

Mieux comprendre les pathologies peroxysomales et identifier des pistes thérapeutiques : étude de la β -oxydation peroxysomale des acides gras

- Valérie Nicolas
- Pierre Andréoletti
- Stéphane Savary
- Marie-Claude Clémencet
- Catherine Gondcaille
- Stéphane Mandard
- Mustapha Cherkaoui Malki
- Norbert Latruffe

Equipe Biochimie Métabolique et Nutritionnelle,
UMR 866 INSERM-Université de Bourgogne
(ex LBMC-EA 2978), 6 Bd Gabriel, 21000 Dijon

Les peroxysomes sont des organites subcellulaires qui, bien que impliqués dans des fonctions métaboliques primordiales pour la cellule, sont longtemps restés sous-étudiés.

Originellement décrits en 1954 par Rhodin puis par de Duve (prix Nobel de médecine en 1974 pour sa découverte des lysosomes et des peroxysomes), ces organites sphériques de petite taille (0,1-1 micron) sont présents dans toutes les cellules eucaryotes à l'exception des globules rouges. Les peroxysomes assurent des fonctions essentielles au métabolisme lipidique, notamment la dégradation des acides gras à très longue chaîne (AGTLC, acides gras dont le nombre d'atomes de carbone est supérieur à 22) et de lipides complexes (par exemple, les leucotriènes et les prostaglandines). Cette voie catabolique est appelée β -oxydation (du fait que la dégradation des acides gras clive la

molécule entre les carbones 2 (ou β) et 3). Le nom de peroxysome provient d'ailleurs de la première étape de la β -oxydation qui aboutit à la production de peroxyde d'hydrogène (H_2O_2). Les peroxysomes participent aussi à la synthèse de lipides essentiels du cerveau (par exemple l'acide docosahexaénoïque DHA et les plasmalogènes) ainsi qu'aux premières étapes de la synthèse du cholestérol.

Les besoins lipidiques de l'organisme sont couverts à la fois par les apports nutritionnels et la synthèse endogène. Un subtil équilibre doit donc s'établir entre les voies de synthèse et de dégradation pour conserver une lipidémie normale. Les altérations des voies d'oxydation peroxysomale ou plus généralement de la biogenèse du peroxysome entraînent le déficit en certains lipides (par exemple en DHA)

ou l'accumulation toxique d'autres lipides (par exemple, les AGTLC). Ces désordres se traduisent par des pathologies sévères, les leucodystrophies (altération de la matière blanche, leukos en grec), qui affectent la myéline et détruisent ainsi le système nerveux central. La myéline est la gaine lipidique entourant les nerfs, qui par ses propriétés d'isolant, permet la conduction nerveuse. Ces pathologies touchent également le foie (plaque tournante du métabolisme lipidique), les reins et les surrénales. On peut citer entre autres l'adréno-leucodystrophie liée à l'X (X-ALD), le syndrome de Zellweger, la chondrodysplasie rhyzomélique et la maladie de Refsum. Bien que touchant un nombre restreint de personnes, ces maladies rares dites orphelines, ne doivent cependant pas être ignorées puisque le pronostic vital est très souvent en jeu et qu'elles concernent généralement des enfants.

Le lien entre l'altération des fonctions peroxysomales, les perturbations métaboliques qui en découlent et la physiopathologie de ces maladies est complexe, rendant difficile toute avancée thérapeutique. Il est donc indispensable d'approfondir les connaissances des fonctions peroxysomales et leurs rôles dans le métabolisme cellulaire. Notre laboratoire est un des rares laboratoires européens à étudier le peroxysome. Nos travaux sont intégrés dans le projet européen « Decipher the function of peroxisomes in health and diseases » n°502018 et soutenus depuis plusieurs années par l'Association Européenne contre les Leucodystrophies (ELA) et le CNRS via le GDR 2583, « rôle cellulaire des peroxysomes ». Nous étudions la fonction et la régulation de gènes clés de la β -oxydation peroxysomale dans le but de mieux comprendre les perturbations métaboliques observées dans les pathologies peroxysomales et d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques.

La β -oxydation peroxysomale

Alors que chez la levure, la β -oxydation des acides gras n'a lieu que dans le peroxysome, chez les mammifères, elle a lieu principalement dans la mitochondrie. Le peroxysome contribue modestement (5 à 20%) à la β -oxydation des acides gras à longue chaîne mais demeure le seul lieu de la β -oxydation des AGTLC. La β -oxydation nécessite au préalable l'entrée et l'activation des acides gras. L'activation consiste en la transformation des acides gras en acyl-CoA, réaction catalysée par une acyl-CoA synthétase (Fig. 1A). Une fois activés, ils seraient pris en charge par les transporteurs ABC (« ATP-Binding Cassette ») de la membrane peroxysomale pour leur 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. Cependant, la chronologie des événements d'activation

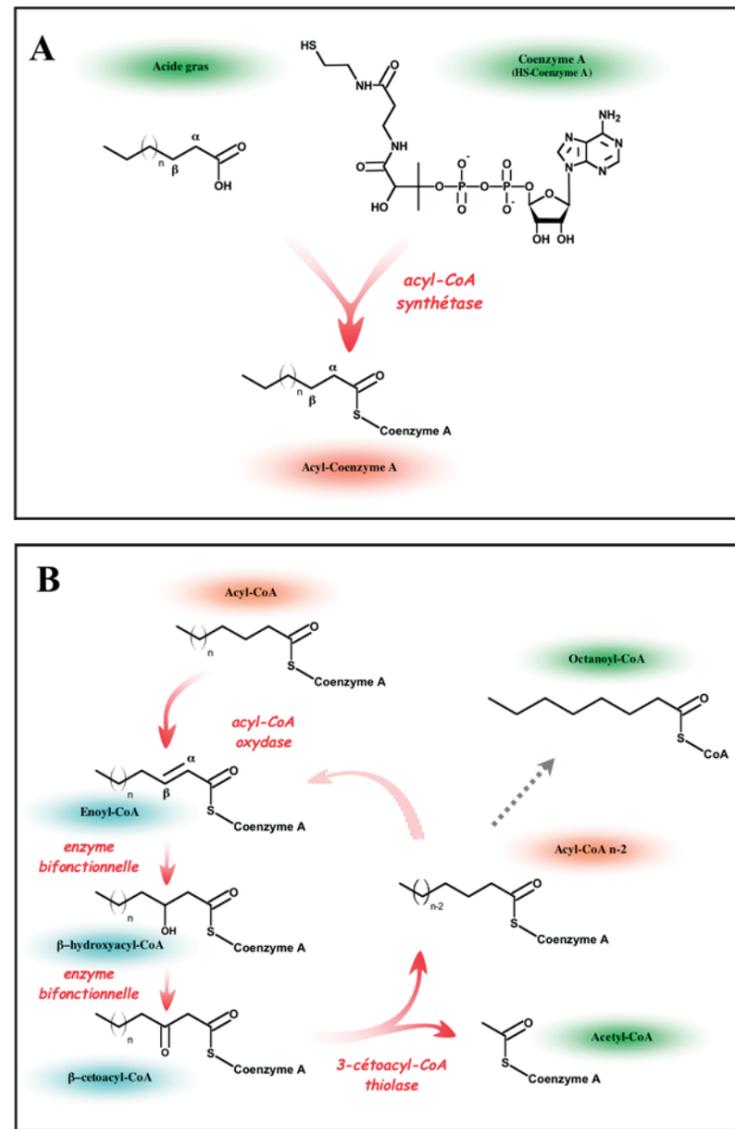


Figure 1 : Réactions de l'activation (A) et de la β -oxydation peroxysomale (B) des acides gras à très longue chaîne.

et de transport ainsi que les acteurs intervenant dans ces étapes restent à clarifier. Une fois à l'intérieur du peroxysome, les acyl-CoA vont subir 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 en une série de réactions enzymatiques catalysées par trois enzymes (l'acyl-CoA oxydase, l'enzyme bifonctionnelle et la 3-cétoacyl-CoA thiolase) conduisant à former à partir d'un acyl-CoA, un acyl-CoA raccourci de deux atomes de carbones et

une molécule d'acétyl-CoA (Fig. 1B). L'octanoyl-CoA qui résulte de ce catabolisme est transformé en octanoyl-carnitine 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 acide gras et coenzyme A par des thioestérases spécifiques avant de sortir du peroxysome pour rejoindre d'autres destinations (Fig. 2).

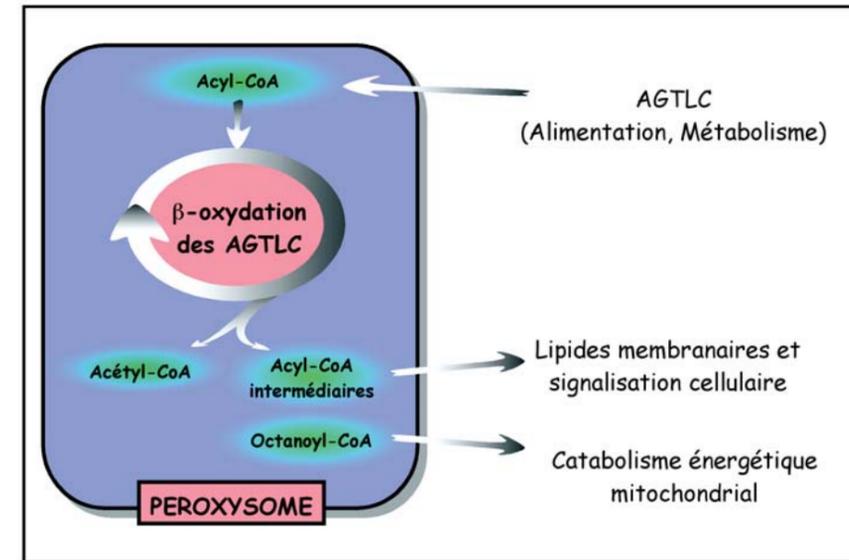


Figure 2 : Place de la β -oxydation peroxysomale dans le métabolisme cellulaire.

Une des particularités de cette voie métabolique est d'être inductible. Certains gènes du transport et de la β -oxydation des acides gras sont en effet fortement induits dans le foie des rongeurs par des molécules appelées « proliférateurs de peroxysomes » (PP). Les PP agissent en se fixant et en activant le récepteur nucléaire PPAR α (« Peroxisome Proliferator-Activated Receptor »). On retrouve dans les ligands de PPAR α des activateurs synthétiques tels que les fibrates mais aussi des activateurs naturels comme le leucotriène B4 ou les acides gras polyinsaturés (AGPI). PPAR α contrôle essentiellement des gènes impliqués dans le métabolisme lipidique. L'analyse de souris « Knock-Out » (KO) PPAR α (souris déficientes en PPAR α résultant de l'inactivation ciblée du gène par recombinaison homologue) et l'utilisation de techniques de criblage à haut débit permettent aujourd'hui de mieux comprendre le rôle de ce récepteur nucléaire qui doit être défini comme un facteur de transcription activé par un ligand. Le récepteur PPAR α se fixe sous la forme d'un hétérodimère avec le récepteur à l'acide 9-cis rétinolique (RXR) sur une séquence d'ADN située dans le promoteur des gènes cibles et appelée

PPRE (« PPAR Response Element »). Des PPRE ont été retrouvés dans les séquences régulatrices des gènes de la β -oxydation peroxysomale. Bien que ne s'avérant pas efficaces pour induire la β -oxydation peroxysomale chez l'homme (Vamecq et Latruffe, 1999), les ligands de PPAR α tels que les fibrates, sont utilisés depuis de très nombreuses années en médecine pour améliorer les symptômes du syndrome métabolique (obésité, résistance à l'insuline, athérosclérose). Les laboratoires Fournier (Dijon) sont à l'origine de la commercialisation des fibrates dits aujourd'hui d'ancienne génération tel le lipanthyl. L'industrie pharmaceutique a toujours pour objectif la découverte de nouveaux ligands de PPAR α ou des deux autres isoformes PPAR β et PPAR γ , comme en témoignent les interventions de grands groupes au dernier congrès « PPAR efficacy and safety » à Monaco en 2005 (groupes Merck, Glaxo, Fournier Pharma, AstraZeneca, Roche, Bayer, Novartis).

Résultats de l'équipe

Le rôle physiologique de la β -oxydation peroxysomale et les conséquences de ses dysfonctionnements ont été étudiés au niveau de l'entrée des acides gras dans le peroxysome (rôle des transporteurs ABC), au niveau de la première étape (catalysée par l'acyl-CoA oxydase) et de la dernière étape (catalysée par la 3-cétoacyl-CoA thiolase) de leur dégradation. Ces travaux sont réalisés essentiellement chez les rongeurs avec pour perspective de pouvoir transposer certains résultats à la recherche sur les maladies humaines (cf. liste bibliographique).

ABCD2 et l'adrénoleucodystrophie liée à l'X

L'entrée des acides gras dans le peroxysome est supposée impliquer des transporteurs ABC qui sont au nombre de quatre : ALDP, ALDRP, PMP70 et PMP69 respectivement codés par les gènes *ABCD1*, *ABCD2*, *ABCD3* et *ABCD4* (sous famille ABCD). Ces protéines sont supposées fonctionner en dimère. Le gène *ABCD2* est le plus proche homologue du gène *ABCD1* (ALD) dont le défaut est associé à l'Adréno-leucodystrophie liée à l'X (X-ALD). L'X-ALD est une pathologie neurodégénérative récessive particulièrement complexe qui touche les garçons avec une incidence de 1 cas pour 17 000 naissances. C'est la plus fréquente des maladies peroxysomales. Elle présente une grande variabilité tant dans sa survenue que dans les symptômes cliniques. La forme cérébrale infantile, caractérisée par une démyélinisation cérébrale inflammatoire, est la forme la plus grave. Elle apparaît vers l'âge de 4 ans et conduit le jeune garçon à la mort vers l'âge de 12 ans. Chez l'adulte, bien qu'une forme cérébrale existe, une forme périphérique appelée adréno-myélonéuropathie (AMN) est beaucoup plus fréquente. Les atteintes du système nerveux sont généralement accompagnées d'atteintes testiculaires et surrénales. Biochimiquement, l'X-ALD se caractérise

Inducteur	Mécanisme	Tissus / Cellules	Publications du LBM
Fibrates	PPAR α	Foie, Hépatocytes	Albet 1997, Fourcade 2001
Hormones thyroïdiennes	TR β	Foie, Oligodendrocytes, Fibroblastes	Fourcade 2003
Phénylbutyrate	Remodelage chromatinien	Foie, Hépatocytes, Fibroblastes, Cellules gliales	Gondcaille 2005
DHEA	?	Foie, Surrénales	Gueugnon (en préparation)

Tableau 1 : Inducteurs et mécanismes d'induction du gène *Abcd2* chez les rongeurs.

par une accumulation plasmatique et tissulaire d'AGTLC. La déficience en ALDP (protéine codée par *ABCD1*) serait associée à un défaut d'entrée des AGTLC dans le peroxysome. Récemment, il a été montré que la surexpression du gène *ABCD2* par transgénèse dans des souris KO *ABCD1* permet de compenser la déficience du gène *ABCD1*. On peut donc envisager la mise au point d'un traitement pharmacologique de la maladie par induction du gène *ABCD2*.

Après avoir cloné et caractérisé le gène *ABCD2* chez le rat (Albet *et al.*, 2001), nos efforts ont porté sur la régulation de l'expression de ce gène à des fins de thérapie pharmacologique de l'X-ALD. Par une approche concertée mêlant des analyses bioinformatiques et des approches moléculaires *in vivo* et *in vitro*, nous avons étudié le promoteur du gène *ABCD2* et évalué l'effet de certains inducteurs et de certains facteurs de transcription sur l'expression de ce gène (Tableau 1). Le récepteur PPAR α a été particulièrement étudié. Nous avons démontré qu'*ABCD2* est induit par les fibrates dans le foie des rongeurs de manière dépendante de PPAR α (Fourcade *et al.*, 2001). Le mécanisme moléculaire permettant l'induction pourrait être indirect puisque nous n'avons pas pu mettre en évidence l'existence d'un PPRE fonctionnel dans le promoteur d'*ABCD2*. Certains AGPI pouvant conduire à l'activation de PPAR α , ces travaux nous ont conduits à analyser l'effet de régimes carencés ou supplémentés en AGPI sur l'expression hépatique d'*ABCD2* chez le rat. De manière paradoxale, des résultats préliminaires montrent une surexpression d'*ABCD2* dans les rats carencés.

Nous nous sommes également intéressés à la DHEA, hormone ayant été décrite comme proliférateur de peroxysome et activateur de PPAR α . Un traitement à la DHEA permet une induction d'*ABCD2* dans le foie indépendamment de PPAR α , probablement par un mécanisme indirect qui reste à caractériser. Il est intéressant de noter qu'une induction d'*ABCD2* est observée dans les surrénales de souris KO *ABCD1* ayant eu un traitement DHEA à long terme (3 mois). Cette hormone pourrait donc se révéler intéressante pour les patients X-ALD souffrant d'atteintes surrénales. Une autre étude a concerné l'effet des hormones thyroïdiennes (T3 et T4) sur l'expression d'*ABCD2* (Fourcade *et al.*, 2003). Nous avons démontré l'existence d'un élément de réponse aux hormones thyroïdiennes fonctionnel dans le promoteur d'*ABCD2* et montré qu'un traitement à la T3 permet l'induction de l'expression d'*ABCD2* dans le foie de rongeurs de manière dépendante du récepteur nucléaire TR β . Une induction est également retrouvée dans des cellules d'origine cérébrale traitées à la T3. Enfin, nous nous sommes intéressés au phénylbutyrate, un médicament utilisé dans d'autres pathologies (maladies du cycle de l'urée par exemple). Contrairement aux proliférateurs de peroxysomes classiques, un traitement au phénylbutyrate entraîne une prolifération peroxysomale indépendante de PPAR α . De plus, nous avons démontré la capacité de cette molécule à induire l'expression d'*ABCD2* *in vitro* et *in vivo* (Gondcaille *et al.*, 2005). Le phénylbutyrate agirait comme inhibiteur d'activité histone désacétylase (activité qui contrôle le remodelage de la structure chromatinienne) et favoriserait ainsi la transcription d'*ABCD2*. Actuellement, nous

explorons l'effet de thyromimétiques ainsi que l'effet d'hormones sexuelles sur l'expression du gène *ABCD2*.

Bien que très encourageants, il faut néanmoins modérer la portée de ces résultats qui concernent des études chez les rongeurs et en aucun cas des études cliniques chez l'homme. D'autre part, nous n'avons pas pu obtenir d'induction au niveau cérébral (principal organe cible de la maladie). Enfin, certains traitements n'aboutissent qu'à des inductions transitoires et ne pourraient être utilisés à long terme en raison d'effets secondaires. En conclusion, nous avons caractérisé plusieurs voies d'induction pharmacologiques et hormonales qui ouvrent des perspectives intéressantes d'un point de vue thérapeutique mais qui demandent des recherches complémentaires. Par exemple, des combinaisons de ces traitements pourraient se révéler plus efficaces en permettant de réduire la dose de chaque drogue individuelle.

Dans le cadre d'une thérapie pharmacologique de l'X-ALD basée sur la redondance fonctionnelle partielle des transporteurs ABC de la membrane peroxysomale, il est non seulement nécessaire d'étudier la régulation de l'expression du gène *ABCD2* mais aussi de caractériser sa fonction. Comprendre ce phénomène de redondance fonctionnelle entre *ABCD2* et *ABCD1* et les relations entre ces deux gènes est en effet primordial. C'est pour cela que nous avons créé des modèles cellulaires (hépatome de rat H4IIEC3) qui permettront l'étude fonctionnelle de l'ALDRP dans son contexte peroxysomal (Gueugnon *et al.*, 2006). Les modèles cellulaires (transfectants stables) surexpriment de manière constitutive ou inducible une ALDRP normale ou mutée, couplée à l'EGFP (« enhanced green fluorescent protein » qui permet entre autre de suivre facilement l'expression de la protéine en microscopie confocale ou en cytométrie de flux). La validation des modèles cellulaires a été un préalable aux études fonctionnelles.

Nous avons dans un premier temps confirmé la capacité des séquences recombinantes à permettre la production d'une protéine de fusion à la taille attendue dans des expériences de transcription/traduction *in vitro*. Nous avons ensuite vérifié par microscopie confocale que l'étiquette EGFP n'entraîne pas de perturbation de la localisation subcellulaire : les protéines de fusion sont correctement adressées à la membrane peroxysomale. Nous avons également vérifié que la surexpression d'ALDRP-EGFP dans des fibroblastes de patients X-ALD permet de restaurer le niveau de β -oxydation des AGTLC. L'étiquette EGFP ne perturbe donc en rien la fonction de la protéine ALDRP et sa capacité à compenser la déficience en ALDP. Enfin, pour les modèles inducibles, nous avons vérifié que le simple ajout de doxycycline dans le milieu de culture permet de passer d'une expression quasi nulle à un niveau d'expression maximal et ceci de manière dépendante de la dose d'antibiotique (Fig. 3).

Afin d'identifier le ou les substrats d'ALDRP, les modèles cellulaires seront cultivés en présence d'une série de lipides radiomarqués (substrats supposés d'ALDRP). Nous testerons les niveaux de β -oxydation et l'import peroxysomal de ces lipides en fonction de la dose de doxycycline et donc du niveau d'expression d'ALDRP-EGFP. On suppose que la modification de la stœchiométrie relative des hémitransporteurs ABC peroxysomaux conduise à la formation de différents dimères et modifie ainsi la préférence de substrat. Les transfectants stables seront analysés en comparaison avec la lignée d'origine (expression basale d'ALDRP indétectable). *ABCD2* étant fortement exprimé dans les tissus riches en DHA, son précurseur (le C24:6 n-3) qui doit être importé dans le peroxysome pour y subir un cycle de β -oxydation, sera testé en priorité. De plus, en utilisant ces modèles cellulaires, nous avons entrepris de rechercher et d'identifier les protéines interagissant avec l'ALDRP par une analyse protéomique après « crosslink » intracellulaire de l'ALDRP et immunoprécipitation.

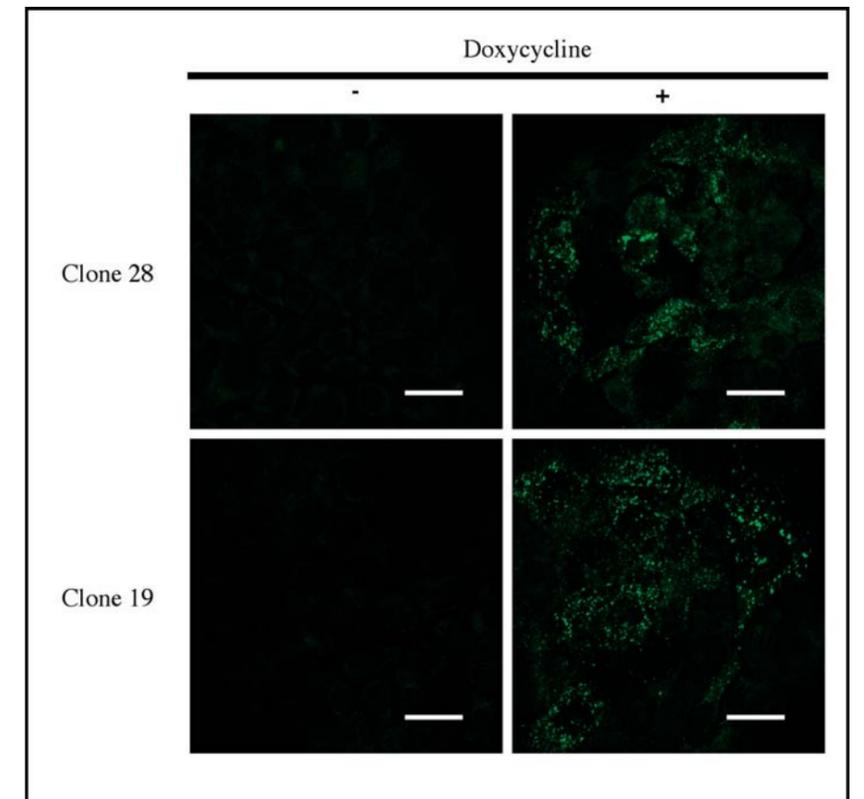


Figure 3 : Analyse en microscopie confocale de l'expression des protéines de fusion dans les clones cellulaires H4IIEC3-TetOn exprimant une protéine de fusion ALDRP-EGFP normale (clone 28) ou mutée (Asp207His, clone 19) cultivés en absence ou en présence de doxycycline (2 μ g/ml) pendant 24 h. Un marquage ponctué peroxysomal est observé dans les cellules traitées. La barre représente 20 μ m (Gueugnon *et al.*, 2006).

Ce travail devrait conduire à la compréhension du rôle exact de l'ALDRP et de ses relations avec les autres hémitransporteurs ABC, les transporteurs d'acides gras cytosoliques, les acyl-CoA synthétases et les enzymes de la β -oxydation peroxysomale. Du fait de la forte homologie entre ALDP et ALDRP, cette caractérisation fonctionnelle doit permettre de mieux appréhender les causes biochimiques de la maladie et d'explorer de façon plus approfondie les questions de redondance fonctionnelle.

Acyl-Coenzyme A oxydase 1 : Caractérisation biochimique des deux isoformes humaines

Les acyl-CoA oxydases (ACOXs) peroxysomales appartiennent à la même famille que les acyl-CoA déshydrogénases mitochondriales (ACADs). Ce sont des flavoprotéines composées de deux chaînes protéiques distinctes qui contiennent chacune une molécule de *flavine adénine dinucléotide* (FAD) liée de manière non covalente. Les ACOXs catalysent la première étape de la voie de β -oxydation des acides gras, c'est-à-dire l' α , β -deshydrogénation des acyl-CoA en *trans*-2-énoyl-CoA au cours de laquelle le FAD est réduit en FADH² (Fig. 1B). A la différence des ACADs, pour lesquelles

les électrons issus de la ré-oxydation du FADH₂ en FAD participent à la fourniture énergétique de la cellule via la chaîne respiratoire mitochondriale, la ré-oxydation du FADH₂ pour les ACOXs est réalisée par l'oxygène moléculaire - d'où la dénomination « oxydase » - et produit du peroxyde d'hydrogène.

Chez l'homme, deux acyl-CoA oxydases de 660 acides aminés ont été décrites, les acyl-CoA oxydase 1 (ACOX1) et 2 (ACOX2). Les activités de ces deux enzymes sont complémentaires au sein de la β -oxydation peroxysomale. L'ACOX1 se charge des acides gras linéaires et catalyse la deshydrogénation de la liaison α,β des acyl-CoA lorsque les carbones α et β sont sous la forme $-\text{CH}_2-$. Or il existe des acides gras dits « ramifiés » ou « branchés » qui possèdent un groupement méthyle lié au carbone α ($-\text{C}^{\text{H}}-\text{CH}_3$), tel que l'acide pristanique, un acide gras dérivé de la dégradation de la chlorophylle des végétaux. Ce type particulier d'acide gras est le substrat de l'ACOX2, enzyme aussi appelée « acyl-CoA oxydase des acides gras branchés ». Ainsi, la dégradation de ces acides gras particuliers, dits « branchés en α », se fait par une alternance de cycles de β -oxydation dont la première étape va être catalysée soit par l'ACOX1 soit par l'ACOX2. L'importance physiologique de l'ACOX1 a été mise en avant avec la découverte d'une maladie neurodégénérative rare, la pseudo-adréno-leucodystrophie néonatale (pseudo-NALD), qui est caractérisée par l'absence d'activité acyl-CoA oxydase 1. Cette absence d'activité a été corrélée avec, soit une absence de l'enzyme due à une délétion d'une grande partie du gène, soit la production d'une enzyme mutée inactive. Cette maladie ressemble aux pathologies de la biogenèse du peroxysome avec les signes classiques de démyélinisation et d'accumulation d'AGTLC que l'on retrouve dans le syndrome de Zellweger ou l'adréno-leucodystrophie néonatale. Elle se distingue au niveau hépatique par la présence de peroxysomes bien plus volumineux.

Chez les rongeurs, l'expression de l'ACOX1 est induite par les proliférateurs de peroxysomes et cette induction implique le récepteur nucléaire PPAR α (Cherkaoui-Malki *et al.*, 2001). Des analyses réalisées sur des foies de souris KO *ACOX1* et double KO *ACOX1/PPAR α* indiquent que l'absence de l'activité acyl-CoA oxydase peroxysomale, au niveau du foie, est à l'origine de l'activation constitutive du récepteur nucléaire PPAR α et de ses gènes cibles. Cette activation sans doute liée à l'accumulation d'une molécule à la fois substrat de l'ACOX1 et ligand de PPAR α , s'accompagne d'une stéatose hépatique et d'une prolifération spontanée de peroxysomes. Ainsi, connaître la spécificité de substrat de l'acyl-CoA oxydase est donc d'une importance majeure pour comprendre les phénomènes de régulation métabolique dépendants de PPAR α .

L'acyl-CoA oxydase 1 existe sous deux isoformes, nommées ACOX1a et ACOX1b produites à partir d'un gène unique. Ce gène est situé sur le chromosome 17 et s'étend sur 33kb. Il est composé de quinze exons parmi lesquels deux exons 3 (3a et 3b). Au cours de la transcription, deux ARN messagers (ARNm) sont produits par épissage alternatif, l'un avec l'exon 3a et l'autre avec l'exon 3b, et chaque ARNm donne naissance à l'une des deux isoformes de l'ACOX1. Comme la présence de ces deux isoformes a été démontrée chez le rat et la souris ainsi que chez le koala, il est légitime de penser que l'existence de deux isoformes de l'ACOX1 est un phénomène ubiquitaire chez les mammifères. Cependant, la place et le rôle biochimique de chacune des isoformes au sein de la β -oxydation peroxysomale reste obscur.

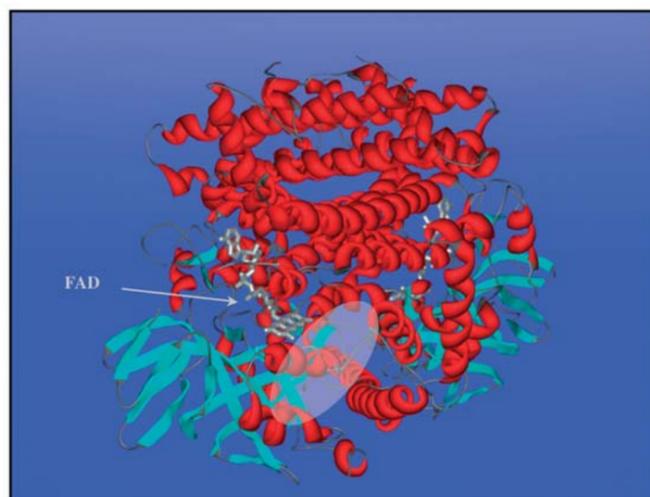


Figure 4 : Structure tridimensionnelle de l'acyl-CoA oxydase 1. Les hélices α et les feuillets β sont respectivement représentés en rouge et en bleu ciel. Le cofacteur FAD est coloré en gris et la zone d'interaction entre l'enzyme et la partie lipidique de l'acyl-CoA, qui diffère entre les isoformes 1a et 1b de l'ACOX1, est visualisée par l'ovale gris transparent.

Notre groupe s'est donné comme objectif de déterminer la spécificité de substrats de chacune des deux isoformes de l'ACOX1 humaine et de préciser leur rôle dans la β -oxydation peroxysomale en relation avec les transporteurs et les autres enzymes de cette voie métabolique (ALDP, ALDRP, Thiolase, CAT, COT...). Dans un premier temps, la stratégie utilisée consiste à caractériser biochimiquement (spécificité de substrats, relations structure-activité, etc.) les deux isoformes produites de manière recombinante chez la bactérie. Dans un second temps, nous confirmerons la spécificité *in vivo* avec des cultures de lignées cellulaires humaines surexprimant l'une des deux isoformes ainsi qu'avec le modèle de souris KO *ACOX1*.

L'analyse des séquences en acides aminés des deux isoformes de l'ACOX1 montre des différences au niveau des positions 90 à 130, positions correspondant aux acides aminés codés par les exons 3a et 3b. La modélisation de la structure tridimensionnelle de chacune de ces isoformes a permis de localiser précisément la position de ces acides aminés : ils sont situés à proximité du site actif et ils participent à la reconnaissance du substrat au niveau de la chaîne carbonée de l'acyl-CoA (Fig. 1A et Fig. 4). La

différence de nature des acides aminés impliqués, plus hydrophobes pour l'ACOX1a et plus hydrophiles pour l'ACOX1b, doit conférer des spécificités de substrats différentes aux deux isoformes. Les rares études menées jusqu'à maintenant sur la spécificité de substrats des isoformes de l'ACOX1 de rat ne montrent qu'une légère différence au niveau de la longueur de chaîne des acyl-CoA testés. Nos résultats, obtenus pour l'enzyme humaine, montrent le même comportement, avec un maximum d'activité pour le myristoyl-CoA (chaîne carbonée à 14 atomes de carbone) (Oaxaca *et al.*, en préparation).

3-céto-acyl-CoA thiolases : analyse moléculaire de l'expression des gènes et création d'un modèle de souris knock out (KO)

L'activité 3-cétoacyl-CoA thiolase impliquée dans la quatrième et dernière étape de la β -oxydation des acides gras à chaîne linéaire dans le peroxysome, est portée chez le rat et la souris par deux protéines différentes nommées thiolase A (thA) et thiolase B (thB), elles-mêmes codées par deux gènes distincts. Chez l'homme, il n'existe qu'un seul gène et donc qu'une seule 3-cétoacyl-CoA thiolase de la voie des acides gras à chaîne linéaire. La dégradation des acides gras branchés implique chez l'homme et les rongeurs, une seule activité thiolase portée par la protéine SCP2/SCPx (SCP pour « Sterol Carrier protein »).

A l'heure actuelle, aucune maladie n'a pu être liée à un défaut en thiolase des acides gras linéaires chez l'homme, ce qui la distingue des deux autres enzymes de la voie métabolique (l'acyl-CoA oxydase et l'enzyme bifonctionnelle). Très récemment a été décrite une mutation dans le gène *SCPx* qui entraîne une pathologie tardive assez différente de ce qui est habituellement décrit pour une maladie peroxysomale. Ainsi, le patient

s'est présenté vers l'âge de 20 ans pour des torticolis récalcitrants et finalement des analyses plus poussées ont montré des atteintes cérébrales. Au niveau biochimique, l'acide phytanique s'accumule dans le plasma suggérant une altération de la voie de β -oxydation des acides gras branchés. Cette altération a finalement été associée à un défaut de l'enzyme SCP2/SCPx. Le malade a pu ainsi être soulagé en adaptant son régime alimentaire afin de restreindre l'absorption d'acide phytanique. Ceci nous conforte dans l'idée de l'utilité de disposer de modèles animaux pour mieux appréhender les maladies de l'homme tout en ayant conscience de certaines limites incontournables (fonctionnement propre, espérance de vie, mode de vie, variabilité génétique...).

Le travail du groupe a débuté après un congé pour recherches ou conversions thématiques de 6 mois (1996) du Pr Norbert Latruffe dans le laboratoire du Pr Osumi (Japon) qui est à l'origine du clonage des deux gènes *thA* et *thB* chez le rat (notés *rThA* et *rThB*). Bien que ces deux gènes soient très proches (94% d'homologie au niveau protéique), leur régulation est sensiblement différente. En effet, l'expression du gène *rThB* est fortement induite par les proliférateurs de peroxysomes dans le foie de rat alors que celle du gène *rThA* ne l'est pas. Nous avons donc d'abord cherché à caractériser les éléments de réponse (PPRE) responsables de l'induction de l'expression du gène *rThB* par les proliférateurs de peroxysomes. En premier lieu, nous avons démontré que le PPRE situé en position -681/-668 en amont du site d'initiation de transcription du gène *rThB*, habituellement décrit sur la base d'analyse de séquence comme le PPRE fonctionnel, n'est pas un élément de réponse pour PPAR α . Cet élément serait plutôt impliqué dans la régulation du gène via HNF-4 α , un récepteur nucléaire jouant un rôle majeur dans la différenciation et l'expression hépatique (Nicolas-Francès *et al.*, 2000). La recherche d'autres PPRE a été ensuite effectuée par analyse de séquence entre les positions -10 kb

jusqu'à +15 kb par rapport au site d'initiation de transcription. Nous avons ainsi détecté 9 PPRE putatifs dans le promoteur et deux dans l'intron 3 du gène *rThB*. Les PPRE de l'intron 3 sont fonctionnels pour l'induction par PPAR α (Hansmann *et al.*, 2003) et au niveau de l'un d'entre eux, nous sommes en train de décortiquer un mécanisme très intéressant de coopération entre PPAR α et HNF-4 α . Ces données ont été complétées en montrant par l'utilisation de souris KO *HNF-4 α* que l'expression de HNF-4 α est indispensable *in vivo* à l'expression du gène *ThB*, mais pas à celle du gène *ThA* (collaboration S Duncan, Etats-Unis). Parallèlement, l'utilisation de souris KO PPAR α (collaboration avec Dr T.Pineau, Toulouse) nous a permis de démontrer que PPAR α est nécessaire à l'induction des deux gènes par les proliférateurs de peroxysomes, mais pas à leur expression basale.

Ayant pour objectif la création d'un modèle de souris KO *ThB*, nous avons cloné et caractérisé les gènes *ThA* et *ThB* chez la souris (Chevallard *et al.*, 2004a). Le travail sur la régulation des gènes thiolase par PPAR α chez le rat a été complété par des données chez la souris et nous avons montré que 4 des 9 PPRE du promoteur sont fonctionnels pour l'induction par PPAR α et que les PPRE de l'intron 3 de souris présentent les mêmes caractéristiques que ceux du rat (travaux en cours de publication). Nous avons également étudié dans le foie et le tissu adipeux blanc la régulation de l'expression des gènes thiolase par PPAR γ , une autre isoforme de PPAR impliquée dans la différenciation adipocytaire et activée par les glitazones, des drogues utilisées dans le traitement du diabète de type II. Dans le foie, le gène *ThB* principalement est induit par les glitazones via PPAR γ vraisemblablement. Les expériences dans le tissu adipeux blanc sont en cours de validation.

L'ensemble des résultats obtenus sur la régulation fine de l'expression du gène *ThB* de rat ou de souris nous permet de proposer un modèle résumé sur la figure 5.

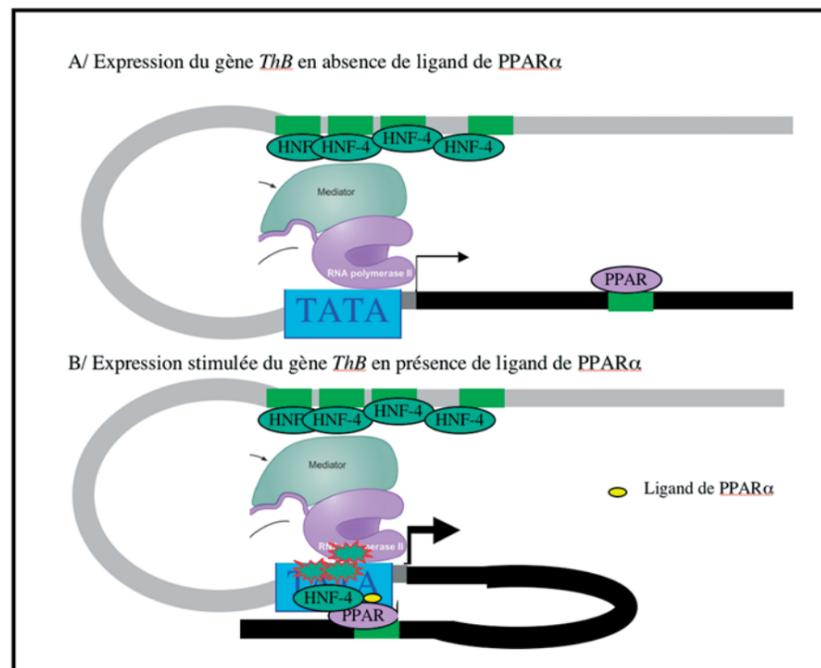


Figure 5 : Modèle de régulation transcriptionnelle de l'expression du gène thiolase B par HNF-4α, PPARα et les proliférateurs de peroxyosomes. L'ensemble des résultats combinant des expériences de transfection, de retard sur gel et d'immunoprécipitation de chromatine permet de supposer que :A/ en absence de ligand de PPARα, les PPREs du promoteur (boîtes vertes sur fond gris clair) seraient nécessaires à l'expression du gène *ThB* via l'interaction avec le récepteur nucléaire HNF-4α. PPARα pourrait être fixé sur l'intron 3, mais peu actif (séquence transcrite représentée en noire). B/ en présence de ligand, PPARα serait activé, recruterait HNF-4α pour augmenter l'activation au niveau du promoteur par l'action de co-activateurs représentés sous forme d'étoile.

Au niveau mécanisme, l'originalité réside dans la possibilité de coopération entre HNF-4α et PPARα dans le foie pour l'induction du gène *ThB*. Ce n'est sans doute pas le seul gène favorisant cette coopération puisqu'on sait que parmi les gènes régulés par PPARα, certains sont fortement induits et d'autres nettement moins. Dans ce cadre, il serait intéressant d'évaluer précisément le rôle du ligand de PPARα dans la coopération, d'autant que PPARα et les deux autres isoformes β et γ sont des cibles pour lesquelles l'industrie pharmaceutique cherche activement des modulateurs.

Un travail de longue haleine débuté en 2000 a consisté à créer le modèle de souris KO pour le gène *ThB*. Par le biais d'un contrat d'étude de deux ans de la Région Bourgogne, nous avons été à même de concrétiser ce travail. Nous avons au laboratoire cloné le gène *ThB*

de la souche 129sv et construit un vecteur de ciblage pour la recombinaison homologue. Nous avons travaillé en partenariat avec la société GenOway (Lyon) car certaines phases du projet demandent une expertise technique très spécialisée. Ainsi la société GenOway avait pour charge la culture des cellules ES (« Embryonic Stem Cells ») et leur transfection dans des conditions où les cellules restent totipotentes pour pouvoir coloniser l'embryon. Nous avons, à Dijon, identifié un clone ES recombinant homologue portant l'inactivation du gène *ThB* sur l'un de ses chromosomes, lequel a été réinjecté par la société GenOway dans des blastocytes de souris C57BL6/J, réimplantés ensuite dans une souris pseudo-gestante. Nous avons ainsi obtenu 3 mâles chimères où les cellules ES recombinant homologue avaient colonisé l'embryon. Les chimères ont été croisées avec des femelles

C57BL6/J et les premiers animaux transgéniques hétérozygotes sont nés. Les homozygotes ont été obtenus par croisement des hétérozygotes, ils sont viables et fertiles (Chevallard *et al.*, 2004b). Un phénotype morbide étant peu probable, nous avons fait le choix de maintenir la colonie en statut sanitaire EOPS (« Exempt of Pathogenesis Organism ») pour éviter l'interférence de certains virus dans nos résultats. Afin de travailler sur des souris de race pure, nous avons obtenu la mutation du gène *ThB* dans le fond génétique 129sv en deux croisements. L'obtention de la mutation dans le fond génétique C57BL6/J, plus propice à l'étude des désordres du métabolisme lipidique, a nécessité 2 ans, et nous avons travaillé avec la société Charles Rivers (Les Oncins, France) pour bénéficier de leur expertise en anticipation des élevages et en identification des animaux. Nous avons assuré à Dijon les génotypages des animaux au cours des dix croisements nécessaires à la purification de la souche. Nos animaux sont maintenant hébergés au Centre de Zootechnie de l'Université de Bourgogne dans le secteur EOPS.

L'obtention de cette souche de souris a été déterminante pour l'entrée du laboratoire dans le contrat européen « Decipher the function of peroxisomes in health and diseases » n°502018. En effet, sont présents dans ce contrat les laboratoires ayant généré des animaux KO pour la quasi-totalité des gènes codant des protéines peroxysoyales. L'objectif est maintenant, par des méthodes communes d'analyse des métabolites et du transcriptome (contenu en ARNm d'une cellule), de pouvoir comparer les modèles entre eux afin d'associer à chaque fonction déficiente une (ou des) pathologies.

Les premières analyses sur le fond génétique 129sv réalisées en collaboration avec l'équipe du Pr Clouet (UPRES Lipides-nutrition, Université de Bourgogne) ont montré l'absence d'effet de la mutation du gène *ThB* sur la β-oxydation peroxysoyale à l'état basal, suggérant

que la fonction du gène *ThB* a été suppléée par le produit d'un autre gène, vraisemblablement *ThA*. Cependant, après un traitement de 8 jours par un proliférateur de peroxyosome, la β oxydation peroxysoyale dans la souris mutante est inférieure de 30% à la valeur obtenue dans la souris sauvage. Ces observations nous incitent à élever les animaux dans des conditions où la β-oxydation serait sollicitée continuellement comme par exemple lors d'un régime riche en lipide ou en certains acides gras à longue chaîne. Dans ces conditions, des pathologies particulières pourraient apparaître chez les animaux mutants. Nous avons déjà observé certains désordres au cours du vieillissement (souris de 16 mois) comme l'élévation des triglycérides, du cholestérol total et des HDL (collaboration du Dr. Duvillard pour les dosages, INSERM U498).

L'analyse systématique du phénotype des souris dans les deux fonds génétiques va se poursuivre dans les trois années à venir selon le schéma présenté sur la figure 6. Nous sommes sollicités par les partenaires du contrat européen pour créer la souris déficiente à la fois en thiolase A et en thiolase B (double KO). La démarche sera compliquée par le fait que les deux gènes sont présents sur le même chromosome. C'est néanmoins possible, mais nous devons obtenir des soutiens à la fois pour la création des animaux et pour l'élevage qui en découle. La réalisation d'une souris résultant d'un double KO *ThB* et *SCP-X* se révélera aussi intéressante.

Conclusion

Nous avons choisi au sein de notre équipe, une approche originale visant à clarifier la fonction et la régulation des gènes qui contrôlent des points clés d'une seule et même voie métabolique : la β-oxydation peroxysoyale des acides gras à très longue chaîne. Le rôle physiologique de cette voie métabolique, sa régulation et les conséquences de ses

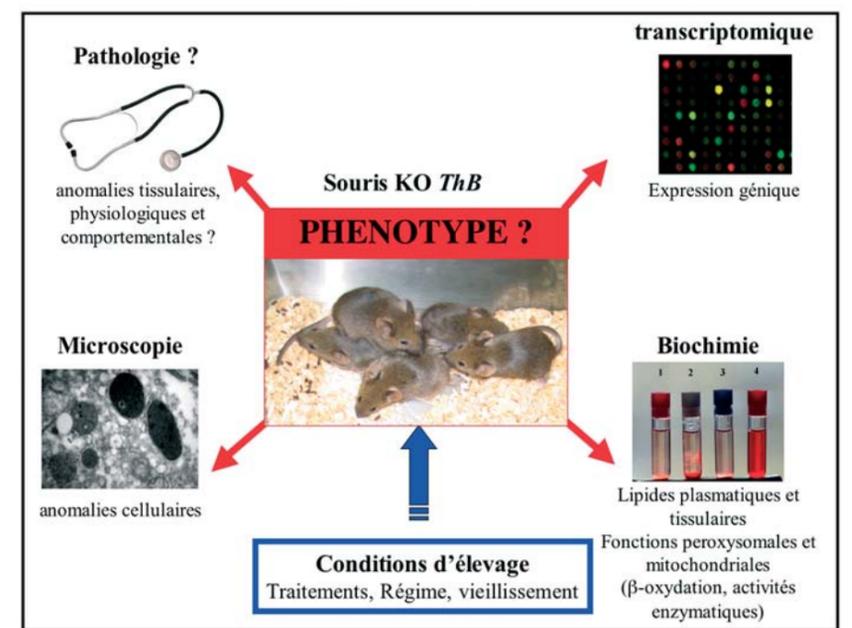


Figure 6 : Stratégie d'analyse phénotypique des souris KO thiolase B.

dysfonctionnements sont étudiés au niveau de l'entrée des acides gras dans le peroxyosome (rôle des transporteurs ABCD), au niveau de la première étape (catalysée par l'acyl-CoA oxydase) et de la dernière étape (catalysée par la 3-cétoAcyl-CoA thiolase) de la β-oxydation. Nos travaux ont, dans un premier temps, été consacrés au clonage de ces gènes et à la caractérisation de leur expression. L'effet d'hypolipémiants tels les fibrates et le rôle des récepteurs nucléaires PPARs (« Peroxisome Proliferators-Activated Receptors ») ont été tout particulièrement étudiés. Nous avons plus récemment caractérisé des mécanismes fins de régulation (hormonaux ou pharmacologiques), notamment au niveau du gène *ABCD2*, ce qui représente une ouverture vers une thérapie pharmacologique de l'X-ALD. Aujourd'hui, nous avons développé de nouveaux outils qui nous permettront de mener à bien des études fonctionnelles : protéines recombinantes pour l'acyl-CoA oxydase, modèle cellulaire surexprimant le gène *ABCD2*, souris déficiente en thiolase B. L'ensemble de ce travail permettra de donner une vision plus intégrée du rôle du peroxyosome dans les

dysfonctionnements du métabolisme des acides gras et à terme, de proposer des pistes thérapeutiques pour les pathologies peroxysoyales. L'intégration au 01/01/07 de l'équipe Biochimie Métabolique et Nutritionnelle (ex LBMC) au sein du Centre de Recherche INSERM de Dijon « Lipides-Nutrition-Cancer » (UMR 866) et l'arrivée de nouveaux chercheurs de l'INSERM U498, de l'UPRES Lipides et Nutrition et de l'UMR CNRS 5548 (voir encadré) permettront de conforter et d'étendre les recherches sur cette thématique. En particulier, la sortie des acides gras du peroxyosome et les relations peroxyosome-mitochondrie seront étudiées (rôle des carnitine octanoyl- ou acétyl-transférases) de même que les conséquences des altérations peroxysoyales sur les processus de démyélinisation dans les leucodystrophies avec l'étude des activités cytotoxiques et pro-inflammatoires d'acides gras à longue chaîne sur des cellules nerveuses déficientes en enzymes peroxysoyales.

Personnels de l'équipe Biochimie Métabolique et Nutritionnelle, Centre de Recherche INSERM de Dijon "Lipides-Nutrition-Cancer", UMR 866 INSERM - Université de Bourgogne (ex LBMC EA2978) au 01/01/07

Norbert LATRUFFE, PR responsable de l'équipe
Nathalie BANCOD, Secrétaire

Thématique "peroxysome"

Pierre ANDROLETTI, MCF
Ségolène ARNAULD, doctorante
Arnaud BERNARD, doctorant
Julie CHAMOUTON, doctorante
Mustapha CHERKAOUI MALKI, PR
Marie-Claude CLEMENCET, IGR
Jean DEMARQUOY, PR
Zakaria EL KEBBAJ, doctorant
Marco FIDALEO, doctorant
Emmanuelle GENIN, doctorante
Catherine GONDCAILLE, IGE
Françoise LE BORGNE, MCF
Gérard LIZARD, CR INSERM
Laure MALVITTE, doctorante
Stéphane MANDARD, MCF

Jean-Jacques MICHAILLE, PR
Thomas MONTANGE, étudiant EPHE
Valérie NICOLAS, MCF
David OAXACA, doctorant
Caroline RIGAULT, doctorante
Stéphane SAVARY, MCF
Anne VEJUX, post-doctorante
Aurore VLUGGENS, doctorante

Thématique transversale "prévention nutritionnelle par le resvératrol"

Didier COLIN, doctorant
Dominique DELMAS, MCF
Patrick DUTARTRE, PR associé
Brigitte JANNIN, MCF
Allan LANÇON, post-doctorant

Bibliographie

1. ALBET, S., M. BENTEJAC, S. SAVARY, C. GONDCAILLE, A. NETIK, J. BERGER, C. SZPIRER, N. TROFFER-CHARLIER, ET M. BUGAUT. 2001, *Rat adrenoleuko dystrophy-related (ALDR) gene: full-length cDNA sequence and new insight in expression. Biochim. Biophys. Acta.* 1517:257-69.
2. CHERKAOUI-MALKI, M., K. MEYER, W.Q. CAO, N. LATRUFFE, A.V. YELDANDI, M.S. RAO, C.A. BRADFIELD, ET J.K. REDDY. 2001, *Identification of novel peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PPARalpha) target genes in mouse liver using cDNA microarray analysis. Gene Expr.* 9:291-304.
3. CHEVILLARD, G., M.C. CLEMENCET, P. ETIENNE, P. MARTIN, T. PINEAU, N. LATRUFFE, ET V. NICOLAS-FRANCES. 2004A, *Molecular cloning, gene structure and expression profile of two mouse peroxisomal 3-ketoacyl-CoA thiolase genes. BMC Biochem.* 5:3.
4. CHEVILLARD, G., M.C. CLEMENCET, N. LATRUFFE, ET V. NICOLAS-FRANCES. 2004B, *Targeted disruption of the peroxisomal thiolase B gene in mouse: a new model to study disorders related to peroxisomal lipid metabolism. Biochimie.* 86:849-56.
5. FOURCADE, S., S. SAVARY, S. ALBET, D. GAUTHE, C. GONDCAILLE, T. PINEAU, J. BELLENGER, M. BENTEJAC, A. HOLZINGER, J. BERGER, ET M. BUGAUT. 2001, *Fibrate induction of the adrenoleukodystrophy-related gene (ABCD2): promoter analysis and role of the peroxisome proliferator-activated receptor PPARalpha. Eur. J. Biochem.* 268:3490-500.
6. FOURCADE, S., S. SAVARY, C. GONDCAILLE, J. BERGER, A. NETIK, F. CADEPOND, M. EL ETR, B. MOLZER, ET M. BUGAUT. 2003, *Thyroid hormone induction of the adrenoleukodystrophy-related gene (ABCD2). Mol. Pharmacol.* 63:1296-303.
7. GONDCAILLE, C., M. DEPRETER, S. FOURCADE, M.R. LECCA, S. LECLERCQ, P.G. MARTIN, T. PINEAU, F. CADEPOND, M. ELETR, N. BERTRAND, A. BELEY, S. DUCLOS, D. DE CRAEMER, F. ROELS, S. SAVARY, ET M. BUGAUT. 2005, *Phenylbutyrate up-regulates the adrenoleukodystrophy-related gene as a nonclassical peroxisome proliferator. J. Cell Biol.* 169:93-104.
8. GUEUGNON, F., N. VOLODINA, J.E. TAOUIL, T.E. LOPEZ, C. GONDCAILLE, A. SEQUEIRA-LEGRAND, P.A. MOOIJER, S. KEMP, R.J. WANDERS, ET S. SAVARY. 2006, *A novel cell model to study the function of the adrenoleukodystrophy-related protein. Biochem. Biophys. Res. Commun.* 341:150-7.
9. HANSMANNEL, F., M.C. CLEMENCET, C. LE JOSSIC-CORCOS, T. OSUMI, N. LATRUFFE, ET V. NICOLAS-FRANCES. 2003, *Functional characterization of a peroxisome proliferator response-element located in the intron 3 of rat peroxisomal thiolase B gene. Biochem. Biophys. Res. Commun.* 311:149-55.
10. NICOLAS-FRANCES, V., V.K. DASARI, E. ABRUZZI, T. OSUMI, ET N. LATRUFFE. 2000, *The peroxisome proliferator response element (PPRE) present at positions -6811-669 in the rat liver 3-ketoacyl-CoA thiolase B gene functionally interacts differently with PPARalpha and HNF-4. Biochem. Biophys. Res. Commun.* 269:347-51.
11. OAXACA-CASTILLO, D., P. ANDROLETTI, A. VLUGGENS, P. P. VAN VELDHOVEN ET M. CHERKAOUI-MALKI, *Expression and characterization of functional recombinant human liver acyl-CoA oxidase isoforms 1a and 1b. En préparation.*
12. VAMECOQ, J. ET N. LATRUFFE. 1999, *Medical significance of Peroxisome Proliferators-Activated Receptors. Lancet*, 354: 141-148.