que les gènes *ABCD2* et *ABCD3* pourraient remplir une fonction partiellement redondante avec celle du gène *ABCD1*. A un taux basal, l'expression d'*ABCD2* ne compense pas la déficience du gène *ABCD1* chez les patients X-ALD ou chez la souris *Abcd1* déficiente (*Lu et al., 1997*). En revanche, la surexpression d'*Abcd2* par transgénèse dans la souris KO (« knock-out ») *Abcd1* permet de compenser le défaut biochimique et prévient l'apparition du phénotype AMN chez les souris âgées (*Pujol et al., 2004*). Cependant le modèle souris a des limites car bien qu'elle accumule des acides gras à très longues chaînes, elle ne mime pas les symptômes neurologiques, excepté des atteintes de type adrénomyélongueuropathique (AMN) lorsqu'elles sont âgées. L'induction pharmacologique de l'expression du gène *ABCD2* devrait permettre de pallier la déficience de ALDP en rétablissant les fonctions peroxysomiales. L'analyse fonctionnelle des séquences régulatrices du gène *Abcd2* apparaît primordiale pour identifier des éléments de réponse à des drogues, hormones ou nutriments capables d'induire sa transcription. Le cerveau étant le principal organe cible de l'X-ALD, les molécules testées dans un but de thérapie pharmacologique doivent non seulement induire l'expression des gènes homologues d'*ABCD1* mais également être capables de traverser la barrière hémato-encéphalique.

Il a été démontré que les fibrates, classés dans la famille des proliférateurs de peroxysomes (agonistes des PPARs, « Peroxisome Proliferator-Activated Receptor ») chez les murins et utilisés en médecine humaine comme hypolipidémiant, sont capables d'induire l'expression du gène. L'inconvénient principal des fibrates est que leur effet est limité au foie. Par exemple, il a été observé qu'il y a induction du gène *Abcd2* via le facteur de transcription PPAR α (« Peroxisome proliferator activated receptor alpha ») au niveau du foie de souris traitées au fénofibrate mais pas dans le cerveau (*Albet et al., 1997 ; Fourcade et al., 2001*).

L'hormone thyroïdienne (T3) via le récepteur à l'hormone thyroïdienne (TR) permet également l'induction des gènes *Abcd2* et *Abcd3* dans des cultures primaires d'oligodendrocytes de rat mais pas dans le cerveau (*Fourcade et al., 2003*).

Un traitement au 4-phénylbutyrate (4-PBA) a permis de restaurer le défaut biochimique dans le cerveau et les surrénales de souris *Abcd1*^{-/-} (*Kemp et al., 1998*). Le 4-PBA est un inhibiteur de l'activité histone déacétylase (HDAC) qui permet de faciliter la transcription des gènes en maintenant

la structure de la chromatine dans sa conformation relâchée. Il provoque une augmentation de l'expression de ALDRP et augmente la prolifération peroxysomiale (*Gondcaille et al., sous presse*). Cependant, le 4-PBA a une demie-vie *in vivo* courte (1 à 2 heures) (*McGuinness et al., 2001*).

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

A

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

Albet, S., Bentejac, M., Savary, S., Gondcaille, C., Netik, A., Berger, J., Szpirer, C., Troffer-Charlier, N., Bugaut, M. (2001) Rat adrenoleukodystrophy-related (ALDR) gene: full-length cDNA sequence and new insight in expression. *Biochim. Biophys. Acta*, **1517**, 257-269.

Aubourg, P., Dubois-Dalcq, M. (2000) X-linked adrenoleukodystrophy enigma: how does the ALD peroxisomal transporter mutation affect CNS glia ? *Glia*, **29**, 186-190.

B

Benhamida, S., Pflumio, F., Dubart-Kupperschmitt, A., Zhao-Emonet, J.C., Cavazzana-Calvo, M., Rocchiccioli, F., Fichelson, S., Aubourg, P., Charneau, P., Cartier, N. (2003) Transduced CD34+ cells from adrenoleukodystrophy patients with HIV-derived vector mediate long-term engraftment of NOD/SCID mice. *Mol. Ther.*, **7**, 317-324.

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

Braiterman, L.T., Zheng, S., Watkins, P.A., Geraghty, M.T., Johnson, G., McGuinness, M.C., Moser, A.B., Smith, K.D. (1998) Suppression of peroxisomal membrane protein defects by peroxisomal ATP binding cassette (ABC) proteins. *Hum. Mol. Genet.*, **7**, 239-247.

Brown, L.A., Baker, A. (2003) Peroxisome biogenesis and the role of protein import. *J. Cell. Mol. Med.* **7**, 388-400.

C

Contreras, M., Sengupta, T.K., Sheikh, F., Aubourg, P., Singh, I. (1996) Topology of ATP-binding domain of adrenoleukodystrophy gene product in peroxisomes. *Arch. Biochem. Biophys.*, **334**, 369-379.

D

Dubois-Dalcq, M., Feigenbaum, V. and Aubourg, P. (1999) The neurobiology of X-linked adrenoleukodystrophy, a demyelinating peroxisomal disorder. *Trends Neurosci.*, **22**, 4-12.

E

Ewart, G.D., Cannell, D., Cox, G.B., Howells, A.J. (1994) Mutational analysis of the traffic ATPase (ABC) transporters involved in uptake of eye pigment precursors in *Drosophila melanogaster*. Implications for structure-function relationships. *J. Biol. Chem.*, **269**, 10370-10377.

E

- Faber, K.N., Haan, G.J., Baerends, R.J., Kram, A.M., Veenhuis, M. (2002) Normal peroxisome development from vesicles induced by truncated *Hansenula polymorpha* Pex3p. *J. Biol. Chem.*, **277**, 11026-11033
- Flavigny, E., Sanhaj, A., Aubourg, P., Cartier, N. (1999) Retroviral-mediated adrenoleukodystrophy-related gene transfer corrects very long chain fatty acid metabolism in adrenoleukodystrophy fibroblasts : implications for therapy. *FEBS Lett.*, **448**, 261-264.
- Fourcade, S., Savary, S., Albet, S., Gauthé, D., Gondcaille, C., Pineau, T., Bellenger, J., Bentejac, M., Holzinger, A., Berger, J., Bugaut, M. (2001) Fibrate induction of the adrenoleukodystrophy-related gene (ABCD2) : promoter analysis and role of the peroxisome proliferator-activated receptor PPAR α . *Eur. J. Biochem.* **268**, 3490-3500.
- Fourcade, S., Savary, S., Gondcaille, C., Berger, J., Netik, A., Cadepond, F., El Etr, M., Molzer, B., Bugaut, M. (2003) Thyroid hormone induction of the adrenoleukodystrophy-related gene (ABCD2). *Mol. Pharmacol.*, **63**, 1296-1303.
- Fransen, M., Vastiau, I., Brees, C., Brys, V., Mannaerts, G.P., Van Veldhoven, P.P. (2004) Potential role for Pex19p in assembly of PTS-receptor docking complexes. *J. Biol. Chem.*, **279**, 12615-12624.

G

- Gilg, A.G., Singh, A.K., Singh, I. (2000) Inducible nitric oxide synthase in the central nervous system of patients with X-adrenoleukodystrophy. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*, **59**, 1063-1069.
- Gloeckner, C.J., Mayerhofer, P.U., Landgraf, P., Muntau, A.C., Holzinger, A., Gerber, J.K., Kammerer, S., Adamski, J., Roscher, A.A. (2000) Human adrenoleukodystrophy protein and related peroxisomal ABC transporters interact with the peroxisomal assembly protein PEX19p. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **271**, 144-150.
- Gondcaille, C., Depreter, M., Fourcade, S., Lecca, M.R., Leclercq, S., Cadepon, F., El Etr, M., Bertrand, N., Beley, A., Martin, P.G.P., Pineau, T., Duclos, S., De Craemer, D., Roels, F., Savary, S., Bugaut, M. (2005) Phenylbutyrate up-regulates the Adrenoleukodystrophy-related gene as a non-classical peroxisome proliferator. *J. Cell. Biol.*, sous presse.
- Guimaraes, C.P., Domingues, P., Aubourg, P., Fouquet, F., Pujol, A., Jimenez-Sanchez, G., Sa-Miranda, C., Azevedo, J.E. (2004) Mouse liver PMP70 and ALDP: homomeric interactions prevail in vivo. *Biochim. Biophys. Acta.*, **1689**, 235-243.

H

- Hershkovitz, E., Narkis, G., Shorer, Z., Moser, A.B., Watkins, P.A., Moser, H.W., Manor E. (2002) Cerebral X-linked adrenoleukodystrophy in a girl with Xq27-Ter deletion. *Ann. Neurol.*, **52**, 234-237.
- Holzinger, A., Kammerer, S., Roscher, A.A. (1997) Primary structure of human PMP69, a putative peroxisomal ABC-transporter. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **237**, 152-157.
- Holzinger, A., Roscher, A.A., Landgraf, P., Lichtner, P., Kammerer, S. (1998) Genomic organization and chromosomal localization of the human peroxisomal membrane protein-1-like protein (PXMP1-L) gene encoding a peroxisomal ABC transporter. *FEBS Lett.*, **426**, 238-242.
- Holzinger, A., Mayerhofer, P., Berger, J., Lichtner, P., Kammerer, S., Roscher, A.A. (1999) Full

length cDNA cloning, promoter sequence, and genomic organization of the human adrenoleukodystrophy related (ALDR) gene functionally redundant to the gene responsible for X-linked adrenoleukodystrophy. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **258**, 436-442.

J

Jones, P.M, and George A.M. (2002) Mechanism of ABC transporters : a molecular dynamics simulation of a well characterized nucleotide-binding subunit. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **99**, 12639-12644

Jones, P.M, and George A.M. (2004) The ABC transporter structure and mechanism : perspectives on recent research. *Cell. Mol. Life Sci.*, **61**, 682-699

K

Kamijo, K., Taketani, S., Yokota, S., Osumi, T. and Hashimoto, T. (1990) The 70-kDa peroxisomal membrane protein is a member of the Mdr (P-glycoprotein)-related ATP-binding protein superfamily. *J. Biol. Chem.*, **265**, 4534-4540.

Kamijo, K., Kamijo, T., Ueno, I., Osumi, T., Hashimoto, T. (1992) Nucleotide sequence of the human 70 kDa peroxisomal membrane protein: a member of ATP-binding cassette transporters. *Biochim. Biophys. Acta*, **1129**, 323-327.

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

Kozak, M. (1986) Point mutations define a sequence flanking the AUG initiator codon that modulates translation by eukaryotic ribosomes. *Cell*, **44**, 283-292.

L

Lametschwandtner, G., Brocard, C., Fransen, M., Van Veldhoven, P., Berger, J., Hartig, A. (1998) The difference in recognition of terminal tripeptides as peroxisomal targeting signal 1 between yeast and human is due to different affinities of their receptor Pex5p to the cognate signal and to residues adjacent to it. *J. Biol. Chem.*, **273**, 33635-33643.

Landgraf, P., Mayerhofer, P.U., Polanetz, R., Roscher, A.A., Holzinger, A. (2003) Targeting of the human adrenoleukodystrophy protein to the peroxisomal membrane by an internal region containing a highly conserved motif. *J. Cell. Biol.*, **82**, 401-410.

Lazarow, P.B., De Duve, C. (1976) A fatty acyl-CoA oxidizing system in rat liver peroxisomes; enhancement by clofibrate, a hypolipidemic drug. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **73**, 2043-2046.

Lazarow, P.B., Fujiki, Y. (1985) Biogenesis of peroxisomes. *Annu. Rev. Cell. Biol.*, **1**, 489-530.

Lisenbee, C.S., Karnik, S.K., TRELEASE, R.N. (2003) Overexpression and mislocalization of a tail-anchored GFP redefines the identity of peroxisomal ER. *Traffic*, **4**, 491-501.

Liu, L.X., Janvier, K., Berteaux-Lecellier, V., Cartier, N., Benarous, R. and Aubourg, P. (1999) Homo- and heterodimerization of peroxisomal ATP-binding cassette half-transporters. *J. Biol. Chem.*, **274**, 32738-32743.

Lombard-Platet, G., Savary, S., Sarde, C.O., Mandel, J.L. and Chimini, G. (1996) A close relative of the adrenoleukodystrophy (ALD) gene codes for a peroxisomal protein with a specific expression pattern. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **93**, 1265-1269.

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

M

Marshall, P.A., Krimkevich, Y.I., Lark, R.H., Dyer, J.M., Veenhuis, M., Goodman, J.M. (1995) Pmp27 promotes peroxisomal proliferation. *J. Cell. Biol.*, **129**, 345-355.

McCammon, M.T., McNew, J.A., Willy, P.J., Goodman, J.M. (1994) An internal region of the peroxisomal membrane protein PMP47 is essential for sorting to peroxisomes. *J. Cell. Biol.*, **124**, 915-925.

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

McGuinness, M.C., Powers, J.M., Bias, W.B., Schmeckpeper, B.J., Segal, A.H., Gowda, V.C., Wesselingh, S.L., Berger, J., Griffin, D.E., Smith, K.D. (1997) Human leukocyte antigens and cytokine expression in cerebral inflammatory demyelinating lesions of X-linked adrenoleukodystrophy and multiple sclerosis. *J. Neuroimmunol.*, **75**, 174-182.

McGuinness, M.C., Zhang, H.P., Smith, K.D. (2001) Evaluation of pharmacological induction of fatty acid beta-oxidation in X-linked adrenoleukodystrophy. *Mol. Genet. Metab.*, **74**, 256-263.

Moser, H.W., Powers, J.M., Smith, K.D. (1995) Adrenoleukodystrophy: molecular genetics, pathology, and Lorenzo's oil. *Brain Pathol.*, **5**, 259-266.

Moser, H.W. (1997) Adrenoleukodystrophy: phenotype, genetics, pathogenesis and therapy. *Brain*, **120**, 1486-1508.

Moser, H.W., Raymond, G.V., Koehler, W., Sokolowski, P., Hanefeld, F., Korenke, G.C., Green, A., Loes, D.J., Hunneman, D.H., Jones, R.O., Lu, S.E., Uziel, G., Giros, M.L., Roels, F. (2003) Evaluation of the preventive effect of glyceryl trioleate-trierythrate ("Lorenzo's oil") therapy in X-linked adrenoleukodystrophy: results of two concurrent trials. *Adv. Exp. Med. Biol.*, **544**, 369-387.

Moser, H.W., Fatemi, A., Zackowski, K., Smith, S., Golay, X., Muenz, L., Raymond, G. (2004) Evaluation of therapy of X-linked adrenoleukodystrophy. *Neurochem. Res.*, **29**, 1003-1016.

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

Mosser, J., Lutz, Y., Stoeckel, M.E., Sarde, C.O., Kretz, C., Douar, A.M., Lopez, J., Aubourg, P., Mandel, J.L. (1994) The gene responsible for adrenoleukodystrophy encodes a peroxisomal membrane protein. *Hum. Mol. Genet.*, **3**, 265-271.

N

Netik, A., Forss-Petter, S., Holzinger, A., Molzer, B., Unterrainer, G., Berger, J. (1999) Adrenoleukodystrophy-related protein can compensate functionally for adrenoleukodystrophy protein deficiency (X-ALD) : implications for therapy. *Hum. Mol. Genet.*, **8**, 907-913.

O

Osumi, T., Yokota, S. and Hashimoto, T. (1990) Proliferation of peroxisomes and induction of

peroxisomal beta-oxidation enzymes in rat hepatoma H4IIEC3 by ciprofibrate. *J. Biochem.*, **108**, 614-621.

P

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

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

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

R

Rizzo, W.B., Watkins, P.A., Phillips, M.W., Cranin, D., Campbell, B., Avigan, J. (1986) Adrenoleukodystrophy: oleic acid lowers fibroblast saturated C22-26 fatty acids. *Neurology*, **36**, 357-361.

Rizzo, W.B., Leshner, R.T., Odone, A., Dammann, A.L., Craft, D.A., Jensen, M.E., Jennings, S.S., Davis, S., Jaitly, R., Sgro, J.A. (1989) Dietary erucic acid therapy for X-linked adrenoleukodystrophy. *Neurology*, **39**, 1415-1422.

Roels, F., Saudubray, J.M., Giros, M., Mandel, H., Eyskens, F., Saracibar, N., Atares Pueyo, B., Prats, J.M., De prest, B., De Preter, K., Pineda, M., Krystkowiak, P., Gootjes, J., J.A. Wanders, R., Espeel, M., Tien Poll-The, B. (2003) Peroxisome Mosaics. *Advances in Experimental medicine and Biology*, **544**, 97-106.

S

Savary, S., Allikmets, R., Denizot, F., Luciani, M.F., Mattei, M.G., Dean, M., Chimini, G. (1997) Isolation and chromosomal mapping of a novel ATP-binding cassette transporter conserved in mouse and human. *Genomics*, **41**, 275-278.

Schrader, M., Reuber, B.E., Morrell, J.C., Jimenez-Sanchez, G., Obie, C., Stroh, T.A., Valle, D., Schroer, T.A., Gould, S.J. (1998) Expression of PEX11beta mediates peroxisome proliferation in the absence of extracellular stimuli. *J. Biol. Chem.*, **273**, 29607-29614.

Shani, N., Jimenez-Sanchez, G., Steel, G., Dean, M. and Valle, D. (1997) Identification of a fourth half ABC transporter in the human peroxisomal membrane. *Hum. Mol. Genet.*, **6**, 1925-1931.

Shapiro, E., Krivit, W., Lockman, L., Jambaque, I., Peters, C., Cowan, M., Harris, R., Blanche, S., Bordigoni, P., Loes, D., Ziegler, R., Crittenden, M., Ris, D., Berg, B., Cox, C., Moser, H., Fischer, A., Aubourg, P. (2000) Long-term effect of bone-marrow transplantation for childhood-onset cerebral X-linked adrenoleukodystrophy. *Lancet*. **356**, 713-718.

Singh, H., Brogan, M., Johnson, D., Poulos, A. (1992) Peroxisomal b-oxidation of branched chain fatty acids in human skin fibroblasts. *J. Lipid. Res.*, **33**, 1597-1605.

Subramani, S. (1998) Components involved in peroxisome import, biogenesis, proliferation, turnover, and movement. *Physiol. Rev.*, **78**, 171-188.

T

Tabak, H.F., Murk, J.L., Braakman, I., Geuze, H.J. (2003) Peroxisomes start their life in the endoplasmic reticulum. *Traffic*, **4**, 512-518.

Terlecky, S.R., Fransen, M. (2000) How peroxisomes arise. *Traffic*, **1**, 465-473.

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

U

Unterrainer, G., Molzer, B., Forss-Petter, S., Berger, J. (2000) Co-expression of mutated and normal adrenoleukodystrophy protein reduces protein function: implications for gene therapy of X-linked adrenoleukodystrophy. *Hum. Mol. Genet.*, **9**, 2609-2616.

V

Valianpour, F., Selhorst, J.J., van Lint, L.E., van Gennip, A.H., Wanders, R.J., Kemp S. (2003) Analysis of very long-chain fatty acids using electrospray ionization mass spectrometry. *Mol. Genet. Metab.*, **79**, 189-96.

Van den Bosch, H., Schutgens, R.B., Wanders, R.J., Tager, J.M. (1992) Biochemistry of peroxisomes. *Annu. Rev. Biochem.*, **61**, 157-197.

Van Geel, B.M., Assies, J., Haverkort, E.B., Koelman, J.H., Verbeeten, B. Jr., Wanders, R.J., Barth, P.G. (1999) Progression of abnormalities in adrenomyeloneuropathy and neurologically asymptomatic X-linked adrenoleukodystrophy despite treatment with "Lorenzo's oil". *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry*, **67**, 290-299.

W

Watkins, P.A., Gould, S.J., Smith, M.A., Braiterman, L.T., Wei, H.M., Kok, F., Moser, A.B., Moser, H.W., Smith, K.D. (1995) Altered expression of ALDP in X-linked adrenoleukodystrophy. *Am. J. Hum. Genet.*, **57**, 292-301.

Watkins, P.A., Pevsner, J., Steinberg, S.J. (1999) Human very long-chain acyl-CoA synthetase and two human homologs: initial characterization and relationship to fatty acid transport protein. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids.*, **60**, 323-328.