



**UNIVERSITE HASSAN I – Settat – Maroc**

FACULTE DES SCIENCES ET TECHNIQUES  
ECOLE DOCTORALE DES SCIENCES TECHNIQUES  
SCIENCES DE BIOLOGIE SANTE ET ENVIRONNEMENT

**UNIVERSITE DE BOURGOGNE – Dijon – France**

FACULTE DES SCIENCES GABRIEL  
ECOLE DOCTORALE DES SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTE  
UFR DES SCIENCES DE LA VIE DE LA TERRE ET DE L'ENVIRONNEMENT

## **THESE**

**EN COTUTELLE**

Pour l'obtention du titre de

**Docteur**

*Discipline : Biochimie, Biologie Cellulaire et Moléculaire*

# **Base moléculaire des effets de l'huile d'Argan sur le métabolisme mitochondrial et peroxysomal des acides gras et sur l'inflammation**

Présentée et soutenue publiquement par

**Riad El KEBBAJ**

Le 17 décembre 2012

## **Membres du jury**

<b>Ahmed NEJMEDDINE</b>	Université Hassan I, Settat, Maroc	<b>Président du jury et Rapporteur</b>
<b>M'hammed Said EL KEBBAJ</b>	Université Hassan II, Ben M'Sick, Casablanca, Maroc	<b>Examineur</b>
<b>Abdelaziz SOUKRI</b>	Université Hassan II, Ain Chock, Casablanca	<b>Rapporteur</b>
<b>Joseph VAMECQ</b>	Inserm CHRU Lille, Lille, France	<b>Rapporteur</b>
<b>Gérard LIZARD</b>	Laboratoire Bio-PeroxiL, Université de Bourgogne, Dijon, France	<b>Examineur</b>
<b>Boubker NASSER</b>	Université Hassan I, Settat, Maroc	<b>Directeur de thèse</b>
<b>Mustapha CHERKAOUI MALKI</b>	Laboratoire Bio-PeroxiL, Université de Bourgogne, Dijon, France	<b>Directeur de thèse</b>
<b>Pierre ANDREOLETTI</b>	Laboratoire Bio-PeroxiL, Université de Bourgogne, Dijon, France	<b>Co-directeur de thèse</b>

# **AVANT PROPOS**

Le travail présenté dans cette thèse a été réalisé dans les laboratoires suivants :

➤ Laboratoire de Biochimie et Neurosciences (LBN) à la Faculté des Sciences et Technique, Université Hassan 1<sup>er</sup>, Settat, Maroc, sous la direction de Monsieur le professeur **NASSER Boubker**.

➤ Laboratoire de Biochimie du Peroxysome, Inflammation et Métabolisme Lipidique (Bio-PeroXIL) à la Faculté des Sciences Gabriel, Université de Bourgogne, Dijon, France, sous la direction de Monsieur le professeur **CHERKAOUI-MALKI Mustapha** et le co-encadrement de Monsieur le docteur **Andreolletti Pierre**.

➤ Plateforme Génomique Fonctionnelle au sein de L'Unité d'Appui Technique à la Recherche Scientifique (UATRS) au Centre National pour la Recherche Scientifique et Technique (CNRST) Rabat, Maroc.

➤ Laboratoire de Pharmacologie et Pathophysiologie Cardiovasculaires Expérimentales (LPPCE) à la Faculté de Médecine et Pharmacie, Université de Bourgogne, Dijon, France

Les travaux de cette thèse ont reçu le soutien financier du Comité Mixte Inter-universitaire Franco-Marocain (CMIFM, AIMA/10/238, EGIDE) du Programme Hubert Curien (PHC) Volubilis, du Ministère des Affaires Etrangères (France), du Conseil Régional de Bourgogne (France), du Ministère de l'enseignement et de la Recherche (France), de l'école doctorale des sciences de la vie et de la santé de l'université de Bourgogne (France), du programme national d'appui à la recherche sectorielle du Centre National pour la Recherche Scientifique et Technique (Maroc), du Ministère de l'éducation nationale, de l'enseignement supérieur, de la formation des cadres et de la recherche scientifique (Maroc), du Fonds de solidarité prioritaire portant sur la réforme de l'enseignement supérieur marocain (FSP ARESM) et de l'école doctorale des sciences techniques de l'université Hassan 1<sup>er</sup> (Maroc).

Les résultats obtenus ont fait l'objet des publications suivantes :

Article Accepté:

**Riad El Kebbaj**, Soufiane El Kamouni, Hammam I. El Hajj, Pierre Andreoletti, Joseph Gresti, Norbert Latruffe, M'hammed Saïd El Kebbaj, Joseph Vamecq, Gérard Lizard, Boubker Nasser and Mustapha Cherkaoui-Malki.

«**Modulation of peroxisomes abundance by Argan oil and lipopolysaccharides in acyl-CoA oxidase 1-deficient fibroblasts** ». Health 2012.

Articles en préparation:

**Riad El Kebbaj**, Pierre Andreoletti, Norbert Latruffe, M'hammed Saïd El Kebbaj, Gérard Lizard, Boubker Nasser and Mustapha Cherkaoui-Malki.

« Effect of processing on the polyphenol composition of argan oil » (**Article en rédaction**)

**Riad El Kebbaj**, Pierre Andreoletti, Norbert Latruffe, M'hammed Saïd El Kebbaj, Gérard Lizard, Boubker Nasser and Mustapha Cherkaoui-Malki.

« Molecular basis of the effect of Argan oil on energy metabolism in the mitochondria and the peroxisome in the liver of mice » (**Article en rédaction**)

**Riad El Kebbaj**, Pierre Andreoletti, Norbert Latruffe, M'Hammed Saïd El Kebbaj, Gérard Lizard, Boubker Nasser and Mustapha Cherkaoui-Malki.

« Molecular basis of anti-inflammatory potential of argan oil on lipid metabolism in the mitochondria and the peroxisome in the liver of mice » (**Article en rédaction**)

Revue en préparation:

**Riad El Kebbaj**, Zakaria El Kebbaj, M'hammed Saïd El Kebbaj, Boubker Nasser and Mustapha Cherkaoui-Malki.

« Argan oil: the treasure of potential properties » (**Revue en rédaction**)

Autre Article:

El khair, M.M., Ennaji, M.M., **El kebbaj, R.**, Mhand, R.A., Attaleb, M., and El Mzibri, M. (2010). « p53 codon 72 polymorphism and risk of cervical carcinoma in Moroccan women ». Medical oncology 27, 861-866.

### Communications orales :

**El Kebbaj .R**, Houmairi .H, Moustaid .K, El Kebbaj M. S, Bagri .A, Benkacem .J, Bounafaa .A, Nasser .B. « **Extraction purification de mycotoxines fusariennes et prévention de leur toxicité in vivo sur des souris par l'extrait du Cactus Opuntia** » Workshop Internationales de Toxicologie Environnementale. 15-16Avril 2010 Faculté des Sciences et techniques, Université Hassan 1er, Settat -Maroc.

**El kebbaj .R**, El Hajj .HI, Andreoletti .P, El Kamouni .S, Mandard .S, El Kebbaj .MS, Latruffe .N, Lizard .G, Nasser .B, Cherkaoui-Malki .M. « **Effets anti-inflammatoire et hypolipémiant de l'huile d'argan au niveau hépatique chez la souris** » Journées nationales sous le thème: « Substances Naturelles et Développement Durable » Les 22 - 23 Juin 2012 Faculté des Sciences ,Université Mohammed V, Rabat, Maroc.

### Communications Posters :

**El kebbaj .R**, El Hajj .HI, Andreoletti .P, El Kamouni .S, Latruffe .N, El Kebbaj .MS,Vamecq.J, Lizard .G, Nasser .B, Cherkaoui-Malki .M. . « **Argan Oil-dependent Regulation of Peroxisomal and Mitochondrial  $\beta$ -oxidations** » Colloque "Open European Peroxisome Meeting 2012" 5-6 juillet 2012Faculté des Sciences Gabriel Université de Bourgogne, Dijon, France.

**El kebbaj .R**, El Hajj .HI, Andreoletti .P, El Kamouni .S, Latruffe .N, El Kebbaj .MS,Vamecq.J, Lizard .G, Nasser .B, Cherkaoui-Malki .M. . « **Argan Oil-dependent Regulation of Peroxisomal and Mitochondrial  $\beta$ -oxidations** » 18ème forum des jeunes chercheurs. 6-7 septembre 2012 faculté de Médecine Besançon,France.

**El kebbaj .R**, El Hajj .HI, Andreoletti .P, El Kamouni .S, Latruffe .N, El Kebbaj .MS,Vamecq.J, Lizard .G, Nasser .B, Cherkaoui-Malki .M. « **Argan Oil-dependent Regulation of Peroxisomal and Mitochondrial  $\beta$ -oxidations** » workshop “nutrichemicals and their regulatory influences and intracellular processus (NutriOx)”. 6-9 septembre 2012 University of Saarlandes, Campus B2.1. D-66123 Saarbruecken, Allemagne.

# **DEDICACE**

*Je dédie ce travail*

*A mes chers parents*

*En témoignage de mon affection et reconnaissance pour tout ce  
qu'ils m'ont donné  
Sans vous je ne serais jamais arrivé jusque là  
Je vous remercie pour votre soutien et votre amour inconditionnel  
Vous n'avez jamais hésité à vous sacrifier pour ma réussite et mon  
bonheur*

*A mes frères*

*A mes sœurs*

*A ma nièce Ghita*

*A ma famille*

*A mes professeurs*

*A mes amis*

# REMERCIEMENTS



Je tiens à remercier,

Monsieur le Professeur, **NASSER Boubker**, directeur de thèse au Maroc, Pour son soutien, son encadrement, son enthousiasme communicatif et sa confiance. Je lui suis également reconnaissant de son aide scientifique et administratif, de ses conseils et de la patience qu'il m'a accordée tout au long de ce travail. Je le remercie également pour son amitié et son respect envers les doctorants.

Monsieur le Professeur **CHERKAOUI-MALKI Mustapha**, directeur de thèse en France, pour la confiance qu'il m'a accordée tout au long de ces années. J'ai beaucoup apprécié la liberté qu'il m'avait laissée dans l'orientation de ce travail. Je lui suis également reconnaissant de son aide scientifique, de ses conseils, de sa rigueur scientifique et de la patience qu'il m'a accordée tout au long de ce travail. Je le remercie également pour les longues heures de travail sur ce manuscrit.

Monsieur le Docteur **ANDREOLETTI Pierre**, pour son co-encadrement, ses conseils, sa disponibilité, son respect, sa confiance, son aide scientifique et surtout pour son amitié. N'oublie pas Pierre « c'est la science qui nourrit ». Un grand merci pour les discussions que nous avons eues tout au long de mon séjour au laboratoire à Dijon, j'avais vraiment de la chance d'avoir partagé ton bureau.

Monsieur le Professeur **ESSAMADI Abdelkhalid**, directeur du Laboratoire de Biochimie et Neurosciences (LBN) à l'université Hassan 1<sup>er</sup> (Settat-Maroc), pour m'avoir accueilli au sein de son laboratoire.

Monsieur le Docteur **LIZARD Gérard**, directeur du Laboratoire Biochimie du Peroxysome, Inflammation et Métabolisme Lipidique (Bio-PeroXIL) (EA 7270) à l'université de Bourgogne Dijon, France, pour m'avoir accueilli au sein de son laboratoire. Je lui suis également reconnaissant de son aide scientifique, de ses conseils, et de m'avoir préparé le déjeuner « Halal » pour le repas du laboratoire.

Monsieur le Professeur **DUTARTRE Patrick**, membre du Laboratoire de Pharmacologie et Pathophysiologie Cardiovasculaires Expérimentales (LPPCE) à la faculté de Médecine et Pharmacie de l'Université de Bourgogne Dijon, France, qui m'a donné l'occasion de travailler au sein de son laboratoire.

Monsieur le Docteur **El FAHIME Elmostafa**, responsable scientifique de la Plateforme Génomique Fonctionnelle au sein de L'Unité d'Appui Technique à la Recherche Scientifique (UATRS) au Centre National pour la Recherche Scientifique et Technique (CNRST) Rabat, Maroc, pour sa disponibilité, son aide scientifique et administratifs, sa gentillesse et ses conseils.

Cher ami **El KAMOUNI Soufiane**, pour sa disponibilité, son aide, son amitié et pour les longues heures de travail qu'on a passé ensemble au laboratoire.

Cher ami **BOUMHRAS Mohamed**, je n'ai jamais rencontré une personne avec ses qualités, une personne de style et de caractère. Je le remercie pour son amitié depuis notre DESA.

Je remercie de tout mon cœur le Docteur **EL HAJJ Hammam**, qui m'a aidé à maîtriser la culture cellulaire et la qPCR, la Doctorante **MAUGE Lorraine**, qui m'a aidé à mésuser les activités enzymatiques et l'adjoint technique Madame **MOTTOUS Hanane**, qui m'a aidé à entretenir les cellules et surtout pour sa gentillesse et son amitié depuis son arrivée au laboratoire.

Mes remerciements vont également à tout le personnel des deux laboratoires d'accueil, pour leur aide, leur sympathie et leurs conseils.

De même je remercie toute personne ayant collaborée de loin ou de près au bon déroulement de mon stage et à la réalisation de mon projet de fin d'études.

Je tiens à remercier les membres de jury,

Monsieur le Professeur **NEJMEDDINE Ahmed**, Président de l'Université Hassan 1<sup>er</sup> de Settat, Maroc, d'avoir accepté de bien vouloir lire et évaluer ce travail. Qu'il soit assuré de ma profonde reconnaissance.

Monsieur le Professeur **EL KEBBAJ M'Hammed Said**, Doyen de la faculté des sciences Ben M'sik à l'université Hassan II Mohammedia, Maroc, d'avoir accepté de bien vouloir examiner ce travail. Qu'il soit assuré de ma profonde reconnaissance.

Monsieur le Professeur **SOUKRI Abdelaziz**, à la faculté des sciences Aïn-chok à l'université Hassan II Casablanca, Maroc, d'avoir accepté de bien vouloir lire et évaluer ce travail. Qu'il soit assuré de ma profonde reconnaissance.

Monsieur le Docteur **VAMECQ Joseph**, au Center of Biology and Pathology Pierre Marie Degand, CHRU Lille, France, d'avoir accepté de bien vouloir lire et évaluer ce travail. Qu'il soit assuré de ma profonde reconnaissance.

Monsieur le Docteur **LIZARD Gérard**, directeur du Laboratoire Biochimie du Peroxysome, Inflammation et Métabolisme Lipidique (Bio-PeroXIL) (EA 7270) à l'université de Bourgogne, Dijon, France, d'avoir accepté de bien vouloir examiner ce travail. Qu'il soit assuré de ma profonde reconnaissance.

Monsieur le Docteur **ANDREOLETTI Pierre**, mon co-encadrant à la faculté des sciences Gabriel à l'université de Bourgogne, Dijon, France, d'avoir accepté de participer au jury.

Monsieurs les Professeurs **NASSER Boubker** et **CHERKAOUI-MALKI Mustapha**, de m'avoir accueillis dans leurs équipes et d'avoir supervisés et encadrés ces travaux.

# **RESUME**

L'objectif des travaux de cette thèse a été d'explorer les bases moléculaires de l'effet de l'huile d'Argan (HA) sur le métabolisme lipidique au niveau mitochondriale et peroxysomale ainsi qu'élucider son potentiel anti-inflammatoire. Nous avons donc montré, dans un premier temps, que les méthodes artisanales préservent les propriétés antioxydantes d'HA empêchant l'oxydation de l'acide férulique contrairement à l'HA d'origines commerciale. Ensuite, le traitement par l'HA ou par les lipopolysaccharides (LPS) de fibroblastes humains, un modèle cellulaire de la pseudo-adrénoleucodystrophie néonatale (P-NALD), révèle pour l'HA une prolifération des peroxysomes indépendante de l'activation du récepteur nucléaire PPAR $\alpha$  et de son coactivateur PGC-1 $\alpha$ . Par contre, l'induction de la prolifération de peroxysomes par les LPS est accompagnée d'une activation de PPAR $\alpha$  et de PGC-1 $\alpha$ . Parallèlement, une étude a été réalisée au niveau hépatique chez des souris traitées par l'HA ou par les LPS. Nous avons montré pour la première fois l'activité antioxydante de l'huile d'Argan *in vivo* au niveau hépatique par l'induction de l'activité enzymatique de la catalase peroxysomale et une activité hypolipémiant par la stimulation des activités déshydrogénases (ACADs) de la  $\beta$ -oxydations mitochondriale des acides gras. De plus, l'HA induit la transcription des gènes PPECK et G6PH de la voie de la néoglucogénèse. Nous avons montré également pour la première fois un effet préventif de l'HA contre la répression des activités déshydrogénases des voies de  $\beta$ -oxydations mitochondriale et peroxysomale, ainsi que celle la voie de la néoglucogénèse. Nos travaux démontrent que l'HA possède un potentiel anti-inflammatoire, induit par le LPS, élucidé par la répression de cytokines pro-inflammatoires IL-6 et TNF $\alpha$  et par l'induction de cytokines anti-inflammatoires IL10 et IL-4. L'ensemble de nos résultats indiquerait que l'huile d'Argan, du fait de sa composition riche en acide gras mono et polyinsaturés et en antioxydants, a des effets hypolipémiants et anti-inflammatoires au niveau hépatique qui se traduisent par une régulation de l'expression à la fois de récepteurs nucléaires et de leur gènes cibles ainsi que de certaines cytokines.

Mots clés : Argan, Acide gras, Acide férulique, P-NALD, Métabolisme lipidique, Inflammation, Néoglucogénèse, Mitochondrie, Peroxysome,  $\beta$ -oxydation, antioxydant, Foie, LPS, PPAR $\alpha$ , PGC-1 $\alpha$ , ACADs, ACOX1, IL10, IL-6, TNF $\alpha$ .

# **ABSTRACT**

The objective of this thesis work was to explore the molecular basis of Argan Oil (AO) effects on the mitochondrial and peroxisomal lipid metabolism and to elucidate its anti-inflammatory potential. We thus showed, initially, that the artisanal method preparation preserved the antioxidant properties of AO preventing the oxidation of the ferulic acid, by contrast to AO of commercial origin. Then, the treatment by the AO or lipopolysaccharides (LPS) of human fibroblasts, the cellular model of pseudo-neonatal adrenoleukodystrophy (P-NALD), revealed for the AO that peroxisomes proliferation is independent from the activation of the nuclear receptor PPAR $\alpha$  and the co-activator PGC-1 $\alpha$ . On the other side, the induction of the proliferation of peroxisomes by LPS is accompanied by an activation of both PPAR $\alpha$  and PGC-1 $\alpha$ . At the same time, mice treatments by AO or by the LPS showed, for the first time, the hepatic antioxidant activity of AO through the induction of the activity of the peroxisomal catalase. In addition, we showed a hypolipidemic activity of AO, by the stimulation of dehydrogenase activities (ACADs) of the mitochondrial fatty acid  $\beta$ -oxidation. Moreover, the AO induces the transcription of genes involved in gluconeogenesis pathway (i.e. PEPCK and G6PH). We also revealed, for the first time, the preventive effect of AO against LPS repressions of mitochondrial and peroxisomal fatty acid degradation as well as on the gluconeogenic pathway. Furthermore, the AO anti-inflammatory potential has been shown, in mice treated by LPS, through the repression of the pro-inflammatory cytokines IL-6 and TNF $\alpha$  and by the induction of the anti-inflammatory cytokines IL10 and IL-4. All together, our results may indicate that the Argan oil, because of its composition rich in mono and polyunsaturated fatty acids and in antioxidants as well, has a hypolipidemic and an anti-inflammatory effects, which are revealed by the regulation of the expressions of nuclear receptors and their target genes including several cytokines.

Key words: Argan, Fatty acid, Ferulic acid, P-NALD, lipid Metabolism, inflammation, gluconeogenesis, Mitochondria, Peroxisome,  $\beta$ -oxidation, antioxidant, Liver, LPS, PPAR $\alpha$ , PGC-1 $\alpha$ , ACADs, ACOX1, IL10, IL-6, TNF $\alpha$ .

# **TABLE DES MATIERES**



<b>AVANT PROPOS.....</b>	<b>1</b>
<b>DEDICACE .....</b>	<b>5</b>
<b>REMERCIEMENTS .....</b>	<b>7</b>
<b>RESUME .....</b>	<b>11</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>13</b>
<b>TABLES DES MATIERES .....</b>	<b>15</b>
<b>LISTE DES FIGURES .....</b>	<b>19</b>
<b>LISTE DES TABLEAUX .....</b>	<b>22</b>
<b>ABREVIATIONS .....</b>	<b>24</b>
<b>INTRODUCTION.....</b>	<b>28</b>
<b>BIBLIOGRAPHIE .....</b>	<b>31</b>
I.  L'huile d'argan.....	32
1. <i>L'arganier</i> .....	32
1.1  Aspect historique.....	32
1.2  Répartition géographique.....	32
1.3  Importance et rôles .....	34
2. <i>L'huile d'argan</i> .....	34
2.1  Extraction de l'huile d'argan.....	34
2.2  Composition de l'huile d'argan.....	36
2.3  Intérêts thérapeutiques.....	41
II.  METABOLISME DES ACIDES GRAS.....	44
1. <i>La mitochondrie</i> .....	44
1.1  Généralité.....	44
1.2  Structure.....	44
1.3  Rôle de la mitochondrie .....	45
1.4  La $\beta$ -oxydation mitochondriale.....	46
2. <i>Le peroxysome</i> .....	48
2.1  Généralités .....	48
2.2  Structure des peroxysomes .....	48
2.3  Biogenèse des peroxysomes.....	48
2.4  Rôle métabolique des peroxysomes.....	53
2.5  La $\beta$ -oxydation des acides gras.....	54
2.6  Métabolisme des peroxydes.....	63
2.7  Maladies peroxysomales .....	65
3. <i>Régulation des systèmes de <math>\beta</math>-oxydation mitochondriale et peroxysomale</i> .....	67
3.1  Régulation transcriptionnelle du métabolisme des acides gras .....	67
3.2  Récepteurs Activés par les Proliférateurs de Peroxysomes (PPARs) .....	67
3.3  Le PGC-1 $\alpha$ (peroxisome proliferator activator receptor $\gamma$ coactivator-1 $\alpha$ ).....	75
III.  REGULATION DU METABOLISME LIPIDIQUE PAR LES HUILES NATURELLES .....	82
<b>MATERIEL ET METHODE .....</b>	<b>83</b>
I.  MODEL EXPERIMENTAL .....	84
II.  CONDITIONS EXPERIMENTALES.....	84
1. <i>Conditions d'élevage des souris</i> .....	84
2. <i>Conditions de culture des fibroblastes</i> .....	84
III.  TRAITEMENT.....	85
1. <i>Extraction de l'huile d'argan</i> .....	85
2. <i>Traitement des souris</i> .....	85
2.1  Préparation des aliments.....	85
2.2  Traitement.....	85
3. <i>Traitement de cellules</i> .....	86

IV. EXTRACTION D'ARN .....	87
1. A partir de tissu de foie .....	87
2. A partir de cellules en culture.....	88
V. DOSAGE DES ARNs PAR SPECTROPHOTOMETRIE UV .....	89
VI. OBTENTION DES ADNC PAR REACTION DE TRANSCRIPTION INVERSE.....	89
1. Echantillons d'ARNs obtenus à partir de tissus .....	89
2. Echantillons d'ARNs obtenus à partir de cellules .....	90
VII. PREPARATION DES ECHANTILLONS POUR LA QPCR.....	90
VIII. REACTION DE QPCR .....	91
1. In-vivo .....	91
2. In-vitro.....	91
IX. PREPARATION D'HOMOGENATS.....	93
1. Homogénats de foie.....	93
2. Homogénats de cellules .....	94
X. DOSAGE DES PROTEINES .....	94
XI. MESURE DES ACTIVITES ENZYMATIQUES .....	94
1. Mesure de l'activité acyl-CoA oxydase 1 .....	94
2. Mesure de l'activité acyl-CoA déshydrogénase :.....	95
3. Mesure de l'activité Catalase :.....	96
XII. ANALYSE DE L'EXPRESSION DE PROTEINES PAR WESTERN-BLOT .....	97
1. Préparation des échantillons.....	97
2. Séparation des protéines par électrophorèse sur gel en SDS-PAGE (PolyAcrylamid Gel Electrophoresis).....	97
3. Transfert sur membrane des protéines et immunodécoration .....	98
4. Détection par chimioluminescence .....	98
XIII. IMMUNOFLUORESCENCE .....	98
<b>RESULTATS .....</b>	<b>100</b>
I. EVALUATION DE L'ACIDE FERULIQUE DANS L'HUILE D'ARGAN .....	101
1. Caractérisation de l'acide ferulique par fluorimétrie.....	101
2. Caractérisation de l'huile d'Argan commerciale .....	102
3. Caractérisation de l'huile d'Argan artisanale.....	104
4. Oxydation de l'huiles d'Argan .....	106
4.1 L'huile d'Argan commerciale .....	106
4.2 L'huile d'Argan artisanale .....	108
5. Oxydation de l'acide férulique .....	109
6. Quantification de l'acide férulique dans l'huile d'Argan artisanale .....	111
II. ARTICLE: MODULATION DE L'ABONDANCE DE PEROXYSOMES PAR L'HUILE D'ARGAN ET LES LIPOPOLYSACCHARIDES DANS LES FIBROBLASTES DEFICIENT EN ACYL-COÀ OXYDASE1 .....	113
1. Introduction .....	117
2. Material and Methods: .....	118
2.1 Cell culture and argan oil treatment: .....	118
2.2 Immunostaining and morphometry: .....	119
2.3 Quantitative PCR analysis:.....	119
2.4 Statistical analysis.....	120
3. Results.....	120
3.1 Argan oil and LPS increase peroxisome population in P-NALD- fibroblasts.....	120
3.2 Roles of PPAR $\alpha$ and PGC-1 $\alpha$ in the increase of peroxisome population in P-NALD fibroblasts by Argan oil and LPS: 121	
4. Discussion.....	122

III. EFFET DE L'HUILE D'ARGAN SUR LE METABOLISME LIPIDIQUE ET GLUCIDIQUE .....	134
1. <i>Le métabolisme des acides gras</i> .....	134
1.1 Effet de l'huile d'Argan sur le récepteur nucléaire PPAR $\alpha$ et son coactivateur PGC-1 $\alpha$ .....	135
1.2 Effet de l'huile d'Argan sur les gènes impliqués dans $\beta$ -oxydation .....	138
2. <i>Effet du traitement à l'huile d'Argan sur la néoglucogenèse</i> .....	149
2.1 Expression des ARNm codants pour HNF4 $\alpha$ .....	150
2.2 Expression des gènes cibles d' HNF4 $\alpha$ .....	151
2.3 Expression relative protéique de HNF4 $\alpha$ .....	152
3. <i>Conclusion</i> .....	153
IV. EFFET PREVENTIF DE L'HUILE D'ARGAN CONTRE LA PERTURBATION DU METABOLISME LIPIDIQUE PAR LES ENDOTOXINES (LIPOPOLYSACCHARIDES) .....	155
1. <i>Effets du LPS et de l'huile d'Argan sur le métabolisme des acides gras</i> .....	155
1.1 Effet préventif de l'huile d'Argan au niveau de PPAR $\alpha$ et de PGC-1 $\alpha$ .....	156
1.2 Effet préventif de l'huile d'Argan sur la $\beta$ -oxydation des acides gras.....	159
2. <i>La néoglucogenèse</i> .....	170
2.1 Expression des ARNm codants pour HNF4 $\alpha$ .....	170
2.2 Expression relative protéique de HNF4 $\alpha$ .....	171
2.3 Expression des ARNm codants pour PEPCk, G6P et Glut4 .....	172
3. <i>L'inflammation</i> .....	174
3.1 Expression des ARNm codants pour des cytokines pro-inflammatoires : IL6 et TNF $\alpha$ .....	175
3.2 Expression des ARNm codants pour les cytokines anti-inflammatoires : IL4 et IL10.....	176
4. <i>Conclusion</i> .....	178
<b>DISCUSSION</b> .....	<b>181</b>
I. PROPRIETES DE L'HUILE D'ARGAN D'ORIGINES ARTISANALE ET COMMERCIALE.....	182
II. EFFET DE L'HUILE D'ARGAN SUR LE METABOLISME LIPIDIQUE ET GLUCIDIQUE .....	185
III. EFFET PREVENTIF DE L'HUILE D'ARGAN CONTRE LA PERTURBATION DU METABOLISME LIPIDIQUE PAR LES ENDOTOXINES (LIPOPOLYSACCHARIDES). .....	192
<b>CONCLUSIONS GENERALES</b> .....	<b>200</b>
<b>PERSPECTIVES</b> .....	<b>204</b>
<b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES</b> .....	<b>206</b>

# **LISTE DES FIGURES**

Figure 1 : Aire de répartition de l'arganier au Maroc .....	33
Figure 2 : Photo du fruit de la graine et de l'amande de l'Arganier.....	35
Figure 3 : Micrographie montrant des mitochondries et des peroxysomes dans un hépatocyte de rat.....	45
Figure 4 : Schéma représentant la $\beta$ -oxydation mitochondriale. ....	47
Figure 5 : Schéma Représentant de la cascade d'importation des protéines membranaires. ....	50
Figure 6 : Représentation scématique de la cascade d'importation des protéines matricielles peroxysomales. ....	51
Figure 7 : Représentation schématique de la division et de la prolifération des peroxysomes. ....	53
Figure 8 : Schéma Représentant la $\beta$ -oxydation peroxysomale.....	56
Figure 9 : Représentation du métabolisme des différents substrats de $\beta$ -oxydation peroxysomale .....	58
Figure 10 : Description schématique des enzymes nécessaires à la conversion des acides gras dans les différents correspondants acyl-CoA esters.....	59
Figure 11 : Enzymologie de la $\beta$ -oxydation peroxysomale.....	62
Figure 12 : Mécanisme d'action de la transcription par (PPAR).....	69
Figure 13 : Représentation des activités de PGC-1 $\alpha$ à l'échelle moléculaire. ....	78
Figure 14 : Rôle de PGC-1 $\alpha$ dans la néoglucogenèse hépatique.....	80
Figure 15 : Spectre d'excitation de fluorescence de l'acide férulique.....	102
Figure 16 : Spectre d'émission de fluorescence de l'acide férulique.....	102
Figure 17 : Spectre de balayage d'excitation (A) et d'émission (B) de la solution de l'huile d'Argan commerciale. ....	103
Figure 18 : Spectre de balayage d'excitation (A) et d'émission (B) de la solution de l'huile d'Argan artisanale.....	105
Figure 19 : Spectre de balayage d'excitation (A) et d'émission (B) de la solution de l'huile d'Argan commerciale. ....	107
Figure 20 : Spectre de balayage d'excitation (A) et d'émission (B) de la solution de l'huile d'Argan artisanale.....	108
Figure 21 : Effet de l'oxydation sur l'acide férulique. ....	110
Figure 22 : Concentration de l'acide férulique dans l'huile d'argan artisanale.....	111
Figure 23 : Effet de l'huile d'Argan ou de l'huile d'Olive sur les niveaux relatifs d'expression des ARNm de (A) PPAR $\alpha$ et (B) PGC-1 $\alpha$ , dans le foie des souris.....	135
Figure 24 : Effet de l'huile d'Argan ou de l'huile d'Olive sur l'expression relative protéique de (A) PPAR $\alpha$ et (B) PGC-1 $\alpha$ dans le foie des souris. ....	137
Figure 25 : Effet de l'huile d'Argan ou de l'huile d'Olive sur les niveaux relatifs d'expression des ARNm d' ACOX1, dans le foie de souris. ....	139
Figure 26 : Effet de l'huile d'Argan ou de l'huile d'Olive sur l'expression relative protéique de l'ACOX1 dans le foie des souris. ....	141
Figure 27 : Effet de l'huile d'Argan ou de l'huile d'Olive sur l'expression relative protéique de L-PBE dans le foie des souris.....	142
Figure 28 : Effet de l'huile d'Argan et de l'huile d'Olive sur l'activité enzymatique de l'ACOX1 dans le foie des souris. ....	143
Figure 29 : Effet de l'huile d'Argan ou de l'huile d'Olive sur l'activité enzymatique de la catalase dans le foie des souris. ....	144
Figure 30 : Effet de l'huile d'Argan ou de l'huile d'Olive sur les niveaux relatifs d'expression des ARNm des ACADs, dans le tissu de foie des souris. ....	146
Figure 31 : Effet de l'huile d'Argan ou de l'huile d'Olive sur l'expression relative protéique de l'ACADM au niveau de tissu de foie des souris.....	147
Figure 32 : Effet de l'huile d'Argan et de l'huile d'Olive sur l'activité enzymatique de (A) ACADS et (B) activités spécifiques des ACADM, ACADL et ACADVL vis-à-vis des substrats C8, C12, C16 au niveau de tissu de foie des souris.....	148
Figure 33 : Effet de l'huile d'Argan ou de l'huile d'Olive sur les niveaux relatifs d'expression des ARNm d'HNF4 $\alpha$ , dans le foie des souris. ....	150
Figure 34 : Effet de l'huile d'Argan ou de l'huile d'Olive sur les niveaux relatifs d'expression des ARNm de PEPCK, G6PH et Glut4 dans le foie des souris. ....	151

Figure 35 : Effet de l'huile d'Argan ou de l'huile d'Olive sur l'expression relative protéique de l' HNF4 $\alpha$ dans le foie des souris. ....	152
Figure 36 : Niveaux relatifs d'expression des ARNm de (A) PPAR $\alpha$ et (B) PGC-1 $\alpha$ , dans le foie des souris avec le traitement par les lipopolysaccharides, l'huile d'Argan et les lipopolysaccharides ou par l'huile d'Olive et le lipopolysaccharides. ....	157
Figure 37 : Expression relative protéique de PPAR $\alpha$ (A) et PGC-1 $\alpha$ (B) dans le foie des souris avec le traitement par le lipopolysaccharide, l'huile d'Argan et le lipopolysaccharide ou par l'huile d'Olive et le lipopolysaccharide.....	158
Figure 38 : Niveaux relatifs d'expression des ARNm de l'ACOX1, dans le foie des souris avec le traitement par le lipopolysaccharide, l'huile d'Argan et le lipopolysaccharide ou par l'huile d'Olive et le lipopolysaccharide. ....	160
Figure 39 : Expression relative protéique de l'ACOX1 dans le foie des souris avec le traitement par le lipopolysaccharide, l'huile d'Argan et le lipopolysaccharide ou par l'huile d'Olive et le lipopolysaccharide. ....	161
Figure 40 : Expression relative protéique de L-PBE dans le foie des souris avec le traitement par le lipopolysaccharide, l'huile d'Argan et le lipopolysaccharide ou par l'huile d'Olive et le lipopolysaccharide. ....	162
Figure 41 : L'activité enzymatique de l'ACOX1 dans le foie des souris avec le traitement par le lipopolysaccharide, l'huile d'Argan et le lipopolysaccharide ou par l'huile d'Olive et le lipopolysaccharide. ....	163
Figure 42 : L'activité enzymatique de la catalase dans le foie des souris avec le traitement par le lipopolysaccharide, l'huile d'Argan et le lipopolysaccharide ou par l'huile d'Olive et le lipopolysaccharide. ....	164
Figure 43 : Niveaux relatifs d'expression des ARNm des ACADs, dans le foie des souris avec le traitement par le lipopolysaccharide, l'huile d'Argan et le lipopolysaccharide ou par l'huile d'Olive et le lipopolysaccharide. ....	165
Figure 44 : Expression relative protéique de l'ACADM au niveau de tissu de foie des souris avec le traitement par le lipopolysaccharide, l'huile d'Argan et le lipopolysaccharide ou par l'huile d'Olive et le lipopolysaccharide.....	166
Figure 45 : Activité enzymatique de l'ACADS (A) et activité spécifique des substrats C8, C12, C16 (B) au niveau de tissu de foie des souris avec le traitement par le lipopolysaccharide, l'huile d'Argan et le lipopolysaccharide. ....	168
Figure 46 : Niveaux relatifs d'expression des ARNm de l'HNF4 $\alpha$ , dans le foie des souris avec le traitement par le lipopolysaccharide, l'huile d'Argan et le lipopolysaccharide ou par l'huile d'Olive et le lipopolysaccharide. ....	171
Figure 47 : Expression relative protéique de l'HNF4 $\alpha$ dans le foie des souris avec le traitement par le lipopolysaccharide, l'huile d'Argan et le lipopolysaccharide ou par l'huile d'Olive et le lipopolysaccharide. ....	172
Figure 48 : Niveaux relatifs d'expression des ARNm de PECK, G6PH et Glut4, dans le foie des souris avec le traitement par le lipopolysaccharide, l'huile d'Argan et le lipopolysaccharide ou par l'huile d'Olive et le lipopolysaccharide.....	173
Figure 49 : Effet de l'huile d'Argan ou de l'huile d'Olive sur l'expression relative protéique de l'IL6 (A) et la TNF $\alpha$ (B) dans le foie des souris. ....	175
Figure 50 : Niveaux relatifs d'expression des ARNm de l'IL6 (A) et de la TNF $\alpha$ (B) dans le foie des souris avec le traitement par le lipopolysaccharide, l'huile d'Argan et le lipopolysaccharide ou par l'huile d'Olive et le lipopolysaccharide.....	176
Figure 51 : Effet de l'huile d'Argan ou de l'huile d'Olive sur l'expression relative protéique de l'IL4 (A) et de l'IL10 (B) dans le foie des souris. ....	177
Figure 52 : Niveaux relatifs d'expressions des ARNm de l'IL4 (A) et de l'IL10 (B) dans le foie des souris avec le traitement par le lipopolysaccharide, l'huile d'Argan et le lipopolysaccharide ou par l'huile d'Olive et le lipopolysaccharide.....	177

# **LISTE DES TABLEAUX**

---

Tableau 1 : Comparaison de la composition des acides gras de l'huile d'argan aux d'autres huiles naturelles... 38	38
Tableau 2: composition chimique de l'huile d'Argan en stérols et en tocophérols selon les différents procédés d'extraction et selon différentes origines géographique ..... 39	39
Tableau 3: composition de l'huile d'argan en polyphénols ..... 40	40
Tableau 4 : les enzymes peroxysomales impliqués dans la synthèse de peroxydes ..... 64	64
Tableau 5 : les enzymes peroxysomales impliqués dans la dégradation des peroxydes ..... 65	65
Tableau 6 : Ligands spécifiques de l'isoforme PPAR $\alpha$ . (Desvergne et Wahli, 1999) ..... 71	71
Tableau 7: Récapitulation des effets de l'huile d'argan et l'huile d'olive sur le taux d'expression relatifs des ARNm des gènes de métabolisme lipidique ..... 153	153
Tableau 8: Récapitulation des effets de l'huile d'argan et l'huile d'olive sur l'activité enzymatique des enzymes clés de la voie de la $\beta$ -oxydation ..... 153	153
Tableau 9: Résumé des effets des différents traitements sur le taux d'expression relatifs des ARNm des gènes de métabolisme lipidique ..... 178	178
Tableau 10: Résumé des effets des différents traitements sur l'activité enzymatique des enzymes clés de la voie de la $\beta$ -oxydation..... 179	179
Tableau 11: Résumé des effets des différents traitements sur le taux d'expression relatifs des ARNm des gènes de l'inflammation ..... 179	179



# **ABBREVIATIONS**

ABC	:	ATP Binding Cassette
ACAA1	:	Acétyl-Coenzyme A Acyltransférase 1
ACADL	:	Acyl-CoA Dehydrogenase long Chain
ACADM	:	Acyl-CoA Dehydrogenase Medium Chain
ACADS	:	Acyl-CoA Dehydrogenase Short Chain
ACADVL	:	Acyl-CoA Dehydrogenase Very long Chain
ACOX	:	Acyl-CoA OXydase
ADN	:	Acide DésoxyriboNucléique
ADNc	:	ADN complémentaire
AGLC	:	Acide Gras à Longue Chaîne
AGTLC	:	Acide Gras à Très Longue Chaîne
ALDH	:	Aldéhyde DésHydrogénase
AMPc	:	Adénosine MonoPhosphate cyclique
AO	:	Argan Oil
ARNm	:	Acide RiboNucléique messenger
ATP	:	Adénosine TriPhosphate
BAT	:	Brown Adipose Tissue
BSA	:	Bovine Serum Albumin
CAT	:	Carnitine AcéTyltransférase.
Cl	:	Contrôle
CoA	:	Coenzyme A
CPT	:	Carnitine Palmitoyl Transférase
CREB	:	cAMP Responsive Element Binding protein
CT	:	Threshold Cycle
DBD	:	DNA Binding Domain
DCIP	:	DiChlorophénolIndoPhénol
DHA	:	DocosaHexaenoic Acid
DHCA	:	DiHydroxyCholestanoïque Acid
DMEM	:	Dulbecco's Modified Eagle Medium
dNTP	:	désoxyriboNucléotide TriPhosphate
D-PBE	:	D- Peroxisomal Bifunctional Enzyme
DPBS	:	Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline
DTT	:	DiThioThreitol
EDTA	:	EthyleneDiamineTetraacetic Acid
ER	:	Estrogen Receptor
ERE	:	Estrogen Receptor Element
FA	:	Fatty Acid
FAD	:	Flavin Adenine Dinucleotide
Foxo1	:	Forkhead box O
FXR	:	Farnesoid X Receptor
g	:	gramme

G6PH	:	Glucose-6-Phosphatase
GLUT	:	Glucose Transporter
GR	:	Glucocorticoid Receptor
GTP	:	Guanine TriPhosphate
HAT	:	Histone Acétyl-Transférerase
HDAC	:	Histone Déacétylase
HDL	:	High Density Lipoprotein
HNF-4 $\alpha$	:	Hepatocyte Nuclear Factor-4 $\alpha$
HPCL	:	HydroxyPhytanoyl-CoA Lyase
HRP	:	HorseRadish Peroxidase
I $\kappa$ B	:	Inhibitor $\kappa$ B
IL	:	InterLeukine
IRD	:	Infantile Refsum Disease
kDa	:	KiloDaltons
Kg	:	kilogramme
LDL	:	Low Density Lipoprotein
L-PBE	:	L- Peroxisomal Bifunctional Enzyme
LPS	:	LipoPolySaccharide
LXR $\alpha$	:	Liver X Receptor $\alpha$
MEF2C	:	Myocyte Enhancer Factor 2
MEM	:	Minimum Essential Medium Eagle
min	:	minute
ml	:	millilitre
mM	:	milliMolaire
mPTS	:	membrane Peroxisomal Targeting Signal
mtTFA	:	Mitochondrial Transcription Factor A
NAD	:	Nicotinamide Adenine Dinucleotide
NALD	:	AdrénoleucoDystrophie Néonatale
NcoR	:	Nuclear coRepressor
NF $\kappa$ B	:	Nuclear Factor $\kappa$ B
nm	:	nanometer
NRF1	:	Nuclear Respiratory Factor 1
OO	:	Olive Oil
OTP	:	Acide OrtylthioPropionique
p38-MAPK	:	p38-Mitogen-Activated Protein Kinase
PBD	:	Peroxisome Biogenesis Disorder
PBE	:	Peroxisomal Bifunctional Enzyme
PCR	:	Polymerase Chain Reaction
PEPCK	:	PhosphoEnolPyruvate CarboxyKinase
Pex	:	Peroxines
PFA	:	ParaFormAldéhyde

---

PGC-1	:	PPARGamma Coactivator-1
PMP	:	Protéines Membranaires du Peroxysome
PPAR	:	Peroxisome Proliferator Activated Receptor
PPRE	:	Peroxisome Proliferator Response Element
PPs	:	Proliférateurs des Peroxysomes
PRIS	:	Acide Pristanique
PVDF	:	membranes PolyVinylidène DiFluoride
qPCR	:	quantitative real time Polymerase Chain Reaction
RCDP	:	ChonDroplasié Rhizomélique Ponctué
REST	:	Relative Expression Software Tool
RFU	:	Relative Fluorescence Units
RIP140	:	Receptor Interacting Protein of 140
RNS	:	Reactive Nitrogen Species
ROS	:	Reactive Oxygen Species
RXR	:	Retinoid X Receptor
SCP	:	Protéine Stérol-Carrier
SDS	:	Sodium Dodécyl Sulfate
SEM	:	Structural Equation Modeling
SMRT	:	Silencing Mediator for Retinoid and Thyroid Hormone Receptor
SOD	:	Super Oxyde Dismutase
SRC-1	:	Steroid Receptor Coactivator-1
SREBP-1	:	Sterol Responsive Element Binding Protein-1
STAT	:	Signal Transducer and Activator of Transcription
SVF	:	Sérum de Veau Fœtal
TG	:	TriGlycéride
THCA	:	TriHydroxyCholestanoïque Acid
TNF $\alpha$	:	Tumor Necrosis Factor $\alpha$
V	:	Volt
Vf	:	Volume final
VLDL	:	Very Low Density Lipoprotein
WAT	:	White Adipose Tissue
X-ALD	:	AdrénoleucoDystrophie liée au chromosome X
ZS	:	Syndrome de Zellweger
$\mu$ g	:	microgramme
$\mu$ l	:	microlitre
$\mu$ M	:	micromolaire

# **INTRODUCTION**

Actuellement, la part de la nutrition a pris une place importante dans la protection et la lutte contre les maladies cardiovasculaires. De nombreux travaux de recherche sont focalisés sur l'apport nutritionnel en lipides et en antioxydants, et par voie de conséquence se penchent avec un intérêt toujours grandissant sur la composition en acides gras et en micronutriments des huiles et graisses végétales et leurs effets physiologiques et moléculaires sur le métabolisme chez l'homme. En effet, durant ces dix dernières années, parmi les huiles naturelles, l'huile d'Argan a reçu une grande attention de la part des chercheurs pour sa composition à la fois équilibrée en acides gras (saturés et insaturés) et riche en antioxydants (polyphénols et tocophérols).

Bien que les acides gras aient un rôle très important dans l'homéostasie lipidique, du fait qu'ils soient aussi bien utilisés comme source d'énergie que participés à la régulation de la signalisation cellulaire ; une altération de leurs taux dans l'organisme présente un facteur de risque dans plusieurs maladies métaboliques tels que les maladies cardiovasculaires, l'hyperlipidémie, l'obésité et la résistance à l'insuline et également certaines maladies neurodégénératives. Il est donc indispensable, en l'occurrence chez l'homme, d'une part de définir le rôle des acteurs métaboliques impliqués dans le métabolisme des acides gras ; et d'autre part, d'analyser les effets de la consommation de telle ou telle huile végétale sur le métabolisme des lipides. Dans le cas de l'huile d'Argan, un certain nombre d'études a montré chez l'homme les effets bénéfiques de sa consommation régulière, notamment sur le métabolisme des lipoprotéines. Cependant, les bases moléculaires de ses effets bénéfiques restent non élucidées.

L'objectif de mes travaux de thèse a été centré sur l'étude des effets métaboliques et anti-inflammatoires de l'huile d'Argan *in vivo* chez la souris et *in vitro* sur un modèle cellulaire (fibroblastes) de la pseudo-adrenoleucodystrophie néonatale, une maladie neurodégénérative peroxysomale. Pour ce faire, nous avons évalué les effets de l'huile d'Argan sur la régulation de l'expression des gènes impliqués dans les voies de  $\beta$ -oxydations mitochondriale et peroxysomale au niveau post-transcriptionnel et post-translationnel ainsi que son impact sur la biogenèse du peroxysome. Nous avons également évalué le potentiel anti-inflammatoire de l'huile d'Argan chez la souris.

Cette étude a été présentée en quatre parties, débutée par un rappel bibliographique sous forme de synthèse de différentes études scientifiques concernant la composition de l'huile d'Argan et ses effets sur la santé humaine. Ainsi qu'une présentation détaillée de la voie du

métabolisme lipidique et ses acteurs métaboliques impliqués dans la régulation de la voie du métabolisme des acides gras et de la néoglucogénèse. Ensuite, nous avons présenté les conditions des expériences et décrit les différentes techniques utilisées dans ce travail.

Les résultats de cette étude sont présentés en quatre parties :

- Propriétés de l'huile d'Argan d'origines artisanale et commerciale
- effets métaboliques de l'huile d'Argan sur les fibroblastes de la pseudo-adrénoleucodystrophie néonatale (sous forme d'article)
- Effet de l'huile d'Argan sur le métabolisme lipidique et glucidique chez la souris
- Effet préventif de l'huile d'Argan contre la perturbation du métabolisme lipidique par les endotoxines (lipopolysaccharides) chez la souris

A la fin, nous avons fait une synthèse des résultats obtenus dans ce travail sous forme d'une discussion générale.

# **BIBLIOGRAPHIE**



## I. L'huile d'argan

### 1. L'arganier

#### 1.1 Aspect historique

Les premières données sur l'arganier ont été citées par les géographes et les savants arabes qui étudièrent plus particulièrement la région du Maghreb, tels Al-Bekri (XI<sup>ème</sup> siècle) et Chérif Al-Idrissi (XII<sup>ème</sup> siècle). L'une des plus anciennes mentions de l'arganier et du mode d'obtention artisanal de l'huile est celle du médecin andalous Dya Aldin Ibn Al Baytar (XII<sup>ème</sup> siècle) dans son ouvrage « Traité des simples » (Gonzalez, 1997) (Adlouni, 2010).

#### 1.2 Répartition géographique

L'arganier, *Argania spinosa* (L.) Skeels, est une espèce endémique du Maroc et le seul représentant de la famille tropicale des Sapotaceae au Maroc (Morton, 1986). C'est un arbre forestier-fruitier et fourrager, couvre actuellement près de 8,280 km<sup>2</sup> (Guillaume et Charrouf, 2011) en surface -presque continue- et s'étend depuis l'embouchure de l'oued Tensift au nord, jusqu'à l'embouchure de l'oued Drâa au sud (Figure 1). L'arganier est également présent dans la plaine de Souss, sur le versant sud du Haut-Atlas occidental et sur les versants septentrional et méridional de l'Anti-Atlas occidental jusqu'à des altitudes entre 1 300 et 1 500m (Msanda, 2005). Au delà de cette localisation géographique, deux petites aires d'arganier sont répertoriées dans la haute vallée Grou au sud-est de Rabat et dans le piémont nord-ouest des Béni-Snassen, près d'Oujda (El Mousadik et Petit, 1996).

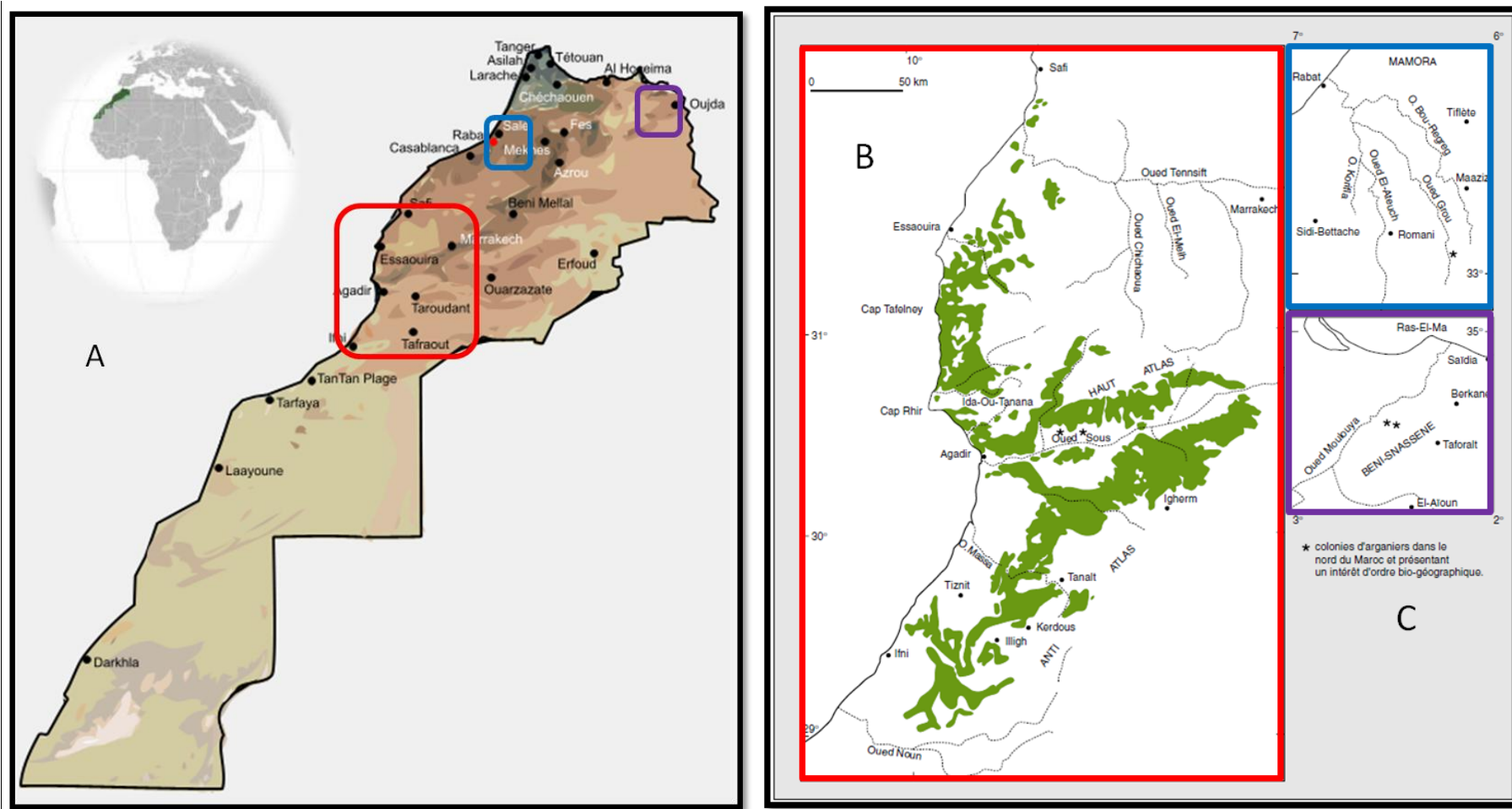


Figure 1 : Aire de répartition de l'arganier au Maroc

A, Carte du Maroc situant la répartition de l'arganier le long du littoral océanique marocain. B, Agrandissement du carré rouge (en A) représentant l'aire géographique de l'arganier depuis l'embouchure de l'oued Tensift au nord, jusqu'à l'embouchure de l'oued Drâa au sud du Maroc et dans la plaine du Souss. C, Agrandissement du carré bleu et du carré violet (en A) représentant successivement deux stations isolées de l'arganier au sud-est de Rabat et au nord-ouest des Béni-Snassen. D'après (Msanda, 2005).

### 1.3 Importance et rôles

En 2007, l'arganier a été déclaré « espèce protégée » par l'Organisation des Nations unies de l'Education, la Science et la culture (UNESCO) en raison de son importance écologique et socio-économique qu'il procure (Venegas et al., 2011).

- Sur le plan écologique, l'arganier joue un rôle primordiale dans la protection du sol contre les érosions hydrique et éolienne. De plus, il participe à la pérennité du couvert végétal dans des conditions climatiques particulièrement défavorables. Il est également considéré comme une barrière naturelle face à l'avancée du désert au sud du Maroc (Charrouf et Guillaume, 1999).
- Sur le plan socio-économique, l'importance de l'arganier est souligné par le fait qu'il régule l'existence de nombreuses populations rurales grâce aux usages multiples qu'offre cet arbre, aussi bien au niveau du pâturage, de la préparation du bois de chauffage, ainsi que de la production d'huile d'argan vierge. Cette dernière joue un rôle économique important pour le Maroc. Ainsi, la production annuelle totale d'huile d'argan atteint environ 4 000 tonnes (Khallouki et al., 2003). La demande mondiale de cette huile augmente jour après jour surtout au niveau des marchés européen, japonais et états-unien (Gonzálvez .A., 2010).

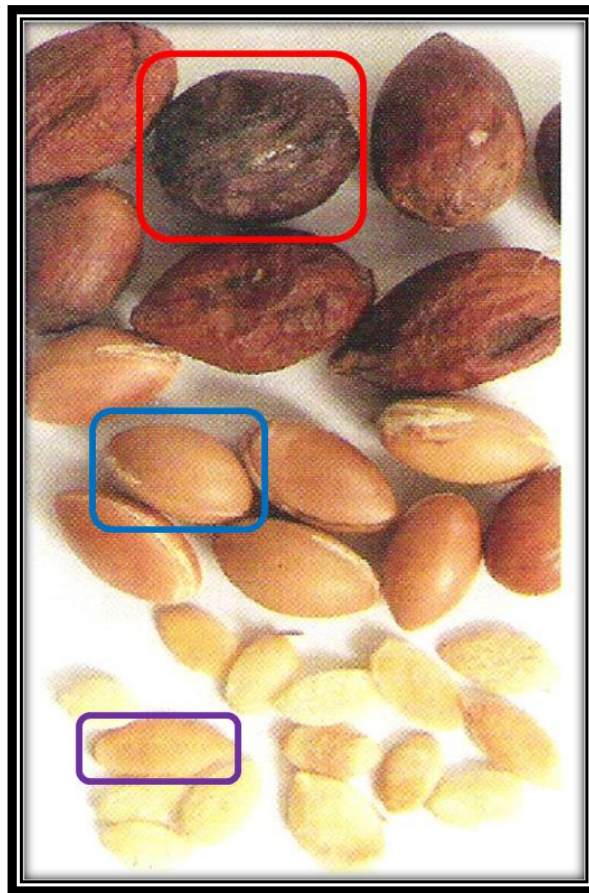
## 2. L'huile d'argan

L'huile d'argan représente économiquement le produit le plus rentable de l'arganier, elle est extraite à partir des fruits oléagineux (Cherki et al., 2006). Cette huile représente un produit international relativement nouveau et elle est exportée uniquement par le Maroc. Cependant, les distributeurs en Europe et en Amérique du Nord redistribuent l'huile dans le monde entier sur les marchés étrangers en Amérique du Nord, en Europe et en Asie. La demande croissante pour l'huile d'Argan a eu pour conséquence une augmentation très importante de son prix sur le marché européen (100€/litre). Ce qui classerait cette huile dans la gamme d'aliment de luxe (Zougagh et al., 2011).

### 2.1 Extraction de l'huile d'argan

L'huile d'argan est extraite suivant plusieurs procédés à partir de l'amande du fruit (Figure 2), soit selon la méthode traditionnelle, ou par presse ou en utilisant des solvants d'extraction. l'utilisation de ces différentes huiles est destinée à la nutrition, la cosmétique ou la médecine (Charrouf et Guillaume, 1999). Récemment, il a été montré que l'origine géographique des fruits d'argan et la méthode d'extraction utilisée pour produire de l'huile, ont

une influence considérable sur sa composition et ses caractéristiques physico-chimiques (Hilali et al., 2005).



*Figure 2 : Photo du fruit de la graine et de l'amande de l'Arganier*

Le cadre rouge représente un fruit de l'Arganier, le cadre bleu représente une graine de l'Arganier et le cadre violet représente une amande de l'Arganier. D'après (Z. Charrouf et al., 2007)

### 2.1.1 Extraction artisanale

Pendant des siècles, l'huile d'argan vierge a été préparée exclusivement par les femmes qui ont utilisé un processus traditionnel transmis de génération en génération. Ce procédé traditionnel comprend cinq étapes : dépulpage des fruits, concassage de la coque entre deux pierres, torréfaction de l'amande oléagineuse, broyage des amandes torréfiées à l'aide d'une meule en pierre et pression manuelle de la pâte pour l'obtention de l'huile qui est séparée par décantation (Charrouf et Guillaume, 1999). À l'heure actuelle, cette méthode traditionnelle, est utilisée uniquement pour la consommation domestique locale. Cependant, l'adaptation récente d'une méthode d'extraction semi-industrialisée ou semi-automatique dans les coopératives a permis de commercialiser une huile d'Argan vierge de qualité certifiée (Cabrera-Vique et al., 2012).

### 2.1.2 Extraction par la presse mécanique

Depuis quelques années, le processus de l'extraction par une presse mécanique a été introduit dans les coopératives produisant l'huile d'argan. Dans ce processus, le dépulpage des fruits est réalisé en utilisant des machines « dépulpeuse-gratteuse », la torréfaction est faite par des torréfacteurs à gaz et la pression de la pâte pour l'obtention de l'huile est réalisée par des machines de presse (Charrouf et Guillaume, 2008). Ce procédé permet à la fois de s'affranchir de l'étape de mélange (pâte/eau), de réduire considérablement le temps de production, d'atteindre un rendement supérieur à 45% (volume/poids d'amande) et de garantir une reproductibilité d'extraction de l'huile d'Argan de qualité équivalente (Charrouf et Guillaume, 1999).

En effet, l'huile pressée à froid et l'huile vierge sont deux termes qui peuvent être source de confusion. Dans ce sens, des éclaircissements ont été récemment apportés à ce problème par Matthäus et Spenser (Matthäus et Spener, 2008). Ces derniers ont démontré que le terme huile pressée à froid peut être utilisé lors d'extraction mécanique de la matière première sans application de chaleur. Toutefois, le traitement thermique est autorisé lors de la préparation de la matière première, ou/et lors de la préparation de l'huile après la pression de la pâte. Selon cette définition, l'huile d'Argan comestible est une huile pressée à froid des amandes torréfiées de l'arganier (Monfalouti et al., 2010). Donc, l'huile pressée à froid est également une l'huile vierge, tandis qu'une huile vierge n'est pas nécessairement une huile pressée à froid.

### 2.1.3 Extraction par les solvants organiques

Pour l'industrie ou les applications au laboratoire l'huile d'argan est extraite avec un solvant volatil lipophile (ex : hexane). Après évaporation du solvant, l'huile est obtenue avec un rendement de 50-55%. Cette huile sera destinée exclusivement à l'usage cosmétologique car elle est dépourvue de goût et d'arôme et par conséquent elle ne serait pas appréciée par le consommateur (Charrouf et Guillaume, 1999).

## 2.2 Composition de l'huile d'argan

L'huile d'argan a une composition particulière, elle est caractérisée par des taux élevés d'acides linoléique et oléique. De plus, elle est riche en polyphénols et en tocophérols, présentant une activité antioxydante. L'huile d'argan contient aussi d'autres composés mineurs tels que les caroténoïdes, les squalènes, les stérols et les xanthophylles. Ces composés pourraient contribuer à la valeur nutritionnelle de l'huile d'argan, à ses propriétés

bénéfiques pour la santé, ainsi qu'à ses caractéristiques organoléptiques et diététiques et à sa conservation (Cherki et al., 2006; Khallouki et al., 2003; Marfil et al., 2008).

### 2.2.1 Fraction glycéridique (saponifiable) de l'huile d'argan

La fraction triglycéridique représente 99% de l'huile d'argan, dont les triglycérides sont largement majoritaires avec 95 %. L'analyse des acides gras de l'huile d'argan montre une prédominance de l'acide oléique et l'acide linoléique, près de 80%, qui ont la particularité d'être en proportions équilibrées dans l'huile d'argan par rapport aux autres huiles naturelles (Cherki et al., 2005). Une étude comparative de la composition des acides gras de l'huile d'Argan aux autres huiles naturelles (Tableau 1) a montré que la proportion de l'acide oléique dans l'huile d'argan (43-49%) est supérieure à celle de l'huile de tournesol, de soja, de maïs, de pépins de raisin ou de sésame. Tandis que cette proportion est inférieure à celle de l'huile d'olive, d'amande et d'arachide. Contrairement à la proportion de l'acide linoléique (29–36%) dans l'huile d'Argan, dont la concentration est inférieure à celle des huiles de tournesol, de soja, de maïs, de pépins de raisin et de sésame, et supérieure à celle des huiles d'olive, d'amande et d'arachide. L'huile d'Argan est plus riche en acides gras saturés par rapport aux autres huiles naturelles, et contient très peu d'acide Linoléique.

*Tableau 1 : Comparaison de la composition des acides gras de l'huile d'argan aux d'autres huiles naturelles.*

Le tableau représente une étude comparative de la composition en acides gras majoritaires entre l'huile d'Argan et d'autres huiles naturelles. Les valeurs représentent des pourcentages des acides gras dans la fraction triglycéridique totale. D'après (Cabrera-Vique et al., 2012).

	Palmitique 16:00	Stéarique 18:00	Oleique 18:01	Linoléique 18:02	Linoléique 18:03	Références
L'huile d'argan	11,5-15	4-7	43-49	29-36	0,1	(Charrouf et Guillaume, 2010; Khallouki et al., 2003)
L'huile d'olive	7,5-15,6	1,4-3,4	60,9-82,1	4,5-16,1	0,4-1,2	(Ollivier et al., 2003)
L'huile de tournesol	7,4	4,56	25,17	60,15	0,3	(Filip et al., 2011)
L'huile de soja	6,0-9,78	2,2-3,08	26,1	50,1-53,98	5,67-14,5	(Araujo et al., 2010; Ayorinde et al., 2000)
L'huile d'amande	6,85	1,29	69,24	21,52	0,16	(Maguire et al., 2004)
L'huile d'arachide	7,5-14,4	3,1-4,6	40,3-64,7	11,3-37,1	1,0-1,4	(Sundaram et al., 2010)
L'huile de maïs	13,4	1,5	27,4	56	0,9	(Karoui et al., 2010)
L'huile de pépins de raisin	8,3-9,3	3,2-4,3	12,2-18,7	67,6-72,9	0,3-0,9	(Rubio et al., 2009)
L'huile de sésame	3,9-8,7	3,8-9,5	31,7-37,6	42,4-51,6	3,8-9,4	(Azeez et Morakinyo, 2011)

### 2.2.2 Fraction insaponifiable de l'huile d'argan

La fraction insaponifiable représente 1% de l'huile d'Argan, et elle est caractérisée par une composition riche en stérols et en antioxydants tels que les polyphénols, et plus particulièrement les tocophérols (Khallouki et al., 2003).

La composition de cette fraction insaponifiable est influencée par l'origine géographique et le processus d'extraction de l'huile d'argan (Hilali et al., 2005) (Tableau 2).

Tableau 2: composition chimique de l'huile d'Argan en stérols et en tocophérols selon les différents procédés d'extraction et selon différentes origines géographique

Le tableau représente une comparaison des taux de stérols et de tocophérols, réalisée à partir de quatre études<sup>1</sup> La composition de l'huile d'Argan en stérols et en tocophérols selon plusieurs paramètres des différents procédés d'extraction : l'extraction mécanique traditionnel ou par solvant, la torréfaction, le dépulpage et selon l'origine géographique des fruits.

Méthode d'extraction	Extraction mécanique							Extraction traditionnelle				Extraction par solvant			
Torréfaction	Amande torréfiée					Amande non-torrifiée		Amande torréfiée			Amande non-torrifiée		Amande torréfiée		
Dépulpage	mécanique							manuel	animal (chèvre)			mécanique			
Références	1	2	4	4	3	2	4	2	2	4	4	4	4	4	
Origine géographique	Région d'Agadir	Tiout Province de Taroudant	Tizdi région de Essaouira	Benaizna ssen	Tamanar région de Essaouira	Tiout Province de Taroudant	Tizdi région de Essaouira	Tiout Province de Taroudant	Tiout Province of Taroudant	Tamanar région de Essaouira	Tamanar région de Essaouira	Tamanar région de Essaouira	Ighrem	Tamanar région de Essaouira	
Tocophérols mg/kg huile															
$\alpha$ -Tocophérol	44.5±6.2	16 ± 1.6	26.6	37.2	35	16 ± 1.6	32.7	13 ± 1.3	30 ± 3.0	29.6	33.0	32.0	49.3	29.6	
$\beta$ -Tocophérol	3.1±0.8											1.1		1.2	
$\gamma$ -Tocophérol	616.9±15.8	403 ± 40.3	631.3	701.1	480	382 ± 38.2	621.1	345 ± 34.5	283 ± 28.3	619.1	599.3	640.0	545.9	581.3	
$\delta$ -Tocophérol	50.8±6.8	38 ± 3.8	59.5	37.2	122	21 ± 2.1	50.9	32 ± 3.2	21 ± 2.1	50.2	46.4	45.4	38.7	56.3	
Total			717.4	775.5	636		704.7			698.9	678.7	718.5	633.9	668.4	
Stérols mg/100 g d'huile															
Schotténol		47 ± 2.4	46.66	48.47	142	44 ± 2.2	43.39	46 ± 2.3	45 ± 2.3	46.03	47.43	44.62	46.12	45.39	
Spinastérol		36 ± 1.8	37.07	35.44	115	39 ± 2.0	38.50	38 ± 1.9	42 ± 2.1	36.11	38.54	37.05	39.29	36.91	
Stigmasta-8,22-dien-3-ol		4 ± 0.2	4.31	4.85	9	5 ± 0.3	4.57	5 ± 0.3	4 ± 0.2	4.08	3.01	4.21	5.40	4.99	
Stigma 7,24--dien-3-ol		6 ± 0.3	4.81	2.57	29	6 ± 0.3	5.94	5 ± 0.3	5 ± 0.3	4.48	4.67	6.89	3.55	4.48	
Campestérol			0.20	0.11			0.17			0.16	0.14	0.16	0.31	0.20	

1 : (Harhar et al., 2011). 2 : (Matthäus et al., 2010). 3 : (Khallouki et al., 2003). 4 : (Hilali et al., 2005).



### a. Les polyphénols

Les polyphénols présents dans les huiles sont des molécules bioactives qui ont une activité antioxydante. Ils sont principalement responsables de la prévention contre l'auto-oxydation des acides gras insaturés, ce qui augmente la durée de vie de ces huiles.

La composition phénolique de l'huile d'argan (Tableau 3) est caractérisée par la présence de quatre polyphénols, acide vanillique, acide syringique, acide férulique et le tyrosol. Avec une prédominance de l'acide férulique qui représente plus que 94% de la fraction des polyphénols (Khallouki et al., 2003). Cependant, La teneur en polyphénols dans l'huile d'Argan (3263µg/Kg) est inférieure à celle de l'huile d'olive (793mg/Kg), par contre elle est supérieur à celle des autres huiles végétales comestibles (Pellegrini et al., 2003). Les propriétés pharmacologiques de l'huile d'argan sont généralement attribuées à ses composés phénoliques.

*Tableau 3: composition de l'huile d'argan en polyphénols*

Composition en Polyphénols	µg/kg de l'huile
acide Vanillique	67
acide Syringique	37
acide Férulique	3147
Tyrosol	12
Total	3263

### b. Les stérols

L'une des particularités des huiles d'argan est la présence des stérols spécifiques (le Spinastérol et Schotténol) qui ne sont pas présents dans les huiles d'olive et de tournesol (Khallouki et al., 2003). L'huile d'Argan contient 5 stérols (Tableau 2), dont les deux principaux sont le Spinastérol et le Schotténol, les trois autres le stigma-8,22-dien-3-ol, et le stigma-7,24-dien-3-ol ainsi que le Campestérol sont présents en faible quantité (Hilali et al., 2005).

Le Tableau 2 présente une compilation de résultats provenant de quatre études sur la composition de l'huile d'Argan en stérols 1 :(Harhar et al., 2011) 2 :(Matthäus et al., 2010) 3 :(Khallouki et al., 2003) 4 :(Hilali et al., 2005) (Tableau 2). Cette comparaison montre que la composition l'huile d'Argan en stérols n'est pas influencée par les différents procédés d'extraction et par l'origine géographique des fruits. Toutefois, les résultats de Khalouki et al. sont très différents comparativement aux trois autres études. Ces variations pourraient être

dues aux variations climatiques des paramètres saisonniers (précipitations, ensoleillement température...etc).

### c. Les tocophérols

Les tocophérols sont des antioxydants naturels, rencontrés dans les huiles végétales sous quatre formes, l' $\alpha$ -tocophérol (vitamine E), le  $\beta$ -tocophérol, le  $\gamma$ -tocophérol et le  $\delta$ -tocophérol. L'huile d'argan est deux fois plus riche en tocophérol que l'huile d'olive, en particulier le  $\gamma$ -tocophérol qui représente la partie majoritaire avec plus que 75% des tocophérols totaux (Khallouki et al., 2003). La composition en tocophérols est très variable d'une étude à l'autre, selon le procédé utilisé d'extraction de l'huile d'argan et de l'origine géographique des fruits (Tableau 2). La comparaison présente dans le tableau de quatre études montre que la composition en tocophérols est très variable d'un procédé à l'autre et même en utilisant des fruits de la même région. Cette composition est également influencée par l'origine géographique des fruits car avec le même procédé d'extraction de l'huile d'argan pour des fruits provenant de deux régions différentes, les résultats des taux obtenus en tocophérols sont très différents (Tableau 2).

## 2.3 Intérêts thérapeutiques

### 2.3.1 Médecine traditionnelle

Dans les zones de sa production, l'huile d'argan, est non seulement une huile alimentaire et diététique mais aussi utilisée pour ses qualités thérapeutiques en médecine traditionnelle. Les effets bénéfiques et thérapeutiques de la consommation de l'huile d'argan sont revendiqués depuis plusieurs siècles.

Diverses propriétés biologiques largement reconnues par la médecine traditionnelle ont reçu une confirmation scientifique. Notamment, pour les utilisations traditionnelles de l'huile d'argan pour diminuer le cholestérol et l'hypertension artérielle (Berrada et al., 2000; Berrougui et al., 2003; Drissi et al., 2004) ou pour traiter les maladies de peau comme l'acné juvénile et les pustules de la varicelle (Charrouf et Guillaume, 1999).

D'autres effets bénéfiques, notamment analgésiques et anti-inflammatoires (Alaoui et al., 1998), des propriétés anti-microbiennes et lipolytique (Charrouf et Guillaume, 1999) ont été également décrits pour des dérivés de saponine.

### 2.3.2 Prévention des maladies cardiovasculaires

La composition riche de l'huile d'argan en acide gras mono et polyinsaturés, en stérols ainsi qu'en antioxydants (1%) tels que les polyphénols et les tocophérols (Khallouki et al., 2003) lui confère un effet préventif contre les maladies cardiovasculaires (Benajiba et al., 2002). En effet, chez l'homme des enquêtes épidémiologiques menées au Maroc sur des sujets consommateurs de l'huile d'argan ont mis en évidence une diminution de 50% du risque de développer une hypertension artérielle (Berrougui et al., 2004), un taux plasmatique élevé pour la vitamine E et des taux en triglycéride et en LDL inférieurs à ceux des sujets qui ne consomment pas cette huile (Drissi et al., 2004). Les études de Derouiche et al. ont montré que la consommation de l'huile d'Argan ou de l'huile d'olive induit une augmentation des taux de HDL plasmatiques, mais seule la consommation d'huile d'Argan entraîne une diminution significative (17,5 %) du taux de triglycérides plasmatiques (Derouiche et al., 2005a).

Par ailleurs, chez le rat hypertendu traité à l'huile d'argan, les données montrent une diminution de la pression artérielle systolique et diastolique (Berrougui et al., 2004). Ceci est accompagné par une diminution de 37 % du taux de cholestérol sanguin, de 67 % des LDL, de 31 % des triglycérides et de 13 % du poids corporel (Berrougui et al., 2003).

L'ensemble de ces résultats suggère que l'huile d'argan pourrait être utilisée dans une approche de prévention nutritionnelle pour prévenir et/ou retarder la progression des maladies cardiovasculaires.

### 2.3.3 Prévention du cancer de prostate

L'alimentation peut avoir une forte influence sur certains types de cancer tels que les cancers du sein, de la prostate ou du tube digestif (Bennani et al., 2007). En effet, Plusieurs auteurs ont souligné les effets antiprolifératifs de l'huile d'argan dans différentes lignées cellulaires cancéreuses, suggérant que cette huile peut avoir des propriétés chimio-protectrice. Les études de Drissi et Bennani ont montré que différents composés obtenus à partir d'huile d'argan (polyphénols, stérols, tocophérols, et des saponines) exercent des effets antiprolifératifs et pro-apoptotiques dans des lignées cellulaires cancéreuses prostatiques (Bennani et al., 2007; Drissi et al., 2006).

#### 2.3.4 Prévention du diabète

Chez l'homme, jusqu'à présent aucune étude n'a été faite pour évaluer l'effet bénéfique de l'huile d'argan sur le diabète. Cependant, quelques études chez l'animal montrent que cette huile pourrait avoir un effet antidiabétique. Ces effets observés sont attribués à son profil en acides gras et sa haute teneur en tocophérols et en acide férulique qui améliorent le statut antioxydant au niveau des tissus (Samane et al., 2009; Samane et al., 2006). Une étude récente de Bellahcen et al. indique que l'administration de l'huile d'argan vierge à des rats n'a aucun effet sur le niveau de la glycémie à jeun. Néanmoins, dans un modèle de diabète induit par l'administration d'Alloxane, les résultats décrivent une diminution du taux de glucose dans le sang, une augmentation du glycogène hépatique et la prévention de la perte de poids chez les rats diabétiques prétraités avec huile d'argan (2 ml / kg) pour 7 jours avant l'induction d'un diabète de type 1 (Bellahcen et al., 2012).

Actuellement, au sein de la communauté scientifique, l'intérêt pour l'huile d'argan et pour ses effets physiologiques s'est considérablement développé, ce qui a eu pour résultat de faire passer le statut de cette huile d'un produit alimentaire diététique à celui d'un produit très prisé pour ces qualités antioxydantes et nutritionnelles. Cependant, bien qu'un certain nombre d'études ont déterminé le rôle bénéfique et préventif de la consommation de l'huile d'argan pour les maladies cardiovasculaires, le cancer et les diabètes, les bases moléculaires de ces effets restent à élucider. En effet, la composition de l'huile d'argan en acides gras et en antioxydants lui confère la possibilité d'avoir des effets bénéfiques sur le métabolisme lipidique ainsi qu'un potentiel préventif anti-inflammatoire.

## II. Métabolisme des acides gras

Les organismes possèdent un potentiel d'adaptation de leur activité métabolique en fonction des changements nutritionnels. Cette adaptation passe par la modulation du niveau d'expression d'enzymes spécifiques par la régulation transcriptionnelle de l'expression génique et de contrôle de leurs activités enzymatiques par la régulation allostérique (Desvergne et al., 2006). Ces mécanismes d'adaptation visent à rétablir l'homéostasie énergétique, notamment au niveau lipidique (Desvergne et Wahli, 1999).

En effet, la mitochondrie et le peroxysome jouent un rôle très important dans le métabolisme lipidique du fait qu'ils interviennent dans les voies d'anabolisme et de catabolisme des acides gras (Schrader et Yoon, 2007; Wanders et al., 2010).

La dégradation des acides gras dans la mitochondrie et dans le peroxysome est assurée dans chacun de ces organites par une voie de la  $\beta$ -oxydation (Schrader et Yoon, 2007). Ces deux voies sont contrôlées au niveau transcriptionnel de gènes codant des enzymes clés par des régulateurs tels que les facteurs de transcription et leurs coactivateurs (Kidani et Bensinger, 2012; Puigserver et Spiegelman, 2003).

### 1. La mitochondrie

#### 1.1 Généralité

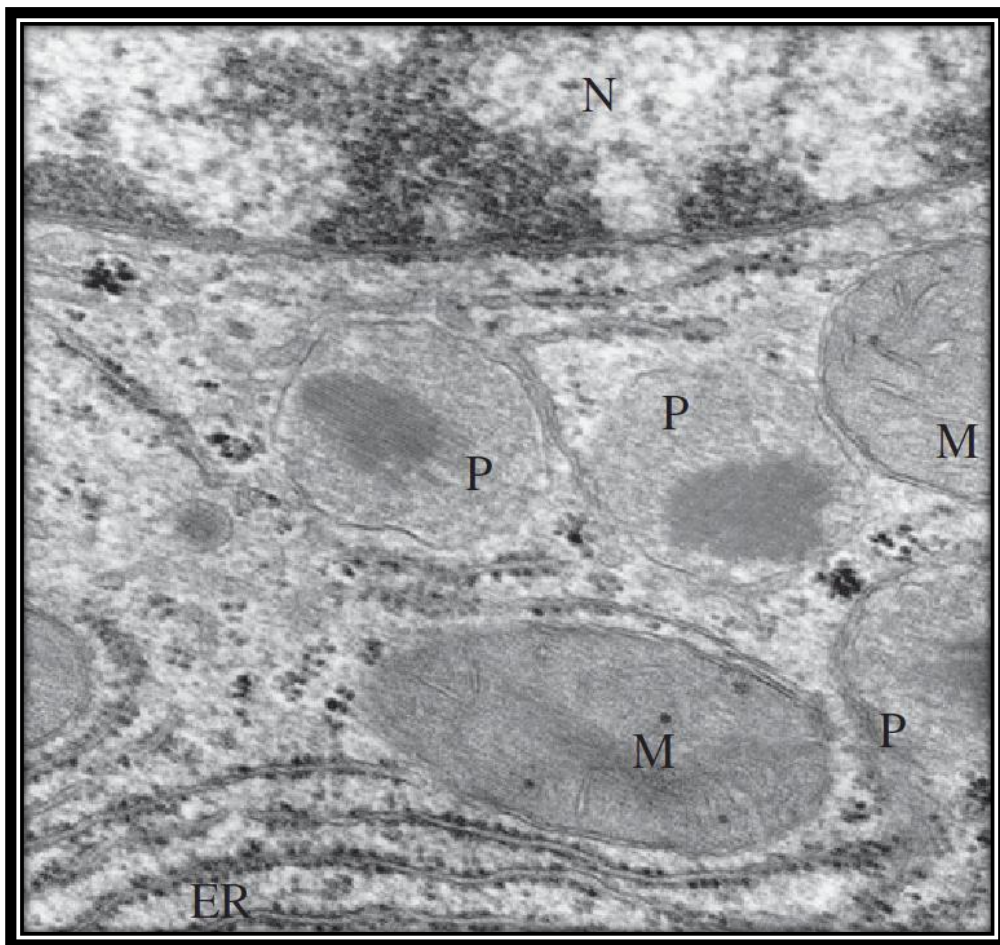
Les premières publications sur des structures intracellulaires représentant probablement les mitochondries parurent dans les années 1840. Toutefois, en 1890 Altmann fût le premier à reconnaître l'omniprésence de cette structure dans la cellule. Il les appelât « bioblastes » et conclût qu'ils étaient des organismes élémentaires vivants à l'intérieur des cellules et exerçant des fonctions vitales. Ensuite le nom mitochondrie fut introduit en 1898 par Benda, et provient du grec « mitos » (fil) et « Chondros » (granulé) (Ernster et Schatz, 1981).

#### 1.2 Structure

La mitochondrie est un organite qui a une forme de petits cylindres allongés de 0,5 à 1  $\mu\text{m}$  de diamètre (Figure 3). Chaque mitochondrie contient deux membranes, une membrane externe et une membrane interne qui délimitent deux compartiments mitochondriaux : l'espace matriciel interne, et l'espace intermembranaire. Cet organite contient trois types de protéines avec des fonctions spécifiques : les protéines qui catalysent les réactions d'oxydation dans la chaîne respiratoire, les protéines qui catalysent la synthèse de l'ATP et les protéines de transport spécifiques qui contrôlent les échanges de molécules entre le cytosol et

la matrice mitochondriale. La mitochondrie contient son propre ADN mitochondriale (Clostre, 2001).

Chaque cellule de l'organisme contient entre 500 et 2000 mitochondries. En effet, ce sont des véritables centrales énergétiques, elles utilisent l'oxygène moléculaire et des combustibles provenant des glucides, des lipides ou des protéines pour produire, sous forme d'ATP, 90 % de l'énergie nécessaire au fonctionnement cellulaire et au maintien du fonctionnement des pompes ioniques membranaires, garantissant ainsi l'homéostasie cellulaire (Clostre, 2001).



*Figure 3 : Micrographie montrant des mitochondries et des peroxysomes dans un hépatocyte de rat.*

Les peroxysomes (P), le noyau (N), le réticulum endoplasmique –rugueux- (RE) et les mitochondries (M). Le réseau cristallin, ou nucléide, formé à l'intérieur des peroxysomes. (Gabaldon, 2010).

### 1.3 Rôle de la mitochondrie

Les mitochondries jouent un rôle primordial pour la survie de la cellule eucaryote en tant que source principale d'énergie sous forme d'ATP (Clostre, 2001). Elles jouent également un rôle clé, d'une part, dans la production des radicaux libres du fait que la chaîne de transport

d'électrons mitochondriale est un site majeur de production des oxydants (Moldovan et Moldovan, 2004) ; et d'autre part, dans la destruction de ces radicaux libres du fait que les mitochondries contiennent des antioxydants et des enzymes de dégradation des radicaux libres (Jezek et Hlavata, 2005).

#### 1.4 La $\beta$ -oxydation mitochondriale

La première étape de la  $\beta$ -oxydation mitochondriale est la  $\alpha$ - $\beta$ -déshydrogénation de l'ester d'acyl-CoA par une famille d'acyl-CoA déshydrogénases. Chacune étant spécifique d'une catégorie d'acide gras à chaîne linéaire en fonction de leurs longueurs (Figure 4) (Hashimoto, 1999). La deuxième étape est catalysée par une protéine hétérotrimérique, présentant l'activité de la 2-énoyl-CoA hydratase, la 3-hydroxyacyl-CoA déshydrogénase et la 3-céto-acyl-CoA thiolase, participe aux trois étapes successives de la voie de  $\beta$ -oxydation mitochondriale (Reddy et Rao, 2006).

La  $\beta$ -oxydation mitochondriale est impliqué principalement dans l'oxydation de la majeure partie des acides gras à courte (<C8), moyenne (C8-C12) et à longue (C12-C20) chaînes. Elle constitue la principale source d'énergie issue des acides gras (Reddy et Hashimoto, 2001).

Le rôle de la  $\beta$ -oxydation mitochondriale est de raccourcir progressivement les acides gras en plusieurs sous-unités d'acétyl-CoA. Ces derniers se condensent soit en corps cétoniques pour servir de substrats énergétique oxydables pour les tissus extra-hépatiques, en particulier pendant la jeûne, ou entrent dans le cycle de Krebs pour une oxydation supplémentaire en eau et en dioxyde de carbone permettant ainsi la synthèse d'ATP (Reddy et Hashimoto, 2001; Reddy et Rao, 2006).



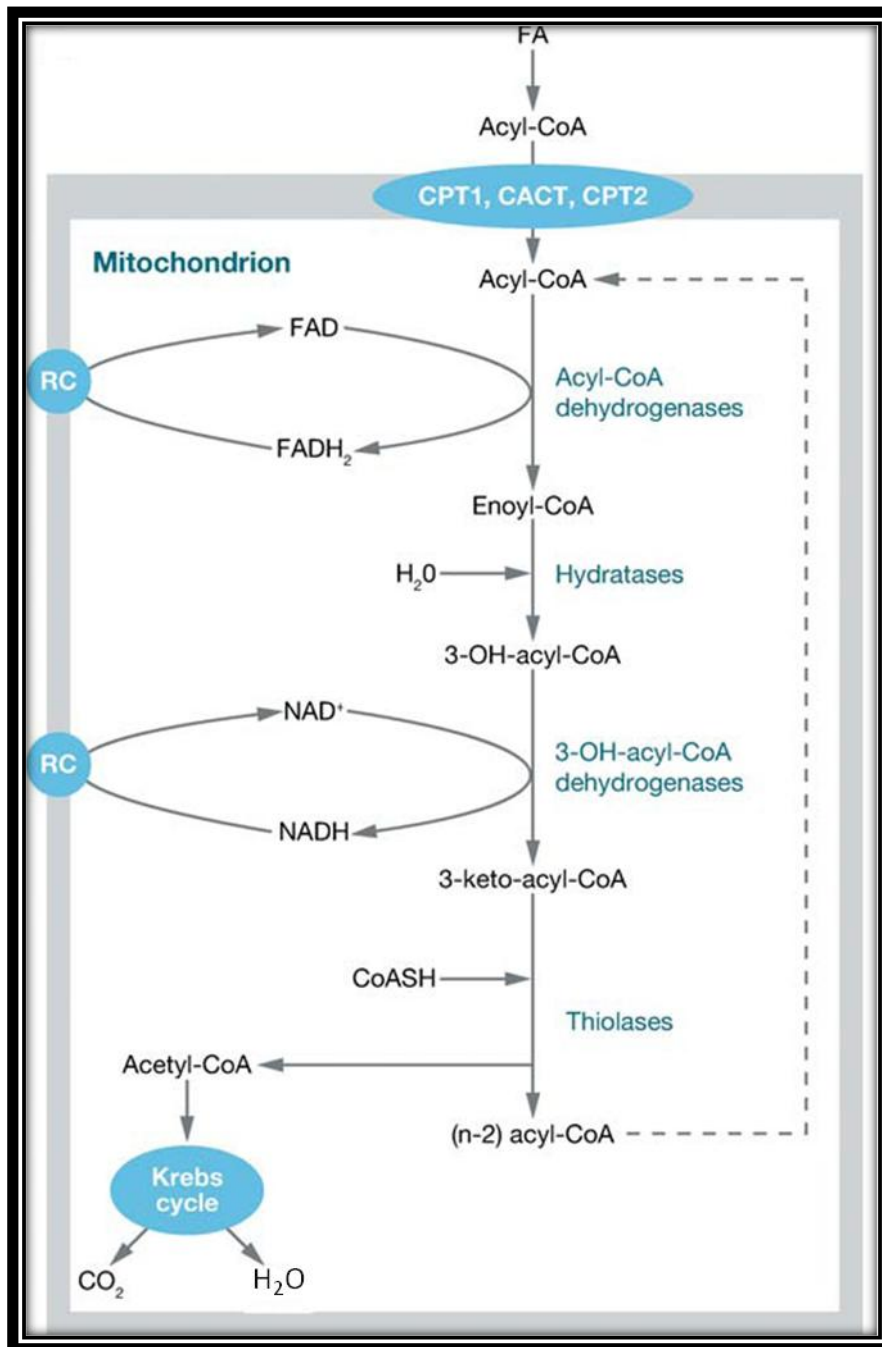


Figure 4 : Schéma représentant la  $\beta$ -oxydation mitochondriale.

Les acides gras sont activés par une acyl-CoA synthase avant d'être transportés à travers la membrane mitochondriale par un système de cycle de carnitine. Ensuite l'acyl-CoA emprunte la voie de la  $\beta$ -oxydation composée par quatre réactions successives (1) la déshydrogénation, (2) l'hydratation; (3) la déshydrogénation à nouveau, et (4) le clivage thiolique. la voie de la  $\beta$ -oxydation raccourcit la chaîne de l'acyl-CoA pour donner deux résidus : l'acyl-CoA (n-2) qui subit d'autres cycle de  $\beta$ -oxydation et la sous unité acétyl-CoA qui entre dans le cycle de Krebs pour une oxydation supplémentaire en eau et en dioxyde de carbone. Le FADH<sub>2</sub> et le NADH, générés respectivement dans la première et troisième étape de la  $\beta$ -oxydation, sont directement réoxydés par la chaîne respiratoire (RC). D'après (Wanders et Waterham, 2006).



## 2. Le peroxysome

### 2.1 Généralités

Les peroxysomes, initialement nommés « microbodies », furent découverts par Rhodin en 1954 dans des cellules rénales de souris. Cependant, leur caractérisation initiale en tant que nouveau type d'organite cellulaire fût décrite quelques années plus tard, lorsque Christian de Duve et son équipe ont réussi à isoler les peroxysomes du foie de rat et étudier leur propriétés biochimiques (De Duve et Baudhuin, 1966). Le groupe de Duve a identifié la présence de plusieurs enzymes impliquées dans la production de peroxyde d'hydrogène et sa dégradation et donc a donné le nom de peroxysome à ces organites (De Duve et Baudhuin, 1966).

Depuis lors, les peroxysomes ont été isolés chez plusieurs autres organismes avec un contenu enzymatique variable. Il en résulte des propriétés métaboliques spécifiques des peroxysomes qui peuvent différer substantiellement d'une espèce à l'autre. De plus, au sein du même organisme, les peroxysomes peuvent afficher des fonctions enzymatiques différentes selon le tissu ou selon les conditions environnementales (Gabaldon, 2010).

### 2.2 Structure des peroxysomes

Les peroxysomes sont constitués d'une matrice protéique granuleuse délimitée par une membrane simple de 0,1 à 1µm de diamètre (Figure 3). Ils peuvent contenir des inclusions cristallines appelé noyau cristalloïde ou nucléoïde (Reddy, 2004). Contrairement aux mitochondries, ils ne possèdent pas d'acides nucléiques (Schrader et Fahimi, 2008).

Près de 85 gènes chez l'homme ont été identifiés, codant pour des protéines peroxysomales. Parmi ces protéines, environ 50 (chez les mammifères) sont des enzymes de métabolisme, alors que le reste de ces protéines est représenté par les peroxines (Pex) qui participe à la biogenèse des peroxysomes et à l'entretien fonctionnel de cet organite (Kiel et al., 2006; Platta et Erdmann, 2007a).

### 2.3 Biogenèse des peroxysomes

La biogenèse des peroxysomes se fait en trois étapes :

- la formation de la membrane peroxysomale
- l'import des enzymes peroxysomales matricielles
- la prolifération des peroxysomes.

Jusqu'à présent, 32 protéines nécessaires pour la biogenèse des peroxysomes, et ces protéines sont collectivement appelés peroxines ont été identifiés. Bien que certaines

peroxines ont un rôle dans la division des peroxysomes, la plupart sont des composants des mécanismes d'importation des protéines de la matrice des peroxysomes et des protéines membranaires (Brown et Baker, 2003).

### 2.3.1 Origine du peroxysome

Depuis sa découverte, deux théories coexistent sur l'origine du peroxysome. Les premières études qui ont été basées sur des investigations ultrastructurales par microscopie électronique, ont suggéré que les peroxysomes sont générés par bourgeonnement à partir du réticulum endoplasmique (Novikoff.A.B., 1964). Plus tard, les données biochimiques ont démontré que les protéines de la matrice des peroxysomes sont synthétisées par des ribosomes libres dans le cytosol et que ces protéines sont importées après traduction dans les peroxysomes préexistants. Sur la base de ces résultats, un modèle appelée «modèle de croissance et de division», a été proposé, qui prévoit que les peroxysomes bourgeonnent à partir de peroxysomes préexistants (Lazarow et Fujiki, 1985).

Toutefois, Hoepfner et ses collègues, utilisant des levures mutantes en Pex3 et Pex19, ont montré par microscopie à fluorescence en temps réel que Pex3, une protéine membranaire, se concentre à la périphérie du réticulum endoplasmique et recrute par la suite Pex19p afin de produire par bourgeonnement une structure capable d'importer d'autres protéines membranaires peroxysomales (Hoepfner et al., 2005). Cette structure intègre par la suite les protéines membranaires peroxysomales qui sont dirigées vers le peroxysome grâce à des signaux d'adressage (mPTS), permettant aux peroxysomes naissant d'importer les protéines matriciels pour devenir fonctionnels (Schliebs et Kunau, 2004).

### 2.3.2 L'import des protéines membranaire

Les peroxysomes sont dépourvus d'ADN et ne contiennent aucun système indépendant de synthèse protéique; c'est pourquoi, toutes les protéines destinées aux peroxysomes sont codées par l'ADN nucléaire et synthétisées dans le cytosol par les ribosomes libres. Ces protéines sont ensuite adressées vers ces organites après leur traduction. Cependant, l'insertion de protéines membranaires du peroxysome (PMP) (Figure 5) nécessite le Pex3p, Pex19p et dans certains organismes Pex16p (Fujiki et al., 2006). La Pex19p est censée fonctionner comme un chaperonne soluble et un récepteur d'importation pour les protéines membranaires du peroxysome grâce à une séquence spécifique mPTS (Platta et Erdmann, 2007b). La Pex3p est une protéine intégrale de la membrane peroxysomale qui interagit

comme récepteur avec Pex19 pour faciliter l'insertion des PMP (protéines membranaire peroxysomale) (Fang et al., 2004).

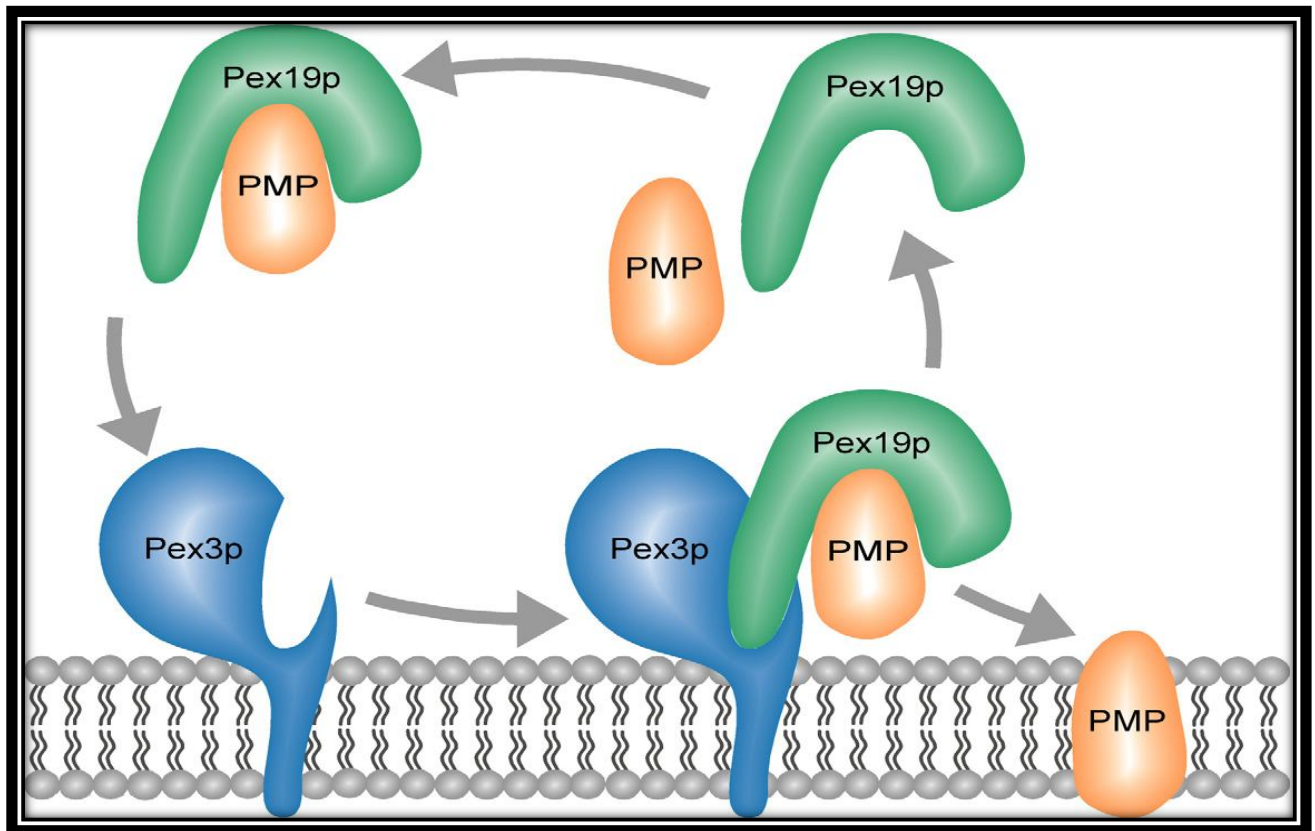


Figure 5 : Schéma Représentant de la cascade d'importation des protéines membranaires.

La plupart des protéines de la membrane du peroxysome (PMP) contiennent une séquence spécifique mPTS qui est reconnue par le récepteur chaperonne et d'importation Pex19p qui les dirige vers la membrane peroxysomale, Pex3p est une protéine d'ancrage membranaire pour le complexe Pex19-PMP. D'après (Platta et Erdmann, 2007b).

### 2.3.3 L'import des enzymes de la matrice peroxysomale

Les protéines de la matrice peroxysomales sont synthétisées dans le cytosol par les ribosomes libres. Ces protéines sont ensuite adressées vers ces organites après leur traduction. En effet, l'importation des protéines de la matrice des peroxysomes est fondamentalement différente de la plupart des autres systèmes de translocation de protéines identifiés et caractérisés à ce jour (Girzalsky et al., 2010). Tout d'abord, la machinerie protéique peroxysomale d'importation permet la translocation à travers la membrane du peroxysome du complexe complet, contenant le récepteur Pex5 lié aux protéines oligomériques (Figure 6) (McNew et Goodman, 1994). Deuxièmement, il n'existe actuellement aucune preuve d'une translocation peroxysomale en continu et il est donc généralement admis que la protéine d'importation se rassemble en réponse à un signal de nature transitoire (Girzalsky et al., 2010). Les étapes de l'importation des protéines dans la matrice des peroxysomes peuvent

être subdivisées en 4 étapes successives : d'abord, les événements précoces de la cascade d'importation comprenant la reconnaissance de substrats cytotologiques et l'importation par les récepteurs Pex5p Pex7p, ce complexe est transporté au peroxyosome. Cette étape est suivie par un mécanisme d'ancrage membranaire, dans lequel le substrat et le récepteur se lie à un complexe de protéines de la membrane du peroxyosome. Les derniers événements se composent en la dissociation des complexes récepteur-cargo du complexe d'ancrage, la translocation et la libération du cargo dans la lumière et, enfin, le recyclage des récepteurs dans le cytosol (Eckert et Erdmann, 2003).

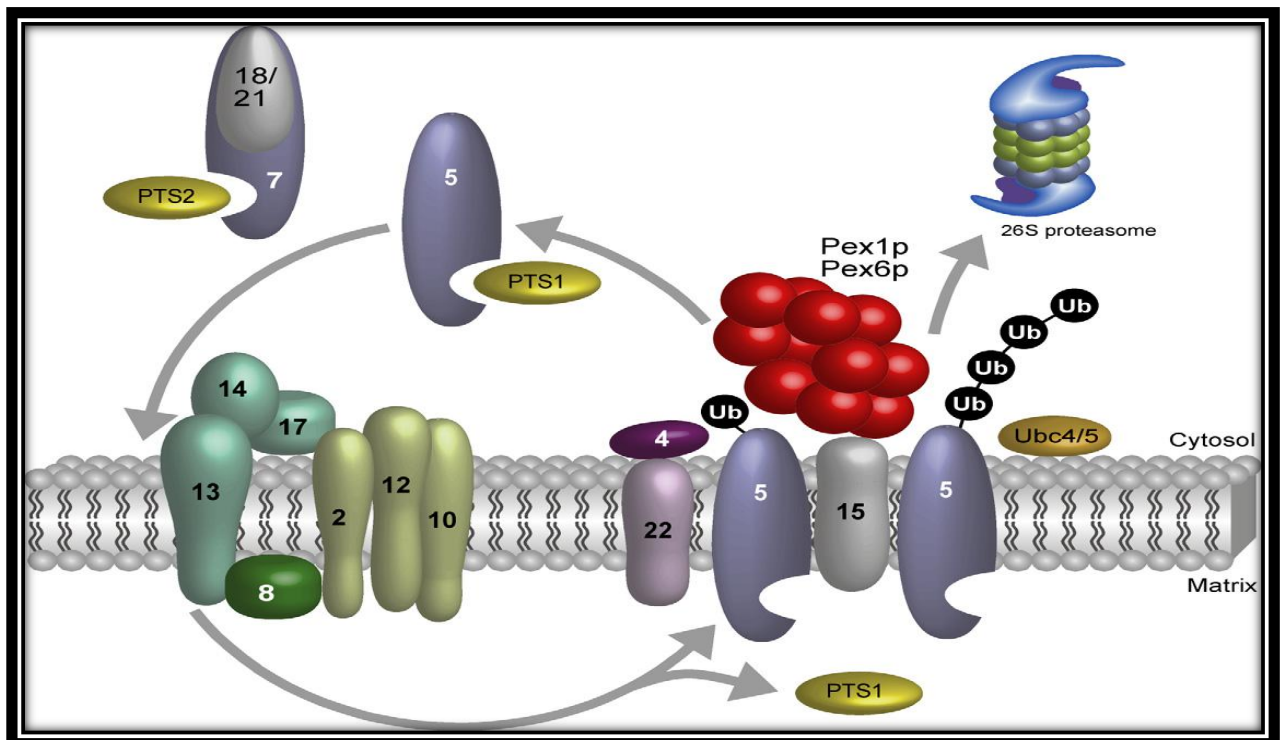


Figure 6 : Représentation schématique de la cascade d'importation des protéines matricielles peroxysomales.

Les protéines avec le signal PST1 (Peroxisome Targeting Signal) sont reconnues par le récepteur soluble Pex5p. Alors que les protéines avec PTS2 sont reconnues par Pex7p, qui coopère avec Pex18p et Pex21p dans *Saccharomyces cerevisiae*. Le complexe récepteur-cargo s'associe à la membrane du peroxyosome via le complexe d'ancrage du peroxyosome, composé de Pex14p, Pex13p et Pex17p qui s'associe avec le domaine RING-finger Pex2p, Pex10p et Pex12p par la protéine Pex8p. Le complexe récepteurs-cargo se dissocie au niveau du site luminal de la membrane. Le récepteur-PTS1 est soit monoubiquitinylé par le Pex4p ou polyubiquitinylé par Ubc4p ou Ubc5p. Les peroxines Pex1p et Pex6p, qui sont ancrées à la membrane de peroxyosome par Pex15p (chez la levure) ou Pex26p (chez les mammifères), se dissocient de la Pex5p ubiquitinylée et de ce fait sont transportées de la membrane vers le cytosol. Les récepteurs PTS1 polyubiquitinylés sont dégradés par le protéasome, tandis que les récepteurs monoubiquitinylés sont recyclés pour d'autres cycles d'importation. D'après (Platta et Erdmann, 2007b).

#### 2.3.4 La prolifération des peroxysomes

Les peroxysomes sont dynamiques (modification de la taille et de la forme) et possèdent la capacité de proliférer en réponse à une stimulation cellulaire ou environnementale (Lazarow, 2003). L'induction de la prolifération des peroxysomes (Figure 7) peut être générée par un large spectre de produits chimiques qui incluent certains médicaments hypolipémiants, ou par certains acides gras, ces inducteurs sont nommés : Proliférateurs des Peroxysomes (PPs). Ces PPs induisent dans le foie des rongeurs une réponse pléiotropique par l'activation du PPAR $\alpha$  (Peroxisome Proliferator-Activated Receptor), une prolifération des peroxysomes et une induction de nombreuses enzymes hépatiques, notamment celles impliquées dans la  $\beta$ -oxydation des acides gras (Lazarow et De Duve, 1976).

L'administration de PPs entraîne une augmentation de la masse du foie qui peut atteindre jusqu'à 10% du poids de l'animal chez le rat, voire 15 à 20% chez la souris, ainsi qu'une augmentation de plus de 10 fois du volume total des peroxysomes hépatiques (Reddy, 2004).

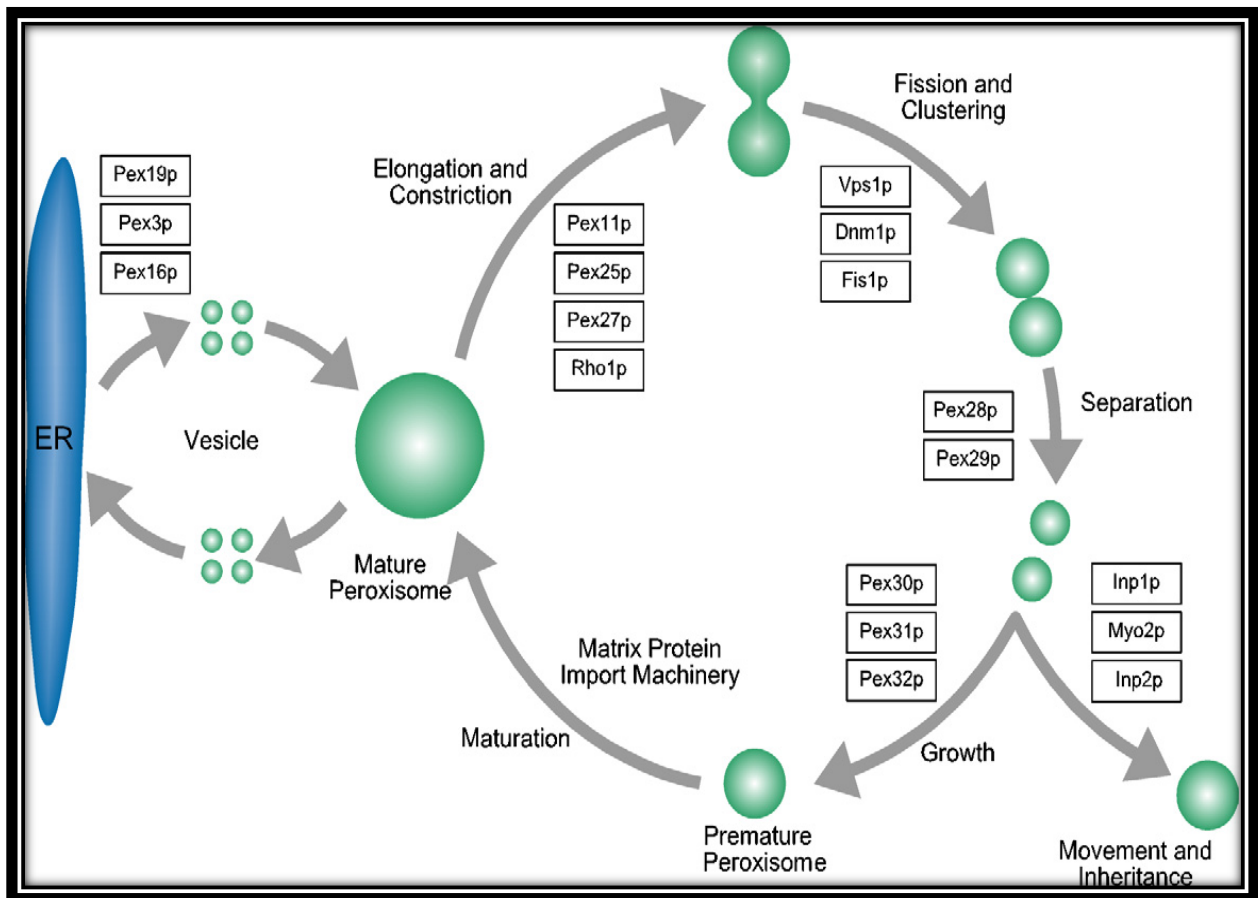


Figure 7 : Représentation schématique de la division et de la prolifération des peroxysomes.

Pex19p, Pex3p et Pex16p sont nécessaires pour la formation des vésicules au niveau du réticulum endoplasmique. La formation des peroxysomes matures peut impliquer la fusion des vésicules précurseurs, comme on l'observe chez *Yarrowia lipolytica*. Les protéines membranaires peroxysomales Pex11p, Pex25p et Pex27p et le Rho1p GTPase (contrôlent la réorganisation de l'actine autour de la membrane du peroxysome) sont impliqués dans l'élongation et la constriction des peroxysomes matures. Le peroxysome subit une fission, qui est reliée à la fonction du Vps1p (DLP1) et Dnm1p, ainsi que l'ancrage Fis1p Vps1p-protéine, qui sont aussi impliquées dans les processus de fission des mitochondries. Ensuite les peroxysomes seront séparés par Pex28p et Pex29p et la taille des peroxysomes est régulée par Pex30p, Pex31p et Pex32p et la maturation du peroxysome est facilitée par l'importation de protéines de la matrice. Enfin, le mouvement des peroxysomes le long des filaments d'actine qui nécessite Inp1p (contrôle la répartition de peroxysome), Inp2p est un récepteur pour Myo2p impliqué dans le déplacement le long de filament d'actine entre le peroxysome et le bourgeon. D'après (Platta et Erdmann, 2007b).

#### 2.4 Rôle métabolique des peroxysomes

Les peroxysomes sont impliqués dans une variété de voies métaboliques, ce qui implique la présence d'un grand nombre de protéines dans leur matrice (Wanders et Waterham, 2006). Ce sont des organites multifonctionnels qui contribuent à de nombreuses voies anaboliques et cataboliques et sont donc essentiels pour le développement et la santé chez l'homme (Islinger



et al., 2012). Plusieurs nouvelles fonctions biologiques ont été découvertes ces dernières années, et la liste semble loin d'être complète (Schrader et Fahimi, 2008) :

- Métabolisme des peroxydes (Catalase, SOD Super Oxyde Dismutase), Métabolisme de ROS (**Reactive Oxygen Species**)/RNS (Reactive Nitrogen Species)
- Biosynthèse des lipides (éthers de phospholipides/plasmalogènes; acides biliaires, cholestérol, élongation des acides gras)
- $\beta$ -oxydation des acides gras (acides gras très longue chaînes, acides dicarboxyliques, acides gras à chaîne branchées, acides gras insaturés, acide arachidonique et des xénobiotiques).
- $\alpha$ -oxydation (acide phytanique, les composés xénobiotiques)
- Activation des acides gras longues et très longues chaînes
- Régulation du rapport acyl-CoA/CoA
- Métabolisme des acides aminés (biosynthèse de cystéine dégradation des polyamines)
- Catabolisme des purines
- Métabolisme de glyoxylate et dicarboxylate
- Synthèse de glycérol
- Métabolisme du nicotinate et nicotinamide
- Métabolisme du rétinol

## 2.5 La $\beta$ -oxydation des acides gras

En 1969, Cooper et Beevers ont découvert un système de  $\beta$ -oxydation d'acide gras dans le glyoxysome durant la germination de graines de ricin (Cooper et Beevers, 1969). Quelques années plus tard en 1976 Lazarow et De Duve ont montré que les peroxysomes des animaux, non seulement possèdent un système de  $\beta$ -oxydation d'acide gras mais également que la  $\beta$ -oxydation peroxysomale utilise des mécanismes réactionnels similaires à ceux des mitochondries (Lazarow et De Duve, 1976).

Depuis, d'autres études ont montré que la  $\beta$ -oxydation des acides gras est une propriété universelle des peroxysomes dans la plupart, sinon la totalité, des organismes.

Chez la levure et chez les plantes, les peroxysomes sont le site unique de la  $\beta$ -oxydation des acides gras. Tandis que chez les eucaryotes supérieurs, elle peut avoir lieu à la fois dans les mitochondries et dans les peroxysomes (Wanders et Waterham, 2006).

Le mécanisme de la  $\beta$ -oxydation des acides gras dans les mitochondries et les peroxyosomes est identique et comporte un ensemble de quatre réactions consécutives (Figure 8) : (1) la déshydrogénation, (2) l'hydratation (de la double liaison); (3) la déshydrogénation à nouveau, et (4) le clivage thiolytique (Wanders, 2004). Ces réactions sont catalysées dans le peroxyosome par trois enzymes :

(1) Acyl-CoA oxydase (déshydrogénation), (2) enzyme bifonctionnelle (hydratation de la double liaison et déshydrogénation à nouveau) et (3)  $\beta$ -cétotliolase (clivage thiolytique) (Wanders et Waterham, 2006).

Il faut noter que l'oxydation des acides gras par les peroxyosomes n'est en mesure que de raccourcir la chaîne des acides gras et n'est pas capable de les dégrader complètement. Les acides gras à très longue chaîne, sont raccourcis au niveau du peroxyosome en une chaîne moyenne d'ester acyl-CoA, suivi par le transport vers la mitochondrie par la carnitine pour permettre l'oxydation complète en  $\text{CO}_2$  et  $\text{H}_2\text{O}$  (Wanders, 2004).



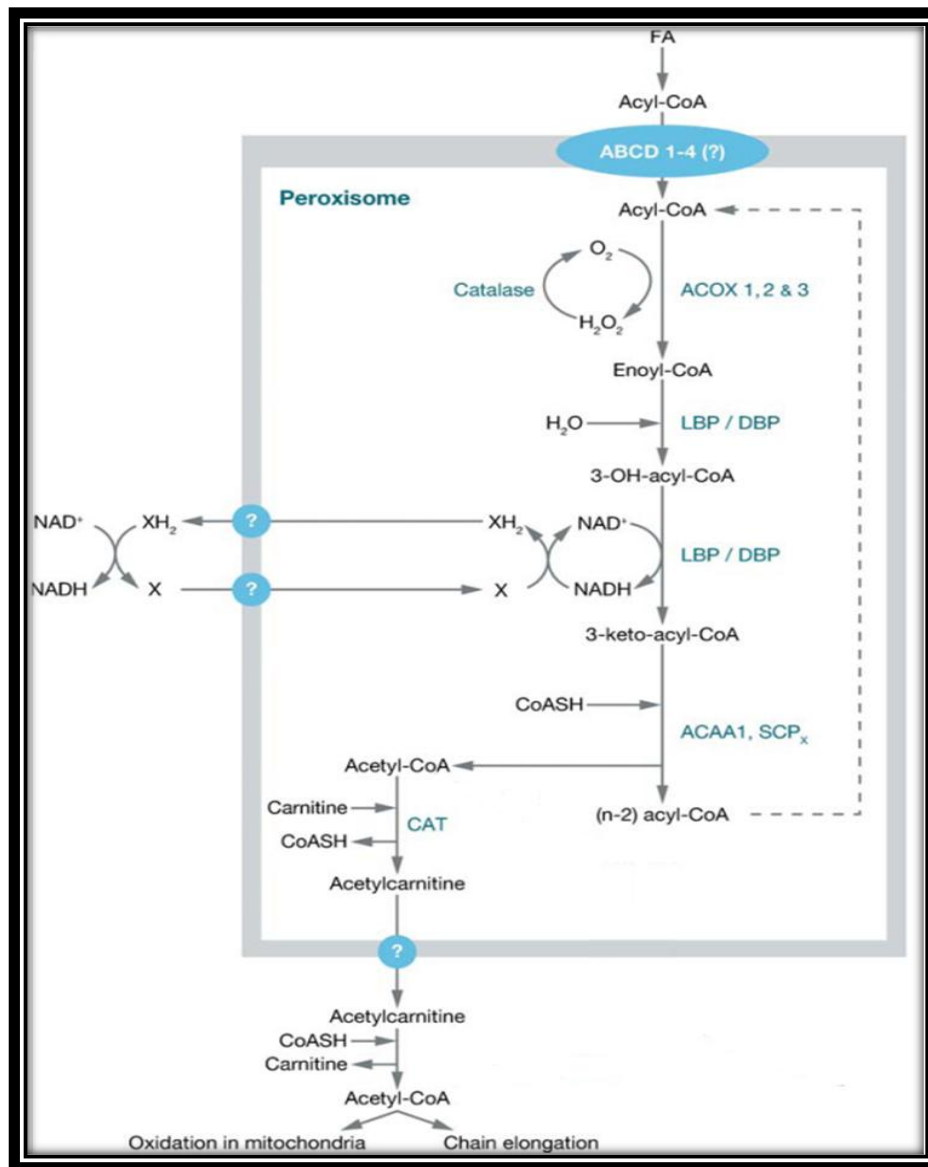


Figure 8 : Schéma Représentant la β-oxydation peroxysomale.

Les acides gras sont activés par une acyl-CoA synthase avant d'être transportés à travers la membrane peroxysomale par des hémis-transporteurs ABC qui s'homodimérisent ou s'hétérodimérisent pour être fonctionnels. Ensuite l'acyl-CoA emprunte la voie de la β-oxydation composée par quatre réactions catalysées par trois enzymes (1) Acyl-CoA oxydase (déshydrogénation), (2) enzyme bifonctionnelle (hydratation de la double liaison et déshydrogénation à nouveau) et (3) β-cétothiolase (clivage thiolitique). La voie de la β-oxydation raccourcit la chaîne de l'acyl-CoA en une chaîne moyenne d'ester d'acyl-CoA qui est transporté ensuite vers la mitochondrie par la carnitine pour l'oxydation complète en CO<sub>2</sub> et H<sub>2</sub>O. La sous unité acétyl-CoA entre dans le cycle de Krebs pour une oxydation supplémentaire ou sert pour l'élongation des chaînes des acides gras. L'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> produit par la première réaction de la β-oxydation est dégradé par la catalase, alors que le NADH produit dans la troisième étape de la bêta-oxydation peroxysomale est réoxydé par l'intermédiaire d'une NAD (H) de navette redox. ACOX : acyl-CoA oxydase, LBP et DBP enzymes bifonctionnelles, ACAA1 acétyl-Coenzyme A acyltransférase 1, SCP<sub>x</sub> protéine stérol-carrier, CAT Carnitine acétyltransférase. D'après (Wanders et Waterham, 2006).

À l'heure actuelle, trois types d'acides gras sont connus pour être  $\beta$ -oxydés exclusivement dans le peroxysome :

- AGTLC comme C24:0 et C26:0,
- Acide pristanique « 2,6,10,14-tetramethylpentadecanoic acid » : Le 2-méthyl acide gras branché.
- Les intermédiaires de synthèse des acides biliaires l'acide dihydroxycholestanoïque (DHCA) et l'acide trihydroxycholestanoïque (THCA).

En plus de ces substrats exclusifs du peroxysome, il existe d'autres acides gras, qui peuvent être bêta-oxydés aussi bien dans les mitochondries que dans les peroxysomes, alors que certains acides gras ne peuvent être oxydés que dans les mitochondries, y compris les acides gras à courte chaîne (Figure 9) (Wanders et Waterham, 2006).

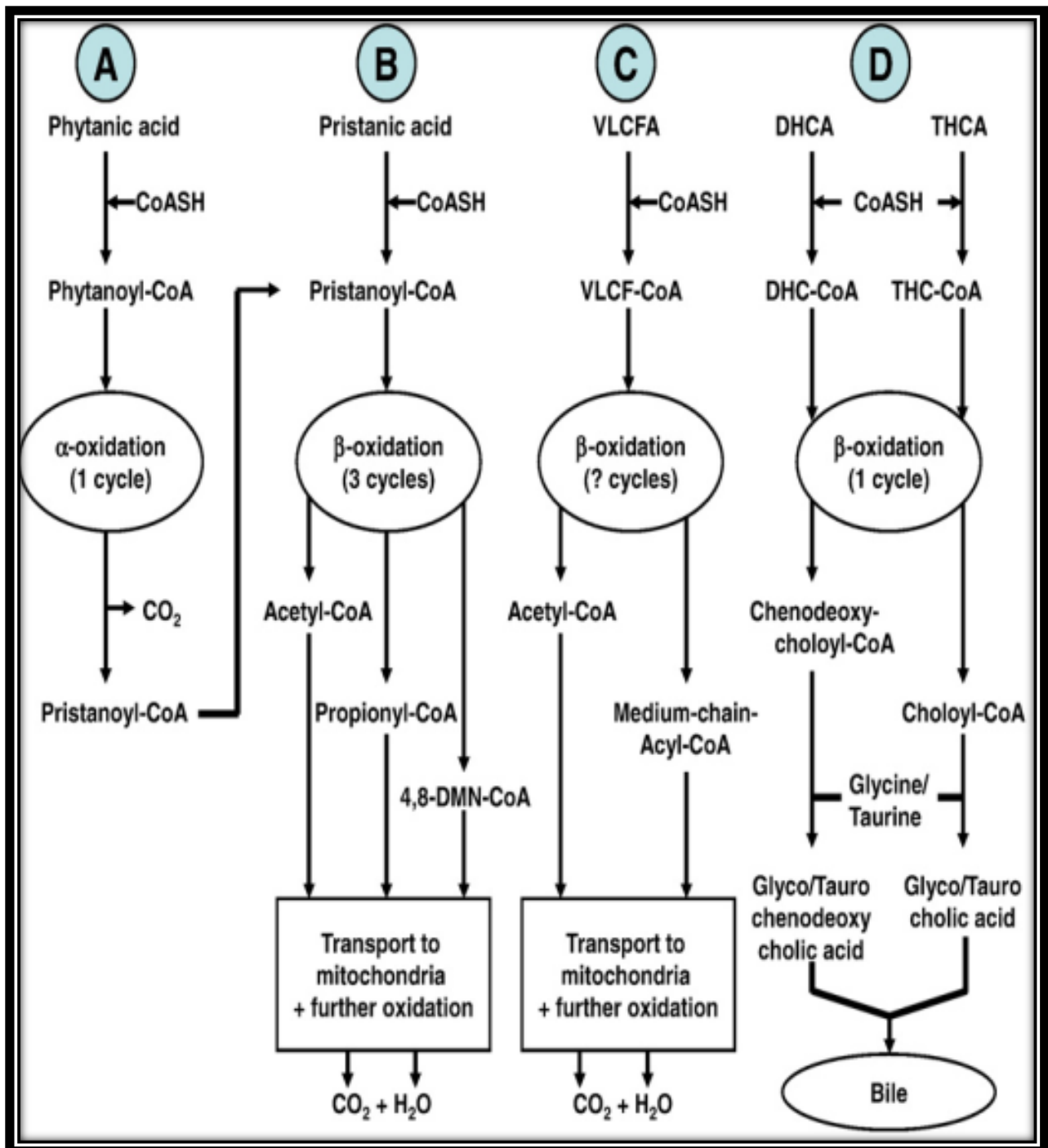


Figure 9 : Représentation du métabolisme des différents substrats de  $\beta$ -oxydation peroxysomale

Le pristanoyl-CoA issu de l' $\alpha$ -oxydation de l'acide phytanique et de l'acide pristanique, subit 3 cycles de  $\beta$ -oxydation pour donner lieu à 3 produits propionyl-CoA. Un acétyl-CoA et 4,8-diméthylnonanoyl-CoA qui seront transportés vers la mitochondrie pour une oxydation complète en  $\text{CO}_2$  et en  $\text{H}_2\text{O}$ . Pour les AGTLC comme C26:0, le nombre de cycles de  $\beta$ -oxydation qui ont eu lieu dans le peroxysome n'a pas été établi de façon définitive. Dans le foie les intermédiaires des acides biliaires (DHCA et THCA) subissent un seul cycle de  $\beta$ -oxydation pour donner lieu à 2 produits finaux : le choloyl-CoA et le chénodésoxycholoyl-CoA. Ces deux CoA-esters sont ensuite conjugués à la glycine ou la taurine à l'intérieur du peroxysome. Par la suite ils sont transportés dans le cytosol pour terminer la synthèse d'acide biliaire. D'après (Wanders et al., 2010).

### 2.5.1 Enzymologie du système de la $\beta$ -oxydation peroxysomale

Les acides gras saturés à chaîne linéaire et les acides gras 2-méthyl à chaîne branchée sont les seuls acides gras qui peuvent subir directement la  $\beta$ -oxydation. En revanche, les autres acides gras, telles que les mono - polyinsaturés, le 3-méthyl à chaîne ramifiée et les acides gras 2-hydroxylés, ont besoin d'être remodelés avant qu'ils ne deviennent substrat pour la  $\beta$ -oxydation peroxysomale (Figure 10) (Wanders et Waterham, 2006).

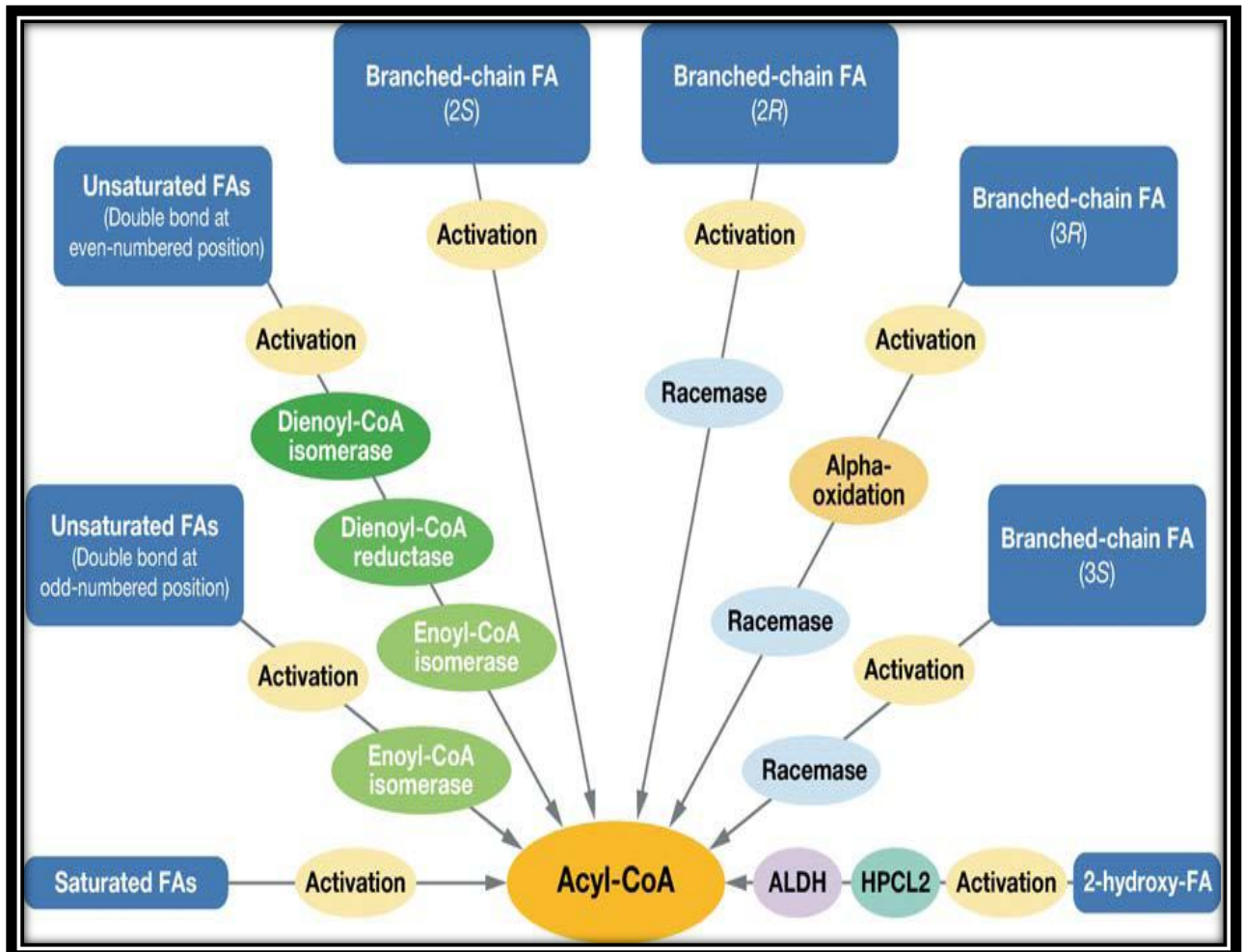


Figure 10 : Description schématique des enzymes nécessaires à la conversion des acides gras dans les différents correspondants acyl-CoA esters.

ALDH, l'aldéhyde déshydrogénase; HPCL, 2,2-hydroxyphytanoyl-CoA lyase, FA, acide gras. La voie de la  $\beta$ -oxydation peroxysomale est catalysée par trois enzymes : (1) Acyl-CoA oxydase (déshydrogénation), (2) enzyme bifonctionnelle (hydratation de la double liaison et déshydrogénation à nouveau) et (3)  $\beta$ -cétothiolase (clivage thiolytique). D'après (Wanders et Waterham, 2006).

a. Acyl-CoA oxydase (ACOX)

Dans le cycle de la  $\beta$ -oxydation peroxysomale, la première réaction est catalysée par une acyl-CoA oxydase (ACOX)(Figure 11) qui est considéré comme étant la principale étape enzymatique qui contrôle le flux métabolique à travers cette voie. La diversité de substrat accepté dans la voie de  $\beta$ -oxydation du peroxysome est illustrée par l'existence de différentes acyl-CoA oxydases chez les mammifères (Poirier et al., 2006).

Les peroxysomes extra-hépatique chez le rat contiennent deux acyl-CoA oxydases, y compris la palmitoyl-CoA oxydase (ACOX1) et la pristanoyl-CoA oxydase (ACOX3), tandis que les peroxysomes du foie, contient une acyl-CoA oxydase supplémentaire qui est la cholestanoyl-CoA oxydase (ACOX2), réagissant spécifiquement avec l'ester CoA des acides biliaires intermédiaires di- et trihydroxycholestanoïque (DHCA et THCA) (Van Veldhoven et al., 1992).

L'ACOX1 est la seule parmi les 3 ACOX qui est inductible par des proliférateurs des peroxysomes dans le foie, elle est activée par les esters CoA des acides gras à chaîne linéaire mono et dicarboxylique, les prostaglandines, les acides gras à très longue chaîne et les xénobiotiques, alors que l'ACOX3 est activée avec le 2-méthyl- acyl-CoA à chaîne branchée, comme le pristanoyl-CoA (Van Veldhoven et al., 1992).

Chez l'homme, le premier acyl-CoA oxydase, nommé la palmitoyl-CoA oxydase, correspond à l'ACOX1 de rat, avec un spectre de substrat et des caractéristiques moléculaires similaires (Vanhove et al., 1993). Une deuxième oxydase peroxysomale humaine est l'ACOX2 activée par les 2-méthyl à chaîne branchée, tels que le pristanoyl-CoA et les esters-CoA de DHCA et de THCA, ainsi que les acyl-CoA à chaîne linéaire, y compris les esters-CoA des acides gras à très longues chaînes dicarboxylique (Vanhove et al., 1993). L'homme possède également un gène codant pour une troisième acyl-CoA oxydase qui est un homologue de l'ACOX3 du rat, mais ce gène semble ne pas être fonctionnel (Diczfalusy, 1994).

Chez l'homme comme chez le rat, l'ACOX1 est une protéine dimérique de 140 kDa composée de deux sous unités de 72 kDa (polypeptide A), synthétisées dans le cytoplasme, et qui peut être clivée dans la matrice peroxysomale par une protéase en deux sous-unités de 52 (polypeptide B) et 21 kDa (polypeptide C) (Osumi, 1993). Ce qui suggère que l'enzyme activée existe sous trois formes : A2, ABC et B2C2.

### b. Enzyme bifonctionnelle

Dans le cycle de la  $\beta$ -oxydation peroxysomale, les étapes 2 et 3 (l'hydratation et déshydrogénation) sont catalysées par une enzyme dite bifonctionnelle : (PBE : « Peroxisomal Bifunctional Enzyme ») elle possède à la fois une activité énoyl-CoA hydratase et une activité 3-hydroxyacyl-CoA déshydrogénase (Wanders et Waterham, 2006).

Chez l'homme, chez les rats et chez les souris les peroxysomes contiennent deux types d'enzymes bifonctionnelles distinctes : la L-PBE et la D-PBE (Wanders et Waterham, 2006), qui montrent très peu d'homologie de séquence et sont structurellement très différents (Qin et al., 1999).

La L-PBE métabolise l'énantiomère L et la D-PBE métabolise l'énantiomère D du 3-hydroxyacyl-CoA. Cependant les deux enzymes peuvent prendre en charge les énoyl-CoA à chaîne linéaire, alors que seule la D-PBE est capable de dégrader la forme énoyl de l'acide pristanique, ainsi que le DHCA et le THCA (Qin et al., 1997) (Figure 11).

### c. Thiolase

La dernière réaction du cycle de la  $\beta$ -oxydation est le clivage thiolytique de la 3-cétoacyl-CoA en acétyl-CoA et l'acyl-CoA raccourci de deux atomes de carbone, catalysée par la 3-cétoacyl-CoA thiolase (Poirier et al., 2006) (Figure 11).

Les premières études par Miyazawa et al. (Miyazawa et al., 1987) ont conduit à l'identification de deux enzymes peroxysomale 3-cétoacyl-CoA thiolases (A et B) de 41 kDa ayant des propriétés similaires. Le gène A est constitutivement exprimée en faible quantité, tandis que l'expression du gène B est difficilement détectable dans des conditions normales dans le foie de rat, mais elle est fortement induite par les proliférateurs des peroxysomes. Cependant, chez l'homme, il n'y a qu'un seul gène homologue avec les deux gènes A et B (Bout et al., 1988).

Chez l'homme, comme chez le rat, les peroxysomes contiennent également une deuxième thiolase, qui se révèle être une protéine de 58 kDa avec à la fois une activité thiolase et une activité sterol carrier SCP-2/3-cétoacyl-CoA thiolase (SCPx) (Seedorf et al., 1994).

Les deux formes de thiolase A et B ont un spectre identique de substrat. Comme les 3-cétoacyl-CoA à court, moyen, longue et à très longue chaîne linéaire. Tandis que la SCPx catalyse le clivage des 3-cétoacyl-CoA à moyen, longue et très longue chaîne ainsi que les dérivés 3-cétoacyl-CoA des acides gras à chaîne branchée (Seedorf et al., 1994).



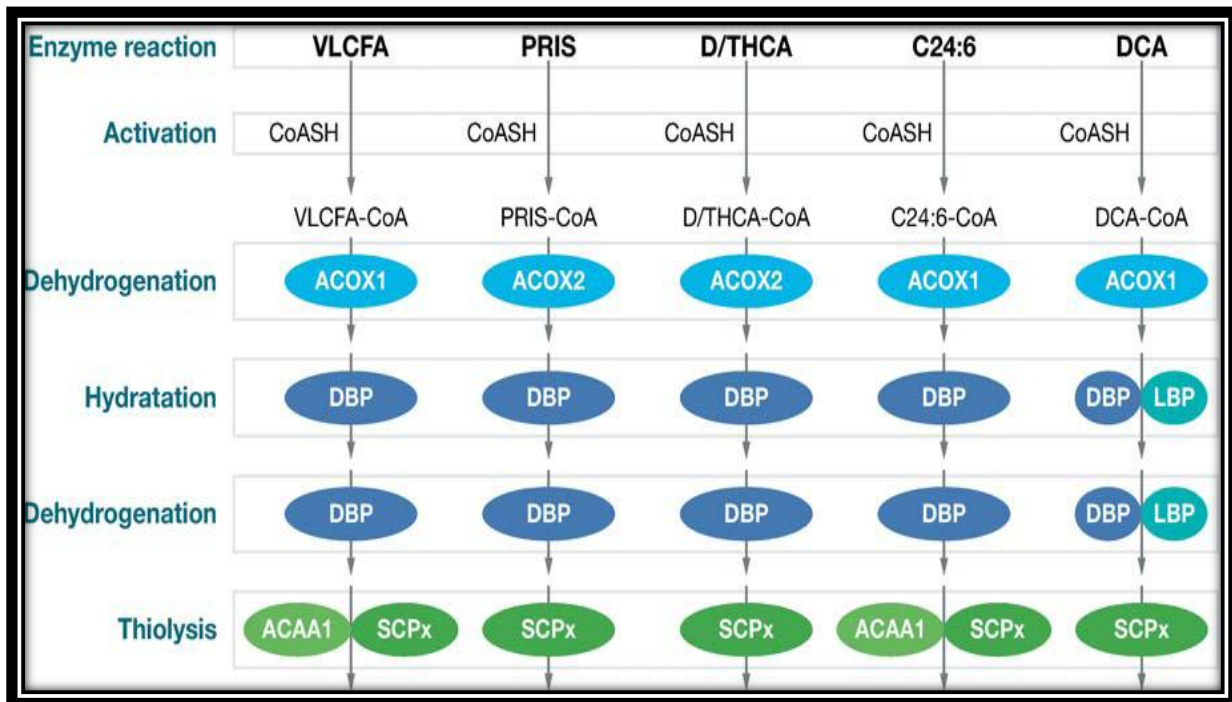


Figure 11 : Enzymologie de la  $\beta$ -oxydation peroxysomale

Vue d'ensemble montrant l'implication des différentes enzymes peroxysomales dans la bêta-oxydation des acides gras à très longues chaînes (AGTLC), acide pristanique (PRIS), DHCA, THCA, acide tetracosahexaenoic (C24:6), et les acides dicarboxyliques à longue chaîne (DCA). CoASH, coenzyme A libre non estérifié. D'après (Wanders et Waterham, 2006)

### 2.5.2 Particularité de la $\beta$ -oxydation peroxysomale vis-à-vis de la $\beta$ -oxydation mitochondriale

Les principales différences entre la  $\beta$ -oxydation peroxysomale et la  $\beta$ -oxydation mitochondriale sont la spécificité de substrat, le transport des substrats et des produits de la  $\beta$ -oxydation (Wanders et Waterham, 2006).

- En effet, les mitochondries catalysent la  $\beta$ -oxydation de la majorité des acides gras (courte, moyenne et longue chaîne) dérivés de l'alimentation, alors que les peroxysomes jouent un rôle important par la prise en charge d'un ensemble des acides gras et des dérivés d'acides gras à très longue chaîne provenant de l'alimentation, et sont également synthétisés de manière endogène à partir des acides gras à courte chaîne (Wanders, 2004).

- Dans les mitochondries, les acides gras à courte et moyenne chaîne entrent directement par diffusion à l'intérieur de la matrice de la mitochondrie, alors que les acides gras à longue chaîne sont transportés par un système de navette carnitine palmitoyl transférase (CPT I, CPT II). Tandis que dans les peroxysomes la carnitine ne joue aucun rôle dans l'importation des acides gras dans la matrice. Cependant la carnitine joue un rôle dans l'exportation de la chaîne

raccourcie de l'acide gras, produite au cours de  $\beta$ -oxydation peroxysomale, vers la mitochondrie (Wanders, 2004). Dans les peroxysomes, les acides gras à très longues chaînes sont transportés à travers la membrane peroxysomale grâce à des héli-transporteurs ABC qui doivent s'homodimériser ou s'hétérodimériser pour être fonctionnels. Chez les mammifères il existe 4 formes de transporteurs (ABCD1, ABCD2, ABCD3, ABCD4), les combinaisons possible de ces héli-transporteurs seraient à l'origine de leurs spécificités envers les substrats (Wanders et Waterham, 2006).

- Dans les mitochondries la première étape de la  $\beta$ -oxydation des acides gras est catalysée par plusieurs acyl-CoA déshydrogénases (selon la longueur de la chaîne de l'acide gras) liées aux FAD, avec un transfert d'électrons à la chaîne respiratoire au niveau de la coenzyme Q. Par contre, les oxydases peroxysomale, qui sont aussi des flavoprotéines, donnent leurs électrons directement à l'oxygène moléculaire pour produire l' $H_2O_2$ , ce dernier est ensuite décomposé en  $O_2$  et de l'eau par l'intermédiaire de la catalase. Par conséquent, un cycle de  $\beta$ -oxydation dans les peroxysomes est moins efficace en terme de production d'ATP par rapport à la  $\beta$ -oxydation mitochondriale (Wanders, 2004). Cependant, comme l'énergie chimique est dissipée sous forme de chaleur, cette étape de  $\beta$ -oxydation des peroxysomes (et d'autres oxydations peroxysomale) contribue à la thermogenèse (Schrader et Yoon, 2007).

- Dans les mitochondries, les acides gras subissent une oxydation complète en  $CO_2$  et  $H_2O$ . Par contre, la  $\beta$ -oxydation peroxysomale raccourcie les acides gras très longues chaînes en une chaîne moyenne d'acyl-CoA. Cette dernière est transportée vers la mitochondrie par la carnitine pour permettre l'oxydation complète (Wanders, 2004).

## 2.6 Métabolisme des peroxydes

Les mitochondries, le réticulum endoplasmique et les peroxysomes sont les principaux sites de consommation de l'oxygène dans la cellule (Schrader et Fahimi, 2006). De Duve et Baudhuin ont décrit pour la première fois en 1966 une voie respiratoire dans les peroxysomes, dans laquelle les électrons retirés de divers métabolites vont réduire  $O_2$  en  $H_2O_2$ , qui est ensuite dégradé en  $H_2O$ . Ceci a renforcé l'idée que ces organites ubiquitaires jouent un rôle clé à la fois dans la production des radicaux oxygénés et dans leur dégradation dans la cellule, notamment d' $H_2O_2$  (De Duve et Baudhuin, 1966).

Les processus métaboliques principaux contribuant à la génération de  $H_2O_2$  dans les peroxysomes sont la  $\beta$ -oxydation des acides gras, les réactions enzymatiques de la flavine



oxydases, la dismutation des radicaux superoxydés (Tableau 4). Il a été estimé qu'environ 35% de tous  $H_2O_2$  formé dans le foie de rat dérive des oxydases peroxysomales (Schrader et Fahimi, 2006).

*Tableau 4 : les enzymes peroxysomales impliqués dans la synthèse de peroxydes*

D'après (Schrader et Fahimi, 2006)

Enzyme	Substrat	ROS
(1) Acyl-CoA oxydases		
(a) Palmitoyl-CoA oxydase	acides gras à longue chaîne	$H_2O_2$
(b) Pristanoyl-CoA oxydase	Acide gras à chaîne branchée méthylée	$H_2O_2$
(c) Trihydroxycoprostanoyl-CoA oxydase	Acides biliaires intermédiaires	$H_2O_2$
(2) Urate oxydase	acide Urique	$H_2O_2$
(3) Xanthine oxydase	Xanthine	$H_2O_2, O_2^{\cdot-}$
(4) D-aminoacide oxydase	D-Proline	$H_2O_2$
(5) Pipecolate oxydase	acide L-pipécolique	$H_2O_2$
(6) D-aspartate oxydase	D-aspartate, N-méthyl-D-aspartate	$H_2O_2$
(7) Sarcosine oxydase	Sarcosine, pipecolate	$H_2O_2$
(8) Acide L-alpha-hydroxy oxydase	Glycolate, lactate	$H_2O_2$
(9) Polyamine oxydase	N-Acétyl spermine/spermidine	$H_2O_2$
(10) oxyde Nitrique synthase	L-Arginine	$\cdot NO$
(11) sulfite oxydase	Sulfite (plante)	$H_2O_2$

Pour dégrader ces radicaux superoxydés, qui sont produits en raison de leur activité métabolique, et pour maintenir l'équilibre entre leur production et leur dégradation, les peroxysomes utilisent plusieurs mécanismes de défense et des enzymes antioxydantes (Tableau 5) tels que la catalase qui possède une grande efficacité catalytique pour la dégradation de  $H_2O_2$  (Boveris et al., 1972).

*Tableau 5 : les enzymes peroxysomales impliqués dans la dégradation des peroxydes*  
D'après (Schrader et Fahimi, 2006).

Enzyme	Substrat	Enzyme aussi présent dans
(1) Catalase	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	cytoplasme (érythrocytes) et Noyau, mitochondrie (cœur du rat)
(2) Glutathion peroxydase	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Tous les compartiments de la cellule
(3) Mn SOD	O <sub>2</sub> · <sup>-</sup>	Mitochondrie
(4) Cu, Zn SOD	O <sub>2</sub> · <sup>-</sup>	Cytoplasme
(5) Epoxyde hydrolase	Epoxides	Réticulum endoplasmique et Cytoplasme
(6) Peroxyrédoxine 1	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Cytoplasme, Noyau, Mitochondrie
(7) PMP 20	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	
(8) Plant ascorbate-glutathion	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Chloroplastes, Cytoplasme, Mitochondrie (nodule racinaire)

## 2.7 Maladies peroxysomales

Le dysfonctionnement du peroxysome souligne l'importance de cet organite au sein de la cellule car il est impliqué dans plusieurs voies métaboliques notamment la  $\beta$ -oxydation des acides gras. Les désordres peroxysomaux se traduisent par des maladies sévères chez l'homme. Ces maladies sont classées en 2 groupes :

- 1) les maladies associées à un défaut de la biogenèse du peroxysome
- 2) les maladies causées par une déficience d'une seule enzyme peroxysomale.

### 2.7.1 Les maladies liées à la biogenèse du peroxysome (Peroxisome Biogenesis disorders :PBDs)

Ces PBDs sont classées en 2 sous-groupes. Le premier est désigné sous le nom de « Zellweger Spectrum » et comprend le syndrome de Zellweger (ZS) qui est la forme la plus sévère des maladies peroxysomales, ainsi que l'adrénoleucodystrophie néonatale (NALD) et la maladie infantile de Refsum (IRD). Le « Zellweger Spectrum » est associé à de nombreuses mutations affectant 11 gènes codant différentes peroxines, PEX 1, 2, 3, 5, 6, 10, 13, 14, 16, 19 et 26. Les peroxines étant des protéines indispensables à la biogenèse des peroxysomes et à l'importation des protéines peroxysomales. Le deuxième sous-groupe des PBDs comprend la chondroplasia rhizomélique ponctuée de type I (RCDP type I), associée à la mutation du gène PEX7 codant pour la peroxine 7, un récepteur de type PTS2 (Wanders et Waterham, 2006a).

### 2.7.2 Les maladies liées à une déficience d'une enzyme ou un transporteur peroxysomal

Plusieurs maladies peroxysomales ont été décrites dans ce groupe. Ainsi, 4 maladies sont associées à la déficience de la  $\beta$ -oxydation peroxysomale : l'adrénoleucodystrophie liée au chromosome X (X-ALD, OMIM 300100), la pseudo adrénoleucodystrophie néonatale (P-NALD, OMIM 264470), la déficience en D-PBE (OMIM 261515) et la déficience en 2-méthyl-CoA racémase (AMACR, OMIM 604489).

La Pseudo-adrénoleucodystrophie néonatale P-NALD est une maladie peroxysomale autosomique récessive due à une déficience de l'acyl-coenzyme A oxydase 1 (ACOX1) ce qui conduit à une altération de la voie de la  $\beta$ -oxydation peroxysomale des acides gras affectant spécifiquement l'oxydation des d'acides gras à très longue chaîne (AGTLC). En conséquence, AGTLC s'accumulent dans le plasma et les tissus particulièrement le C26:0, tandis que les niveaux de l'acide phytanique, pristanique, DHCA et THCA restent normaux (Poll-The et al., 1988).

En 1988 Poll-The décrit les premières cas de P-NALD, où un frère et une sœur souffraient d'une hypotonie néonatale, un retard sévère du développement psychomoteur et une régression neuronale à partir de l'âge de 2 ans (Poll-The et al., 1988).

L'imagerie cérébrale a montré une démyélinisation progressive de la substance blanche et une biopsie du foie a révélé des peroxysomes élargis. Après identification du gène humain ACOX1 en 1994 par Varanasi (Varanasi et al., 1994), des analyses par southern-blot ont montrés l'existence d'une large délétion de 17Kb du gène de l'ACOX1. Depuis ce premier rapport, d'autres patients additionnels ont été décrits (Kurian et al., 2004; Rosewich et al., 2006; Suzuki et al., 2002; Suzuki et al., 1994; Watkins et al., 1995).

Les analyses cliniques dans une cohorte de 22 patients par Ferdinandusse et al., présentant tous une déficience de l'ACOX1 peroxysomale, ont montré que pratiquement tous les patients présentent une hypotonie néonatale (92%) et une substance blanche anormale (100%) avec une espérance de vie qui ne dépasse pas l'âge de 10 ans (Ferdinandusse et al., 2007). Toutefois, une étude par la même équipe a identifié deux cas des patients frère et sœur qui sont âgés respectivement de 52 et 55 ans présentant une déficience en ACOX1. Les deux patients présentent une accumulation plasmatique d'AGTLC mais un taux de DHA (C22:6  $\omega$ 3) normal avec des symptômes neurologiques atténués par rapport aux autres patients de P-NALD (Ferdinandusse et al., 2010).

### 3. Régulation des systèmes de $\beta$ -oxydation mitochondriale et peroxysomale

La régulation du métabolisme des lipides et des glucides est au cœur de l'homéostasie énergétique pour les organismes multicellulaire. Elle implique un système de contrôle qui est sensible à des stimulus tels que la disponibilité des nutriments, l'activité physiques, le stress, la lumière et la température (Desvergne et Wahli, 1999).

#### 3.1 Régulation transcriptionnelle du métabolisme des acides gras

La régulation de la transcription des gènes impliqués dans le métabolisme des acides gras (la synthèse, le stockage, la libération, l'absorption et l'oxydation) est actuellement considérée comme le principal mécanisme de régulation qui contrôle l'homéostasie lipidique (Desvergne et al., 2006). Cette dernière dépend des facteurs qui peuvent participer directement à la régulation transcriptionnelle des gènes codant pour des protéines impliquées dans les étapes clés du métabolisme (Desvergne et Wahli, 1999).

Plusieurs facteurs de transcription ont été décrits et étudiés ces dernières années :

- Les facteurs de la détermination et de la différenciation adipocytaire / Sterol Regulatory Element-Binding Proteins (TDA/SREBPs) qui sont des facteurs de transcription intracellulaire membranaires dont l'activité est régulée par la teneur cellulaire en stérol (Brown et Goldstein, 1997).
- Le facteur de transcription LXR (récepteurs X de foie) dont les ligands sont des dérivés oxydés de cholestérol (oxystérols) (Nuclear Receptors Nomenclature, 1999).
- Les Récepteurs Activés par les Proliférateurs de Peroxysomes (PPARs) qui sont des récepteurs nucléaires activés par les acides gras et qui contrôlent une variété de gènes dans plusieurs voies du métabolisme lipidique (Desvergne et Wahli, 1999).

#### 3.2 Récepteurs Activés par les Proliférateurs de Peroxysomes (PPARs)

Les récepteurs nucléaires PPAR (Peroxisome Proliferator-Activated Receptors) ont été découverts en 1990. Ils appartiennent à la superfamille des récepteurs stéroïdiens / thyroïdiens / rétinoïde.

Chez les vertébrés, y compris l'Homme, le Xénope, la souris, le rat, le hamster, trois isoformes différentes de PPAR ont été identifiées :

- PPAR $\alpha$  (Issemann et Green, 1990)
- PPAR $\beta$  (Dreyer et al., 1992)
- PPAR $\gamma$  (Dreyer et al., 1992)

Dans notre étude on s'est intéressé au PPAR $\alpha$  qui joue un rôle majeur dans la régulation transcriptionnelle des protéines impliquées dans l'oxydation des acides gras (Cherkaoui-Malki et al., 2001).

Le PPAR $\alpha$  est un récepteur nucléaire principalement exprimé dans les tissus présentant une forte activité de catabolisme des acides gras tels que le foie, le cœur les reins, les entérocytes et les muscles (Desvergne et al., 2006). Ce récepteur nucléaire est également retrouvé dans les cellules de la paroi vasculaire telles que les monocytes-macrophages au sein des lésions athérosclérotiques (Chinetti et al., 2000) et dans les lymphocytes T (Jones et al., 2002).

### 3.2.1 Mécanisme d'action

Le PPAR $\alpha$  fonctionne obligatoirement en hétérodimère avec un autre récepteur nucléaire tel que le récepteur rétinoïde X (RXR) (Kliewer et al., 1992). En effet, l'hétérodimère PPAR/RXR se forme indépendamment du ligand et recrute un complexe protéique corépresseur pour inhiber la transcription du gène cible (DiRenzo et al., 1997). Cependant, Lors de la liaison du ligand avec le PPAR $\alpha$ , le complexe corépresseur est libéré de l'hétérodimère PPAR/RXR, et le complexe coactivateur sera recruté. Ensuite, l'hétérodimère se fixe à l'ADN sur la région promotrice des gènes cibles, appelé Peroxisome Proliferator Response Element (PPRE), pour initier la transcription (Dowell et al., 1999).

Le PPAR influence l'expression des gènes à travers deux modes de régulation transcriptionnelle (Figure 12) (Kidani et Bensinger, 2012) :

l'activation : la liaison de ligand au PPAR induit des changements conformationnelles du domaine de liaison à l'ADN DBD, cette conformation spécifique permet la deuxième étape de l'activation de récepteur nucléaire qui correspond au recrutement de complexes coactivateur et par conséquent l'activation de la transcription des gènes cibles.

la répression : en absence de ligand, l'hétérodimère PPAR/RXR est lié aux PPRE en association avec un complexe corépresseur réprimant ainsi les gènes cibles.

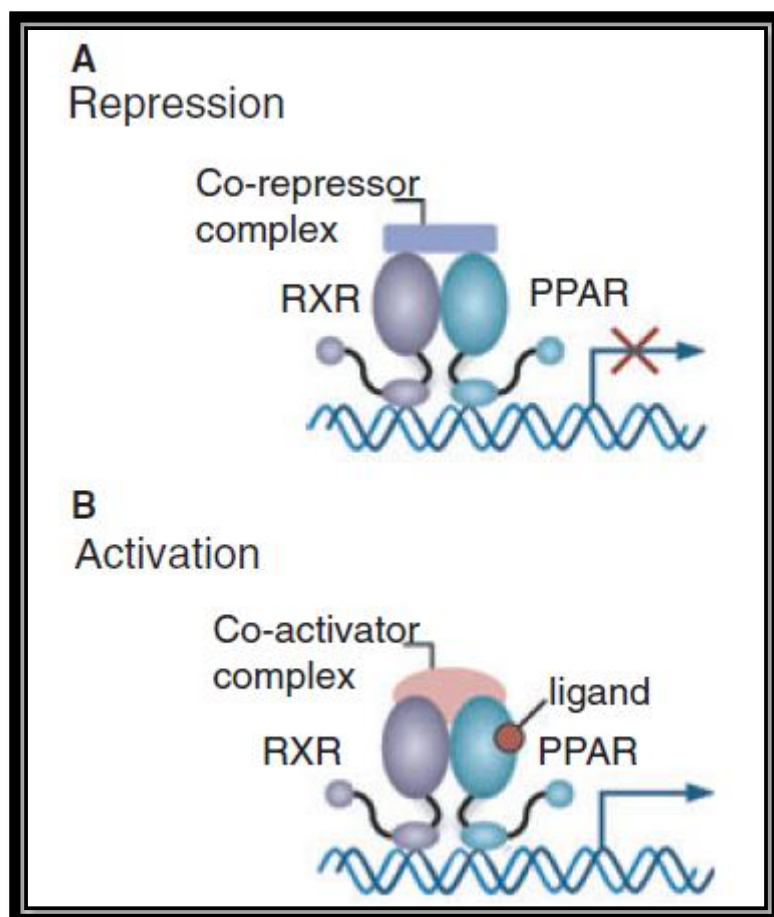


Figure 12 : Mécanisme d'action de la transcription par (PPAR)

(A) la répression : En absence de ligand, l'hétérodimère PPAR-RXR est lié aux PPRE en association avec un complexe corépresseur ce qui va donner la répression des gènes cibles. (B) l'activation : la liaison de ligand au PPAR va induire des changements conformationnelles de LBD, cette conformation spécifique permet la deuxième étape de l'activation de récepteur nucléaire qui correspond au recrutement de complexes coactivateur et par conséquent la transcription des gènes cibles. D'après (Kidani et Bensinger, 2012).

### 3.2.2 Les ligands des PPARs

Les ligands sont des composés qui déclenchent une stimulation de l'expression du gène cible lorsqu'ils sont liés au récepteurs nucléaires ce qui leur donne la propriété d'activateurs de PPAR. Les ligands de PPAR se divisent en deux catégories générales : les xénobiotiques synthétiques (exogènes) et des molécules biologiques (endogènes) (Tableau 6).

Les ligands synthétiques, appelés proliférateurs des peroxysomes, comprennent les médicaments hypolipémiants utilisés dans le traitement des dyslipidémies. Ces substances de structures diverses induisent des réponses pléiotropiques hautement reproductibles et similaires qui se manifestent par une prolifération des peroxysomes dans les cellules du

parenchyme hépatique et l'activation transcriptionnelle des gènes de système d'oxydation d'acides gras dans le foie de rat et de la souris (Pyper et al., 2010).

Les ligands endogènes ou molécules biologiques d'origine naturelle qui servent de ligands PPAR comprennent les acides gras et les dérivés d'acides gras (Hostetler et al., 2005), ces ligands peuvent être générées lors du catabolisme ou pendant la synthèse des acides gras (Chakravarthy et al., 2009). Plusieurs enzymes telles que la 8 -, 12 -, 15 - et 5-lipoxygénase, les cyclooxygénases et les cytochromes P450 utilisent les acides gras comme substrats pour produire des ligands de PPAR $\alpha$  (Brash, 1999; Crisafulli et Cuzzocrea, 2009; Ng et al., 2007).

Bien que de nombreux ligands synthétiques active le PPAR efficacement, il semble que PPAR $\alpha$  a évolué principalement pour la détection des lipides liés à la régulation de la dégradation des sources d'énergie (Reddy, 2004; Reddy et Rao, 2006).

Les approches scientifiques de l'identification des ligands ont révélé trois particularités concernant les propriétés des PPARs (Desvergne et Wahli, 1999) :

- Contrairement aux autres récepteurs de la superfamille, les récepteurs PPARs présentent la particularité de ne pas être activés par un ligand unique mais par un large spectre de molécules.
- les ligands se lient aux récepteurs PPARs avec une affinité relativement faible par rapport à l'affinité des hormones classiques pour leur récepteur correspondant.
- Un certain chevauchement de la reconnaissance des ligands par les trois isoformes, mais avec des affinités différentes. Par exemple les AGLC saturés et polyinsaturés se lient aux trois isoformes des PPARs, avec une plus forte affinité pour le PPAR $\alpha$ .

Tableau 6 : Ligands spécifiques de l'isoforme PPAR $\alpha$ . (Desvergne et Wahli, 1999)

Classe	Composés	
<b>Acides gras saturés</b>	Acide laurique C12 :0 Acide myristique C14 :0 Acide palmitique C16 :0 Acide stéarique C18 :0	
<b>Acides gras insaturés</b>	<b>Monoinsaturés (<math>\omega</math>2)</b>	Acide Petroselinique C18 :1
	<b>Polyinsaturés (<math>\omega</math>3)</b>	Acide $\alpha$ -Linolenique C18 :3 Acide Eicosapentaenoique C20 :5 (EPA) Acide Docohexaenoique C22 :6 (DHA)
	<b>Polyinsaturés (<math>\omega</math>6)</b>	Acide Linoleique C18 :2 Acide arachidonique C20 :4
	<b>Monoinsaturés (<math>\omega</math>9)</b>	Acide Palmitoleique C16 :1 Acide Oleique C18 :1
<b>Eicosanoïdes</b>	Leukotriene B4 8S-HETE 8R-HETE	
<b>Ligands synthétiques</b>	<b>Agents hypolipémians</b>	Ciprofibrate Acide Pirinixique (Wy-14643) Acide Eicosatetraynoique (ETYA; (Analogue d'acide arachidonique) GW 2331 (analogue de fibrate) GW 2433 (analogue de fibrate)
	<b>Inhibiteurs de Carnitine palmitoyl transferase I (CPT1)</b>	LY-171883
	<b>Inhibiteurs de l'acyl-CoA dehydrogenase</b>	Acide Ortylthiopropionique (OTP)

### 3.2.3 Rôle physiologique de PPAR $\alpha$

Les Acides gras sont des molécules biologiques ubiquitaires, ils sont utilisés en tant que source énergétique, régulateurs de la signalisation moléculaire et en tant que composants essentiels des membranes cellulaires. En effet, certains troubles les plus courants dans les



sociétés industrialisées (maladies cardiovasculaires, l'hyperlipidémie, l'obésité, résistance à l'insuline) sont caractérisés par des niveaux altérés d'acides gras ou de leurs métabolites. Il est donc important de contrôler les niveaux des acides gras (Forman et al., 1997). Pour cela la régulation de la transcription des gènes impliqués dans le métabolisme des acides gras est essentielle pour l'homéostasie lipidique (Desvergne et al., 2006). Cette régulation est exercée par des récepteurs nucléaires du type PPAR dont le PPAR $\alpha$  joue un rôle majeur (Cherkaoui-Malki et al., 2001).

a. Rôles des PPAR $\alpha$  dans le foie

Quel que soit le devenir des acides gras dans le foie, les deux premières étapes, le transport des acides gras à travers la membrane cellulaire et l'activation par un acyl-CoA, sont nécessaires pour le traitement ultérieur des acides gras. Ces deux étapes sont facilitées par l'induction d'une protéine transporteur d'acides gras (Martin et al., 1997) ainsi que par l'activation de la transcription du gène acyl-CoA synthétase d'acides gras à longue chaîne (Schoonjans et al., 1995). La formation des acyl-CoA précède soit par leur incorporation dans les triglycérides (la voie anabolique) ou leur oxydation (la voie catabolique) par deux voies principales : la  $\beta$ -oxydation peroxysomale et la  $\beta$ -oxydation mitochondriale. Pour chacune de ces deux voies, l'expression des certaines enzymes clés est régulée par PPAR $\alpha$  (Desvergne et Wahli, 1999).

La prolifération des peroxysomes correspond à une augmentation de la densité volumique des peroxysomes et de l'activité de la  $\beta$ -oxydation des acides gras peroxysomale. Cette activité est inductible par une grande variété de composés collectivement appelés proliférateurs de peroxysomes qui inclut certains médicaments hypolipidémiant (Lock et al., 1989). Ainsi, PPAR $\alpha$  activé par son ligand induit la transcription des gènes cibles codant plus particulièrement pour les enzymes de la voie de  $\beta$ -oxydation, telles que les gènes codant pour Acyl-CoA oxydase, l'enzyme bifonctionnelle et la  $\beta$ -cétotiolase qui sont des cibles directes de PPAR $\alpha$  (Marcus et al., 1993; Tugwood et al., 1992; Zhang et al., 1992). En revanche, le gène de la catalase qui contrôle la disposition de l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> produit par l'oxydation des acides gras, n'est pas directement réglées par le PPAR $\alpha$  (Desvergne et Wahli, 1999).

La  $\beta$ -oxydation mitochondriale contribue grandement à la production d'énergie ce qui fait que le rôle de PPAR $\alpha$  dans l'homéostasie énergétique est lié à l'ampleur avec laquelle il régule cette voie. En effet le PPAR $\alpha$  intervient dans la régulation de certaines enzymes clés de la voie de la  $\beta$ -oxydation mitochondriale du fait qu'il module l'expression d'une part, de la

carnitine palmitoyl transférase I (CPT I) qui catalyse la formation de la carnitine acyl gras pour la translocation à travers la membrane mitochondriale interne (Schreurs et al., 2010).et d'autre part, l'expression de l'acyl-CoA déshydrogénase à longue et moyenne chaîne (ACADL ,ACADM) qui catalyse la première étape de la voie de  $\beta$ -oxydation mitochondriale (Meng et al., 2009).

#### b. Maladie liée à la Stéatose hépatique

La maladie du foie gras est la maladie du foie la plus courante, car elle englobe un spectre morphologique large de la stéatose hépatique qui progresse vers la cirrhose jusqu'au carcinome hépatocellulaire (Reddy et Rao, 2006; Zafrani, 2004). C'est une maladie liée à l'accumulation de lipides au niveau hépatique (stéatose hépatique), et chez les sujets obèses elle peut subvenir avec ou sans résistance à l'insuline (maladie non alcoolique du foie gras) (Sozio et Crabb, 2008). Cette stéatose hépatique est le résultat de l'augmentation de la lipogénèse hépatique, de la diminution de la dégradation des sources de l'énergie et de la diminution de la sécrétion hépatique de triglycérides du foie (Pyper et al., 2010).

Vu sa capacité à réguler l'oxydation des acides gras, le PPAR $\alpha$  joue un rôle important dans la pathogénèse de la stéatose hépatique. Tout d'abord, le PPAR $\alpha$  influence l'expression des gènes hépatiques lipogéniques par la régulation précoce des facteurs de transcription SREBP-1c et le LXR $\alpha$  (Browning et Horton, 2004; Hebbachi et al., 2008). Ensuite, dans les conditions d'une demande accrue pour l'oxydation des acides gras, tels que le jeûne, le PPAR $\alpha$  est essentiel pour l'induction de certaines enzymes des systèmes d'oxydation des acides gras et par conséquent réduire la stéatose hépatique (Sanderson et al., 2009).

#### c. Effet hypolipidémique de PPAR $\alpha$

L'activation de PPAR $\alpha$  par un ligand réduit la production de lipoprotéine de très faible densité (VLDL) et améliore le catabolisme des particules riches en triglycérides, ce qui augmente indirectement la formation de lipoprotéine de haute densité HDL et l'élimination hépatique du cholestérol en excès (Lefebvre et al., 2006). De plus, le PPAR $\alpha$  régule la transcription de lipoprotéine lipase dans le foie et les muscles, ce qui conduit à une augmentation de l'hydrolyse de triglycérides (Pyper et al., 2010).

#### d. PPAR $\alpha$ et inflammation

L'inflammation est une partie de la réponse immédiate de l'organisme à une infection ou une blessure. Normalement, ces réponses inflammatoires sont contrôlées pour éviter des dommages excessifs à l'organisme. Cependant, si elles ne sont pas correctement contrôlées, les réponses inflammatoires peuvent promouvoir des maladies aiguës ou chroniques caractérisées par une production excessive d'eicosanoïdes, dérivées d'acide arachidonique, des cytokines inflammatoires et des molécules d'adhésion (Calder, 2006). Il ya plusieurs situations où l'inflammation est une force motrice de la maladie ou de l'aggravation d'un état pathologique, comme l'obésité, la stéatose hépatite non alcoolique et l'athérosclérose (Wahli et Michalik, 2012). En effet, l'inflammation peut induire des changements des taux circulants de lipides et des lipoprotéines, des augmentations des acides gras et de triglycérides dans le sérum et une diminution des taux de cholestérol HDL sériques (Khovidhunkit et al., 2004). Ce qui altère le métabolisme lipidique, et en particulier le métabolisme des acides gras. Dans le foie, l'inflammation provoque la diminution de  $\beta$ -oxydation qui s'accompagne d'une augmentation de la synthèse des acides gras et du renforcement de la transestérification des acide gras en triglycérides, conduisant ainsi à une augmentation de la production et la sécrétion de VLDL (Khovidhunkit et al., 2004).

Parmi les déclencheurs exogènes de l'inflammation on trouve des endotoxines bactériennes « les lipopolysaccharides ». Ce sont des composants de la paroi cellulaire des bactéries gram-négatives, qui peuvent activer directement les monocytes et les macrophages, par l'intermédiaire de l'activation de la voie de signalisation du facteur nucléaire NF- $\kappa$ b et la sécrétion des cytokines telles que le facteur de nécrose tumorale  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ); l'interleukine 1 (IL-1), l'IL-6, IL-8 ainsi que d'autres médiateurs (Calder, 2006).

Les recherches scientifiques ont montré que l'expression de PPAR $\alpha$  et de son coactivateur PGC-1 est diminuée dans le foie et le cœur des souris après l'administration de lipopolysaccharide (Feingold et al., 2004). En revanche, le facteur de transcription PPAR $\alpha$  inhibe la voie de signalisation du facteur nucléaire NF- $\kappa$ b par l'induction du facteur inhibiteur I $\kappa$ B $\alpha$ , ce qui diminue l'expression des gènes de diverses cytokines pro-inflammatoires (Kono et al., 2009).

#### 3.2.4 Les cofacteurs

L'activation transcriptionnelle des gènes est un processus complexe, qui implique la participation à la transcription de nombreux corégulateurs (Glass et Rosenfeld, 2000),

PPAR $\alpha$ , comme d'autres récepteurs nucléaires, interagit avec des coactivateurs ou des corépresseurs qui respectivement stimulent ou répriment son activité transcriptionnelle (Zoete et al., 2007). Depuis le clonage de SRC-1 (Steroid Receptor Coactivator) en 1995 (Onate et al., 1995), plus de 300 coactivateurs / corégulateurs ont été identifiés, et la liste loin d'être complète (Pyper et al., 2010).

#### a. Les corépresseurs

En absence d'un ligand spécifique, le PPAR $\alpha$  interagit avec des corépresseurs tels que NCoR (Nuclear coRepressor) et SMRT (Silencing Mediator for Retinoic and Thyroid Receptor) et le RIP140 (Receptor Interacting Protein 140) (Feige et al., 2006). Ces corépresseurs sont connus pour réprimer l'activité des récepteurs nucléaires en compétition avec les coactivateurs et en recrutant des effecteurs en aval tels que histones désacétylases (HDAC) (White et al., 2004).

#### b. Les coactivateurs

L'interaction avec le ligand induit un changement de conformation de PPAR et influence la libération du corépresseur et le recrutement du coactivateur (Xu et Li, 2003).

Les médiateurs de la liaison fonctionnelle entre les facteurs de transcription et l'appareil de transcription sont les coactivateurs. Les coactivateurs sont des protéines qui augmentent le taux de la transcription en interagissant avec des facteurs de transcription, mais elles ne se lient pas à l'ADN (Puigserver et Spiegelman, 2003).

La plupart des coactivateurs présentent peu de spécificité tissulaire d'expression. Cependant, le coactivateur PGC-1 $\alpha$  (peroxisome proliferator activator receptor  $\gamma$  coactivator-1 $\alpha$ ) présente une relative spécificité tissulaire d'expression. Ce coactivateur joue un rôle majeur dans le contrôle des métabolismes énergétique et glucidique (Tiraby et Langin, 2005).

### 3.3 Le PGC-1 $\alpha$ (peroxisome proliferator activator receptor $\gamma$ coactivator-1 $\alpha$ )

Le PGC-1 $\alpha$  (peroxisome proliferator activator receptor  $\gamma$  coactivator-1  $\alpha$ ) a été identifié en 1998 (Puigserver et al., 1998) dans le tissu adipeux brun comme coactivateur du récepteur nucléaire PPAR $\gamma$ . Il est fortement exprimé dans les tissus où les mitochondries sont abondantes et le métabolisme oxydatif est actif, comme le tissu adipeux brun (BAT), le cœur, et le muscle squelettique. Il est également bien exprimé dans le cerveau et le rein, alors que son niveau d'expression est faible dans le foie et très faible dans le tissu adipeux blanc (WAT) (Larrouy et al., 1999).

### 3.3.1 Interaction de PGC-1 $\alpha$ avec les récepteurs nucléaires

Pour coactiver la transcription d'un gène cible, le PGC-1 $\alpha$  doit être recruté par un facteur de transcription capable de se lier sur le promoteur du gène concerné. Le recrutement du coactivateur dépend du promoteur considéré (Puigserver et Spiegelman, 2003).

DE nombreux travaux ont révélé que le PGC-1 $\alpha$  interagit avec plusieurs récepteurs nucléaires :

- PPAR $\alpha$  PPAR  $\beta$  PPAR $\gamma$
- Le récepteur des oestrogènes ER $\alpha$
- Le récepteur des glucocorticoïdes
- Le récepteur de l'acide rétinoïque RXR $\alpha$
- Les récepteurs des hormones thyroïdiennes
- Le liver X receptor LXR $\alpha$
- Le farnesoid X receptor FXR
- ERR $\alpha$  et ERR $\gamma$  (estrogen-related receptor)
- MEF2C (myocyte enhancer factor 2)
- HNF4 $\alpha$  (hepatocyte nuclear factor 4)
- Foxo1 (forkhead box O)
- NRF1 (nuclear respiratory factor 1)

(Huss et al., 2002; Michael et al., 2001; Oberkofler et al., 2003; Puigserver et Spiegelman, 2003; Wu et al., 1999; Yoon et al., 2003; Zhang et al., 2004)

### 3.3.2 Mécanismes d'action de PGC-1 $\alpha$ à l'échelle moléculaire

Le PGC-1 $\alpha$  est impliqué dans l'activation de la transcription et la régulation de l'épissage des ARNm (Figure 13) (Puigserver et Spiegelman, 2003).

Le domaine d'activation transcriptionnelle N-terminal de PGC-1 $\alpha$  recrute des protéines ayant une activité histone acétyltransférase (HAT), indiquant l'implication de PGC-1 $\alpha$  dans l'initiation de la transcription de gènes particuliers. Deux domaines protéiques conservés dans l'extrémité C-terminale de PGC-1 $\alpha$  ayant une homologie avec des protéines impliquées dans la régulation d'ARN polymérase II. De plus, l'interaction de PGC-1 $\alpha$  avec des facteurs d'épissage et de l'élongation, indiquerait sa participation au processus de maturation post-transcriptionnel.

Dans l'ensemble, trois modèles possibles pourraient expliquer comment PGC-1 $\alpha$  affecte l'activation des gènes cibles particuliers. Dans certains cas, le PGC-1 $\alpha$  pourrait agir comme

un activateur transcriptionnel classique, par la liaison aux facteurs de transcription spécifiques. Dans ce modèle, le PGC-1 $\alpha$  reste lié au promoteur par l'intermédiaire du facteur de transcription et il est soupçonné que PGC-1 $\alpha$  pourrait également fournir un certain degré de spécificité de promoteur pour le facteur de transcription. Dans un second modèle, le PGC-1 $\alpha$  affecte certains gènes en ciblant le processus de formation d'ARN telles que l'élongation, l'épissage alternatif de l'ARNm, ou même la stabilité l'ARNm. Un troisième modèle serait de combiner ces deux modèles : une fois recruté par le facteur de transcription, le PGC-1 $\alpha$  recrute des complexes HAT. De plus, une fois l'initiation de la transcription a commencé, PGC-1 $\alpha$  seraient impliqués dans le processus d'élongation par l'interaction avec des facteurs d'élongation et des protéines de phosphorylation de l'ARN polymérase II (Puigserver et Spiegelman, 2003)

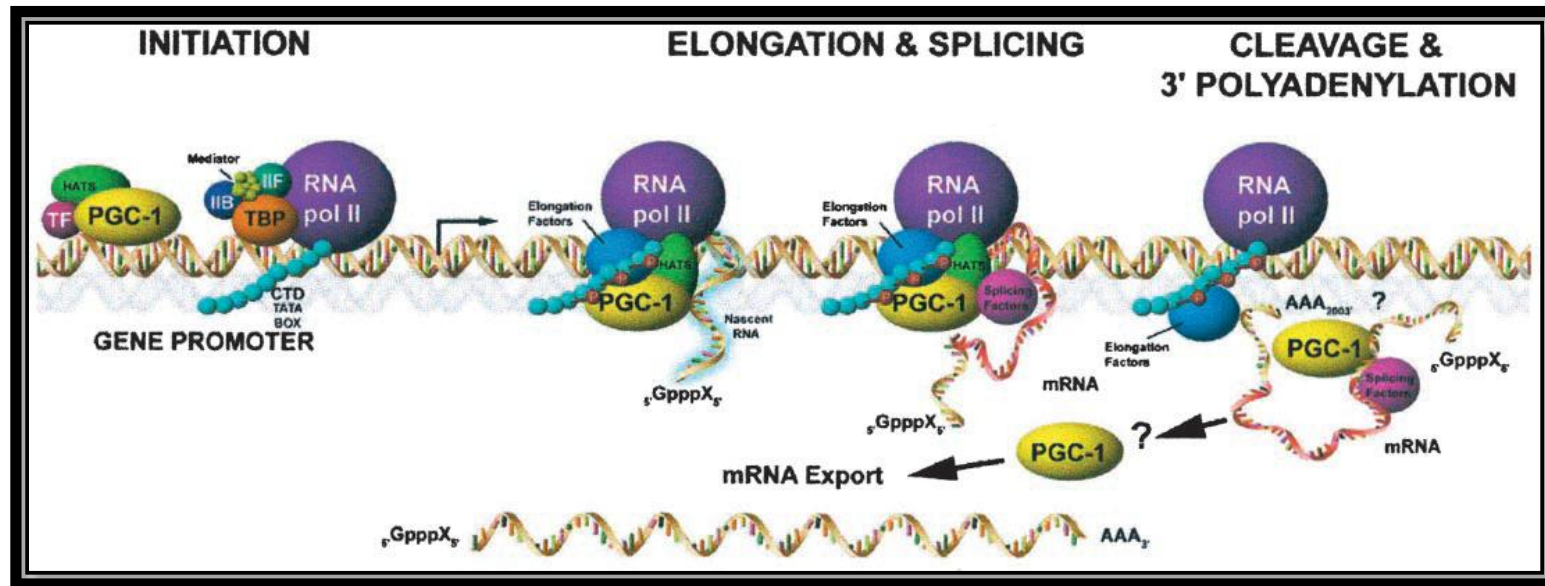


Figure 13 : Représentation des activités de PGC-1 $\alpha$  à l'échelle moléculaire.

Le PGC-1 $\alpha$  interagit avec les promoteurs des gènes par interaction directe avec les facteurs de transcription. Une fois la transcription est débutée, PGC-1 $\alpha$  interagit avec les facteurs d'élongation et de l'épissage qui participent à ces processus. Il est possible que PGC-1 transporte les protéines de la HAT à travers le processus d'élongation. Enfin, il pourrait également participer à la polyadénylation, le clivage, et l'exportation de l'ARNm par la liaison directe à l'ARNm. D'après (Puigserver et Spiegelman, 2003).



### 3.3.3 Rôle physiologique de PGC-1 $\alpha$

#### a. Rôle de PGC-1 $\alpha$ dans la néoglucogenèse

Les mammifères ont des systèmes de régulation pour maintenir la glycémie dans des limites étroites, malgré un accès intermittent à l'alimentation. La glycémie est contrôlée par la modulation hormonale de la production de glucose et de la captation périphérique du glucose. Le foie est le principal producteur de glucose et cela par deux voies différentes. La première est la glycogénolyse, ou la dégradation du glycogène qui se produit relativement à court terme. Une seconde voie, néoglucogenèse, est activé de moyen à long terme et implique la synthèse de glucose à partir des précurseurs tels que le lactate, le pyruvate, le glycérol et l'alanine (Postic et al., 2004; Puigserver et Spiegelman, 2003).

Le taux de la néoglucogenèse est contrôlée par les activités des trois enzymes clés: la phospho énoypyruvate carboxykinase (PEPCK), le fructose-1,6-bisphosphatase, et le glucose-6-phosphatase. La modulation hormonale de ces trois enzymes est principalement contrôlée au niveau transcriptionnel par l'insuline, le glucagon et les glucocorticoïdes (Postic et al., 2004). En effet la néoglucogenèse se produit dans les états de jeûne ou diabétiques dans lequel l'insuline est faible ou le foie est résistant à l'insuline. En particulier, l'insuline bloque l'action des hormones pro-néoglucogénique, le glucagon et les glucocorticoïdes (Puigserver et Spiegelman, 2003).

Toutefois, des études montrent que l'expression du PGC-1 $\alpha$  dans le foie est augmenté de façon spectaculaire par le jeûne (Herzig et al., 2001). De plus, le PGC-1 $\alpha$  est induit par le glucagon et les catécholamines qui stimulent la voie de l'AMPc (AMP cyclique) et de CREB (AMPc responsive element binding protein) (Yoon et al., 2001). PGC-1 $\alpha$  est également induit par une levée de l'inhibition exercée directement ou indirectement par l'insuline sur le promoteur de PGC-1 $\alpha$  (Daitoku et al., 2003; Puigserver et Spiegelman, 2003). Le jeûne induit aussi l'expression de PPAR $\alpha$ , qui, lorsqu'il est coactivé par le PGC-1 $\alpha$ , déclenche la transcription des gènes impliqués dans l'oxydation des acides gras au niveau hépatique (Herzig et al., 2001). En effet, à partir des données d'expression génique, le PGC-1 $\alpha$  stimule l'expression de l'ARNm pour les trois principaux gènes de la néoglucogenèse : PEPCK, le fructose-1,6-bisphosphatase, et le glucose-6-phosphatase. De plus, il stimule la capacité des hépatocytes à sécréter du glucose en présence des précurseurs de la néoglucogenèse (Tiraby et Langin, 2005).



La transcription des gènes codants des enzymes de la néoglucogenèse est faite par la coactivation des facteurs de transcription tels que HNF-4 $\alpha$  et le récepteur des glucocorticoïdes (Yoon et al., 2001). Cependant, L'interaction avec HNF-4 $\alpha$  utilise la fonction d'activation du domaine (AF) -2 de ce récepteur et l'LXXLL de PGC-1 $\alpha$ . Fait intéressant, l'interaction entre le domaine LXXLL de coactivateurs et l'AF-2 de la plupart des récepteurs est ligand dépendante, mais PGC-1 $\alpha$  peut coactiver la HNF-4 $\alpha$  en absence de ligands (Puigserver et Spiegelman, 2003) (Figure 14).

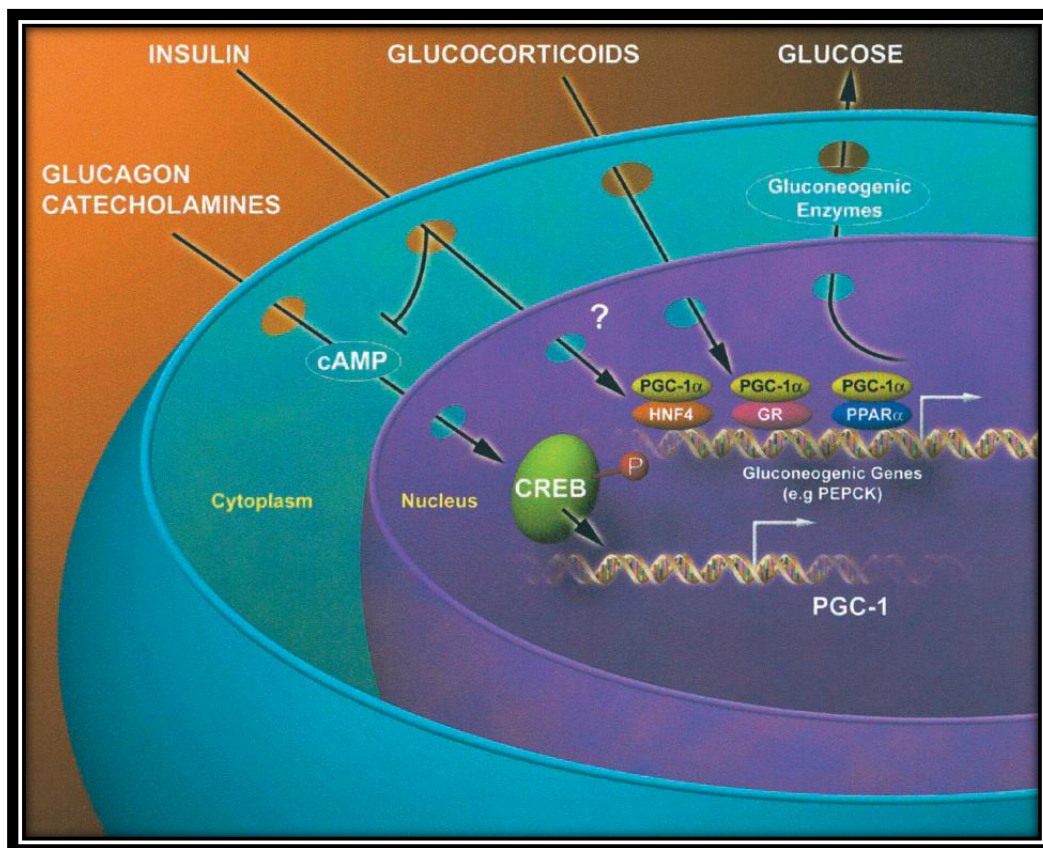


Figure 14 : Rôle de PGC-1 $\alpha$  dans la néoglucogenèse hépatique.

La production de glucose dans le foie est étroitement contrôlée par les hormones. Le glucagon et les catécholamines stimulent la voie de l'AMPc et de CREB, ce qui active la PGC-1 $\alpha$ . Le PGC-1 $\alpha$  est alors recruté par des facteurs de transcription différents qui se lient aux promoteurs des gènes codant pour des enzymes impliquées dans la néoglucogenèse comme la PEPCK. Les Glucocorticoïdes stimulent une interaction spécifique entre PGC-1 $\alpha$  et GR induisant une activation de la transcription de la PEPCK. L'insuline réprime l'activation de l'AMPc des gènes de la néoglucogenèse et réprime la transcription de PGC-1 $\alpha$ . AMPc : AMP cyclique, CREB : cAMP responsive element binding protein; GR : glucocorticoid receptor; HNF-4 $\alpha$  : hepatocyte nuclear factor-4 $\alpha$ , PEPCK : phosphoénolpyruvate carboxykinase. D'après (Puigserver et Spiegelman, 2003).

#### b. Rôle de PGC-1 $\alpha$ dans l'inflammation

L'activité transcriptionnelle de PGC-1 est induite par les cytokines pro-inflammatoires tels que IL1 $\alpha$ , IL1 $\beta$  et TNF via une phosphorylation directe par p38 MAPK (Puigserver et Spiegelman, 2003).

Par ailleurs, le traitement par le lipopolysaccharide induit une activation de PGC-1 $\alpha$  ce qui provoque une augmentation de la respiration et de l'expression des gènes liés au découplage mitochondrial dans les cellules musculaires in vitro et les muscles in vivo des souris (Puigserver et al., 2001). Par contre, au niveau des reins d'autres études ont montré que le traitement par LPS diminue fortement l'expression des gènes de PGC-1 $\alpha$ , HNF4 $\alpha$  et les gènes des voies de  $\beta$ -oxydation mitochondriale et peroxysomale (Feingold et al., 2008).

#### c. Rôle de PGC-1 $\alpha$ dans la biogenèse des mitochondries

La stimulation de l'expression de PGC-1 $\alpha$  induit la transcription de NRF1 et NRF2 (nuclear respiratory factor), deux facteurs de transcription qui se lient à la région promotrice d'un large spectre de gènes mitochondriaux codés au niveau nucléaire, y compris l'ATP synthase, le cytochrome-C, Complexe IV de la chaîne respiratoire et facteur de transcription mitochondrial A (mtTFA). Ce dernier est transloqué vers la mitochondrie, et stimule ainsi la biogenèse des mitochondries par la stimulation de la réplication de l'ADN mitochondrial et l'expression des gènes mitochondriaux (Puigserver et Spiegelman, 2003).

#### d. Rôle de PGC-1 $\alpha$ dans l'oxydation des acides gras

PGC-1 $\alpha$  est induit dans des situations où les acides gras deviennent le substrat énergétique préférentiel (naissance, jeûne et exercice). L'expression de PGC-1 $\alpha$  dans des myocytes cardiaques, dans des pré-adipocytes ou dans des adipocytes blancs humains sous-cutanés entraîne une augmentation des taux d'ARNm de l'acyl coenzyme A déshydrogénase à moyenne chaîne (ACADM) et de la carnitine palmitoyl transferase 1 (CPT-1), qui contrôle l'étape limitante de l'oxydation des acides gras (Tiraby et al., 2003). PGC-1 $\alpha$  interagirait avec PPAR $\alpha$  ou ERR $\alpha$  pour induire l'expression de ces gènes selon les types cellulaires (Mootha et al., 2004; Vega et al., 2000). Dans le foie, PGC-1 $\alpha$  co-active la transcription de l'isoforme hépatique de CPT-1 en coopération avec le facteur de transcription HNF4 $\alpha$  (Louet et al., 2002).

### III. Régulation du métabolisme lipidique par les huiles naturelles

En tant que ligands des récepteurs nucléaires, les acides gras peuvent influencer significativement les voies de signalisation cellulaires.

Parmi les classes des acides gras qui ont été identifiés comme des ligands de certains facteurs de transcriptions, il y a les acides gras insaturés à longue chaîne qui sont présents dans l'huile d'olive avec une proportion importante qui dépassent 80%.

En effet, l'huile d'olive est constituée essentiellement de triglycérides avec la particularité de sa richesse en acides gras mono-insaturé « l'acide oléique » qui représente plus que 73% de la composition totale. Les constituants non glycéridique de l'huile d'olive représentent de 0,5% à 1,0%, dont au moins 30 composés phénoliques (Miles et al., 2005).

Les études scientifiques ont montré que l'acide oléique a un effet bénéfique sur le risque de développement de maladies cardiovasculaires et sur le profil lipidique (Erkkila et al., 2006) car l'administration de cette acide gras chez l'homme diminue la concentration du LDL oxydées (Fito et al., 2007; Lapointe et al., 2006), du cholestérol LDL et de TG (Williams, 2001). Ainsi, le remplacement de glucides et de lipides saturés avec l'acide oléique conduit à une réduction de la glycémie et de la pression artérielle et à une augmentation des HDL chez les patients atteints de diabète (Julius, 2003). Cette variation des niveaux de ces composés lipidique tels que le diminution de triglycérides est due à l'augmentation de l'oxydation des acides gras par induction de la voie de la  $\beta$ -oxydation. Ceci est le résultat de l'activation de PPAR $\alpha$  par l'acide oléique et de la réduction de l'activité de Sterol Regulatory Element-Binding Protein (SREBP) qui se traduit par une diminution de la lipogenèse. De plus, cet acide gras alimentaire active le PPAR $\alpha$  et PPAR $\gamma$  pour augmenter l'oxydation des lipides, et diminuer la résistance à l'insuline ce qui conduit par conséquent à une réduction de la stéatose hépatique (Soriguer et al., 2006).

# **MATERIELS ET METHODES**

## I. Model expérimental

- Les souris sont de souche Swiss OF1, provenant de la société IFFA CREDO et élevées au laboratoire de l'institut Pasteur à Tit Melil Casablanca, ont été utilisées dans ce travail. Le poids moyen des souris était de  $18 \pm 3$ g.

- Les fibroblastes ont été utilisés dans ce travail. Ils proviennent du Laboratoire du Professeur Ronald J. Wanders : Genetic Metabolic Diseases, Department of Clinical Chemistry and Pediatrics, Academic Medical Center, Université d'Amsterdam, Pays-Bas. Les cultures de fibroblastes sont issues soit d'un patient sain (C3), soit d'un patient atteint de la P-NALD, déficient en ACOX1 (P7).

## II. Conditions expérimentales

### 1. Conditions d'élevage des souris

Les souris sont maintenues dans une animalerie à une température ambiante de  $22^{\circ} \text{C} \pm 3$  et un cycle de lumière de 12/12h tout au long de l'expérience. Les travaux sur les souris ont été réalisés selon les recommandations du comité d'éthique de l'université Hassan 1<sup>er</sup> Settat.

### 2. Conditions de culture des fibroblastes

Les cellules ont été cultivées dans du milieu DMEM avec du SVF 10%, du pyruvate de sodium 1 mM et des antibiotiques à 1% (pénicilline/Streptomycine), à  $37^{\circ} \text{C}$ , en atmosphère humide contenant du  $\text{CO}_2$  à 5%. L'entretien a été réalisé en boîte de pétri de  $50 \text{ cm}^2$  de surface d'adhérence, en changeant le milieu tous les 2-3 jours. Lorsque les cellules arrivaient à une confluence de 90 %, elles sont lavées avec 6 ml de DPBS, puis trypsinées avec 1,5 ml d'une solution de trypsine 0,05 %, EDTA 0,02%. L'action de la trypsine est arrêtée par l'ajout de milieu de culture contenant du SVF et le milieu contenant les cellules est centrifugé pendant 6 min. à 200g.

Toutes les expériences de culture cellulaire ont été réalisées dans des conditions stériles, sous une hotte à flux laminaire vertical. Les cultures sont maintenues dans un incubateur, qui permet le contrôle de la température ( $37^{\circ} \text{C}$ ) et de la concentration en  $\text{CO}_2$  (5%).

### III. Traitement

#### 1. Extraction de l'huile d'argan

L'huile d'Argan utilisée pour les traitements de souris ou de cellules provient de la région d'Aklim (Berkan, Nord-Est du Maroc). Elle a été préparée en juillet 2010 par un procédé d'extraction artisanal qui consiste respectivement en dépulpage des fruits, le concassage de la coque entre deux pierres, la torréfaction de l'amande oléagineuse et le broyage des amandes torréfiées à l'aide d'une meule en pierre. L'application d'une pression manuelle de la pâte permet l'obtention de l'huile qui est séparée par décantation. (Charrouf et Guillaume, 1999).

#### 2. Traitement des souris

##### 2.1 Préparation des aliments

Cents grammes de granulés destinés à l'alimentation des souris sont mélangés avec l'huile d'Argan ou l'huile d'Olive dissoutes dans l'acétone (6g de l'huile dans 50 ml d'acétone) ou avec l'acétone seule. L'alimentation de traitement est séchée sous la hotte pendant 24h pour évaporer l'acétone, puis conservée dans des sacs de plastique fermés.

##### 2.2 Traitement

Les souris Swiss provenant de l'Institut Pasteur Maroc ont été acclimatées aux conditions expérimentales du laboratoire pendant 10 jours, elles ont été maintenues à une température ambiante de  $22^{\circ} \text{C} \pm 3$  et un cycle de lumière de 12/12h tout au long de l'expérience. Le traitement des souris a été conforme aux recommandations du comité d'éthique de l'université Hassan 1er Settat.

Les souris (30 souris) ont été réparti en 6 lots soit 5 souris par lot (tableau).

Les souris ont reçu pendant 25 jours une nourriture enrichie à 6 % en huile d'Argan ou à 6 % en huile d'olive (6g de l'huile qui correspond à 6,53ml / 100g de nourriture). Seize heures avant la fin de traitement, les souris ont reçu une injection intra-péritonéale de Lipopolysaccharides (Sigma) (solution 1mg/ml dans de l'eau) avec une dose de  $100\mu\text{g}/20\text{g}$  de poids vif de souris ou  $\text{H}_2\text{O}$  pour le contrôle négatif.

	Lots					
	1	2	3	4	5	6
H <sub>2</sub> O (injection)	+	+	+			
AO		+			+	
OO			+			+
LPS (injection)				+	+	+

À la fin du traitement, les souris sont anesthésiées, sous une hotte, par inhalation de chloroforme. Ensuite, le sang est prélevé par ponction cardiaque à l'aide d'une seringue montée d'une aiguille. Puis centrifugé à 8000g pendant 2 min pour récolter le plasma. Les organes (foie, reins, cœur et muscle squelettique) sont prélevés et congelés rapidement dans la carboglace et stockés à -80 °C jusqu'à l'utilisation.

### 3. Traitement de cellules

Les cellules ont étéensemencées à raison de  $5.10^5$  C/boîte de pétri. Ensuite, les cellules sont incubées pendant 24h à 37°C et à 5 % CO<sub>2</sub> pour qu'elles puissent adhérer à la surface de la boîte ou du flacon.

L'huile d'Argan et l'huile d'olive ont été solubilisée dans de l'éthanol avec un facteur de dilution de 33 .Le LPS (Sigma) a été dissout dans de l'eau distillée à une concentration de 1mg/ml. Ensuite nous avons préparé les quatre milieux de culture contenant les solutions de traitements avec la composition suivante :

	Milieux de culture			
	1	2	3	4
Ethanol 0,2%	+		+	
AO 56ng /ml de milieu de culture		+		+
LPS 0,2µg /ml de milieu de culture			+	+

Après l'incubation des cellules pendant 24h, les cellules sont lavées deux fois par DPBS puis mises en contact avec le milieu de culture contenant la solution de traitement.

Après 24h de traitement, les cellules sont lavées deux fois par DPBS puis mises en contact pour une 2<sup>ème</sup> fois avec le milieu de culture contenant la solution de traitement.

Ensuite les cellules sont lavées par DPBS et trypsinées par une solution de trypsine (diluée 10x dans du DPBS) (Sigma) et centrifugées à 200g pendant 5min. les culots de cellules obtenus sont lavés deux fois par DPBS puis conservés à sec à -80°C jusqu'à l'utilisation.

#### IV. **Extraction d'ARN**

##### 1. A partir de tissu de foie

L'extraction d'ARN est faite à l'unité d'Appui Technique à la recherche Scientifique du Centre National pour la Recherche Scientifique et Technique selon la méthode de Trizol, en utilisant TRI Reagent® (Sigma-Aldrich) :

- Homogénéisation de tissus de foie avec 1ml de TRI Reagent
- Incuber 5 minutes à 15-30°C (Pour la dissociation complète des complexes de nucléoprotéines,)
- Ajouter 200 µl de chloroforme et vortexer pendant 15 secondes
- Incuber à 15-30°C pendant 15 minutes à température ambiante
- Centrifuge 15 minutes à 4°C et à 12.000g
- Transférer la phase aqueuse (supérieure) qui correspond à l'ARN dans un tube eppendorf
- Ajouter 500 µl d'isopropanol, mélangez délicatement et incuber à température ambiante pendant 10 minutes.
- Centrifuge 10 minutes à 4°C et à 12.000g. Le précipité d'ARN forme un culot au fond du tube
- Retirer avec précaution le surnageant
- Laver le culot avec 1 ml d'éthanol à 75%
- Centrifuge 15 minutes à 4°C et à 12.000g. L'ARN forme un visible granulé blanc.
- Retirer le surnageant.
- Sécher le culot par séchage à l'air
- Dissoudre l'ARN dans 50µl de RNAase-free water ou H<sub>2</sub>O milliQ
- Les ARNs sont conservés à -80°C



## 2. A partir de cellules en culture

L'extraction des ARN totaux a été réalisée, à partir de culot obtenu après traitement, en utilisant le kit d'extraction RNeasy (Qiagen) selon les recommandations du fournisseur.

Le kit est composé de trois tampons : - Tp RLT  
- Tp RW1  
- Tp RPE

Les centrifugations sont réalisées à température ambiante dans une centrifugeuse (eppendorf).

L'extraction se déroule en 18 étapes comme suit:

- Ajouter au culot de cellules 350µl de Tp RLT (lyse les cellules et inhibition des activités RNAases) et mélanger avec la pipette.
- Ajouter 350µl d'éthanol 70% et bien mélanger.
- Déposer 700µl de lysat cellulaire sur une mini-colonne RNeasy Spin.
- Centrifuger 15secondes à température ambiante et à une vitesse  $\geq 8000g$ . (Fixation des ARN totaux sur la colonne)
- Ajouter 700µl de Tp RW1 sur la colonne (lavage).
- Centrifuger 15secondes à température ambiante et à une vitesse  $\geq 8000g$ .
- Traitement de lysat cellulaire en utilisant le kit DNase (Qiagen). Après ajout de 80µl de la solution de DNase (10µlDNase+70µ tampon RDD), nous réalisons une incubation pendant 20minutes à température ambiante.
- Ajouter 350µl de Tp RW1 sur la colonne (lavage)
- Centrifuger 15secondes à température ambiante et à une vitesse  $\geq 8000g$ .
- Ajouter 500µl de TpRPE sur la colonne (lavage).

Remarque: Le tampon RPE est livré sous forme concentrée. Assurez-vous que l'éthanol est ajouté au tampon RPE avant utilisation.

- Centrifuger 15secondes à température ambiante et à une vitesse  $\geq 8000g$ .
- Ajouter 500µl de TpRPE sur la colonne (lavage).
- Centrifuger 15secondes à température ambiante et à une vitesse  $\geq 8000g$ .

- Centrifuger 1min à 8000g à température ambiante.
- Transférer la colonne sur un eppendorf de 1.5ml.
- Déposer au centre de la colonne 30 à 50µl de RNAase-free water ou H<sub>2</sub>O milliQ pour éluer les ARNs.
- Centrifuger 15secondes à température ambiante et à une vitesse  $\geq$  8000g.
- Répéter les deux dernières étapes.

Les ARNs sont conservés à -80°C

## V. Dosage des ARNs par spectrophotométrie UV

Le dosage des ARN totaux est fait par spectrophotométrie, en utilisant une Cuve Traycell qui permet une dilution virtuelle de 10 ou 50 fois. Cette cellule est conçue pour analyser de très petits volumes d'échantillon (0,7 à 5µl).

La mesure de l'absorbance est effectuée à la longueur d'onde 260 nm. Une seconde mesure à 280 nm permet de contrôler la pureté de la préparation, à savoir la présence de protéines résiduelles dans la solution d'ARN.

Une unité d'absorbance à 260nm correspond à 40µg d'ARN/ml.

## VI. Obtention des ADNc par réaction de transcription inverse

Pour des raisons de coût et de changement de fournisseur entre le moment où les traitements *in vivo* ont été réalisés et les traitements de cellules *in vitro* ont été effectuées, nous avons utilisé deux kits différents pour l'obtention des ADNc et pour la qPCR. Nous avons bien sûr veillé à ce que les gènes contrôles soient les mêmes et que les valeurs de CT obtenues soient équivalentes.

### 1. Echantillons d'ARNs obtenus à partir de tissus

La transcription inverse est la synthèse d'un brin d'ADN complémentaire à partir d'une matrice ARN grâce à une reverse-transcriptase ou ADN polymérase ARN-dépendante.

La réaction est réalisée avec un Kit SuperScript™ III Reverse Transcriptase (Invitrogen)

1µg d'ARN totaux, 2µl Random primers à 50µg/ml(Promega), 0,5µl de désoxyribonucléotide triphosphate (dNTP) 10 mM (Promega) sont rassemblés dans un tube Eppendorf (0,2 ml) le volume est complété à 6,5µl par l'eau milli-Q.

Le mélange est incubé 5 minutes à 65°C dans le Thermocycleur Eppendorf (Mastercycler Personal Eppendorf), puis les tubes sont placés dans la glace pendant une minute.

Ensuite, on ajoute dans chaque tube 3,5µl d'un Mix constitué par :

5X First Strand Buffer(µl) (Invitrogen)	2
Dithiothreitol (DTT) (µl)	0,5
RNase OUT (µl) ( <b>inhibiteur de RNAase</b> ) (Invitrogen)	0,5
Superscript III (µl) (Invitrogen)	0,5

La réaction est incubée 30min à 50°C. Ensuite, l'enzyme est dénaturée par chauffage pendant 15 minutes à 70°C. À la fin de l'incubation on ajoute 90µl d'eau milli-Q dans chaque tube (Vf= 100µl). Les échantillons sont gardés à -20°C jusqu'à utilisation.

## 2. Echantillons d'ARNs obtenus à partir de cellules

Deux µg d'ARN totaux et 1µl Random primers à 50µg/ml(Promega) sont rassemblés dans un tube Eppendorf (0,2 ml). Le volume est complété à 15µl par l'eau milli-Q. puis incubés 5 minutes à 70°C dans le thermocycleur (MastercyclerR Personal Eppendorf) pour dénaturer les structures secondaires. Dans chaque tube sont ajoutés 5 µl de tampon M-MLV 5X (Moloney-Murine Leukemia Virus-Reverse Transcriptase, Promega), 1,25µl de dNTP 10 mM (Promega), 0,625 µl (40 unités) d'inhibiteur d'ARNase (RNasin, Promega) et 1 µl de M-MLV-RTase (200 u/µl, Promega) et complété par nuclear-free water pour un volume final de 25µl. La réaction est incubée 1 heure à 37°C. Les échantillons sont gardés à -20°C jusqu'à utilisation.

## VII. Préparation des échantillons pour la qPCR

Une gamme étalon est préparée pour suivre la proportion moyenne de l'ADN à chaque cycle d'amplification qui correspond à l'efficacité de la réaction de qPCR. Pour cela, 25µl sont prélevés de chaque échantillon et mélangés dans un tube eppendorf. Une série de dilution en cascade avec un facteur de dilution de 2 pour avoir une gamme standard avec 6 points.

Dans le cas d'un traitement de 8 échantillons :

Nous avons pris 25µl de chaque échantillons pour avoir un volume final de 200µl = 8x25

100µl de ce volume final est prise et diluée avec un facteur de dilution de 2 en mettant 100µl de l'eau pour avoir une solution de 200µl dilué 2fois. Et la dilution en cascade poursuit jusqu'à un facteur de dilution de 32fois pour avoir une gamme d'étalonnage de 6points

Les échantillons	1	2	3	4	5	6
Volume des échantillons ( $\mu\text{l}$ )	200	100	100	100	100	100
Volume d' $\text{H}_2\text{O}$	0	100	100	100	100	100
Facteur de dilution	1	2	4	8	16	32

(On ajoute 225 $\mu\text{l}$  de l'eau milli-Q au 75 $\mu\text{l}$  restant des échantillons, on aura à la fin 300 $\mu\text{l}$  d'ADNc.)

Les ADNc sont gardés à  $-20^\circ\text{C}$  jusqu'à utilisation.

## VIII. Réaction de qPCR

La réaction de PCR quantitative ou qPCR permet à chaque cycle d'amplification, grâce à un marqueur fluorescent (agent intercalant), de mesurer l'intensité de fluorescence émise à chaque cycle. Cette fluorescence est directement proportionnelle à la quantité d'amplicons produits. Ceci permet de suivre la cinétique de la réaction et donc la quantification de l'ADN amplifié, reflet du taux d'expression de l'ARN messager.

Le gène de référence utilisé, pour normaliser les résultats de la qPCR, est celui codant la phosphoprotéine ribosomale acide Po (36B4).

Nous avons utilisé l'appareil **StepOnePlus real-time PCR system** (Applied Biosystems) et des plaques 96puits (Applied Biosystems).

### 1. In-vivo

Le fluorophore (agent intercalant) utilisé est le **SYBR® Green** (Qiagen).

Pour analyser les échantillons, dans chaque puits on met un volume réactionnel de 12,5 $\mu\text{l}$  composé par 2,5 $\mu\text{l}$  d'ADNc et un Mix constitué par :

Mix	1 puit ( $\mu\text{l}$ )
SYBR® Green (Qiagen)	6,25
oligo sens à 100 $\mu\text{M}$	0,04
oligo anti-sens à 100 $\mu\text{M}$	0,04
$\text{H}_2\text{O}$ mQ	3,67
Total	10

### 2. In-vitro

Le fluorophore (agent intercalant) utilisé est le **BRYT GREEN** (Omega).

Pour analyser les échantillons, dans chaque puits on met un volume réactionnel de 25µl composé par 5µl d'ADNc et un Mix constitué par :

Mix	1 puit (µl)
GOTAG Master Mix 2x (Omega)	12,5
oligo sens à 100µM	0,04
oligo anti-sens à 100µM	0,04
ROX (Omega)	0,25
H <sub>2</sub> O Nucléases-free	7,17
Total	20

La qPCR se déroule en 3 étapes :

la 1<sup>ère</sup> étape :

Augmentation de température à 95°C pendant 10min pour dénaturer l'ADN

la 2<sup>ème</sup> étape :

40 cycles d'amplification d'ADN, chaque cycle constitué par deux étapes :

95°C pendant 15 secondes pour dénaturer l'ADN

60°C pendant 1minute pour hybridation et élongation

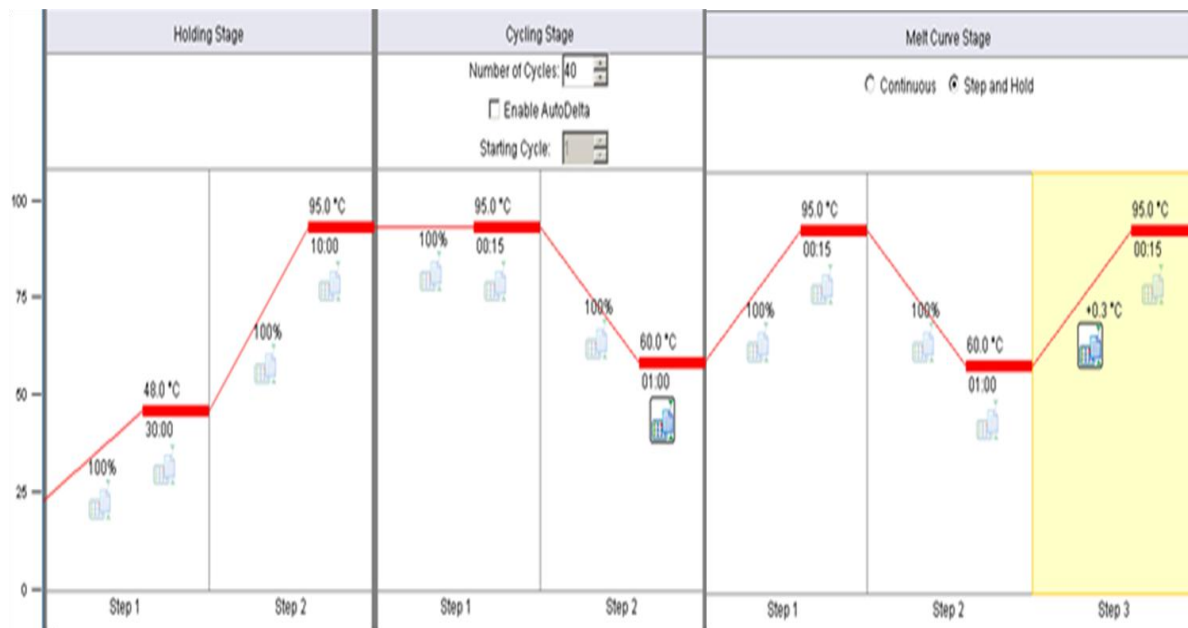
Un seuil de fluorescence est programmé. Quand la fluorescence qui correspond à la quantité de l'ADN amplifiée dépasse significativement le seuil programmé on obtient le numéro de cycle PCR seuil "Ct" (Cycle Threshold ou cycle seuil). C'est cette valeur qui est à la base des calculs des  $\Delta\Delta Ct$  de gène cible entre deux traitements différents, avec :

$$Ct_{\text{gène cible}} - Ct_{\text{contrôle endogène (gène de référence)}} = \Delta Ct$$

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

La 3<sup>ème</sup> étape :

A la fin de la phase d'amplification, après le dernier cycle, la température augmente rapidement à 95°C pour dénaturer l'ADN double brin. Puis redescend à 60°C ce qui permet la renaturation de l'ADN et par conséquent une augmentation du signal de la fluorescence. L'augmentation de la température, par palier de 0,3°C toute les 10 secondes jusqu'à 95°C, diminue progressivement la fluorescence et cela permet d'obtenir une courbe de fusion qui indique la température de fusion (T<sub>m</sub>) qui correspond à la température pour laquelle 50 % de l'ADN est dénaturé. Pour l'amplification spécifique d'un gène donné, un pic d'intensité variable doit être observé sur la courbe de fusion.



L'analyse des données est faite par un logiciel « Relative Expression Software Tool » (REST), qui compare deux ou plusieurs groupes de traitements ou de conditions, avec jusqu'à 100 points de données dans le groupe échantillon ou contrôle, pour des gènes de référence multiples et jusqu'à 15 gènes cibles. Le modèle mathématique utilisé est basé sur la correction par l'efficacité de PCR et l'écartypes des points du groupe de l'échantillon (s) et le groupe témoin (s) (Pfaffl et al., 2002).

## IX. Préparation d'homogénats

### 1. Homogénats de foie

20 à 100 mg de tissu de foie sont homogénéisés au Potter dans 0.2 ml du tampon A : Saccharose 250 mM (Fluka), EDTA 2 mM (Sigma-Aldrich), Tris-HCl 20 mM (Sigma-Aldrich), pH 7.5 en utilisant 0.2 ml du tampon. L'homogénat est centrifugé à 600g pendant 5 min à une température de 4°C et le surnageant est collecté et constitue l'extrait brut qui est stocké à -80°C jusqu'à utilisation.

## 2. Homogénats de cellules

Le culot de cellules obtenu est repris dans 200µl de DPBS. Les cellules sont lysées par un Potter électrique (6 allers-retours). Cette lyse est suivie d'un passage aux ultra-sons de l'échantillon : 3 cycles de 15 secondes à 70W dans de la glace.

L'extrait obtenu est centrifugé à 20 000 g pendant 6 minutes. Le surnageant qui présente l'extrait cellulaire est collecté, puis congelé à -80°C jusqu'à utilisation.

NB : l'activité enzymatique est mesurée dans la même journée de la préparation de l'extrait.

## X. Dosage des protéines

Le dosage des protéines est fait par spectrophotométrie selon la méthode de Bradford (Bradford, 1976). C'est une méthode de dosage colorimétrique basée sur le changement de la couleur du bleu de Coomassie après liaison avec les protéines. Le changement de l'absorbance à 595 nm est directement proportionnelle à la concentration en protéines.

Le dosage est effectué en utilisant l'extrait 2µl, l'eau distillée 78µl et le réactif de Bradford 120 µl (dilué 5 fois) (BioRad Protein Assay). Une gamme étalon de 1 à 10 µg de protéines est effectuée avec une solution de sérum albumine bovine (BSA) (Sigma-Aldrich) à 1 mg/ml.

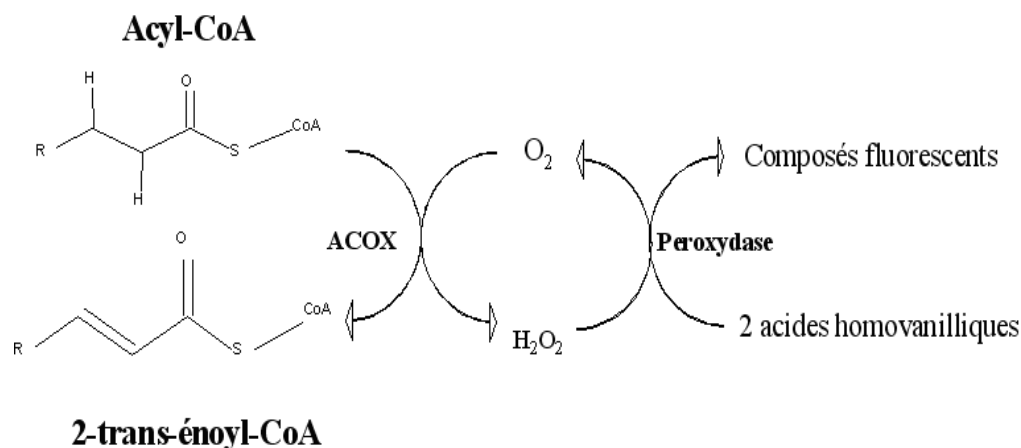
Après 10 minutes d'incubation à température ambiante, on mesure l'absorbance à 595 nm contre un blanc contenant l'eau distillée 80µl et le réactif de Bradford 120µl.

## XI. Mesure des activités enzymatiques

### 1. Mesure de l'activité acyl-CoA oxydase 1

La mesure de l'activité enzymatique de l'ACOX1 a été réalisée par mesure de la fluorescence émise à 420 nm par un composé fluorescent excité à 310 nm. Ce composé provient de la réaction, catalysée par la peroxydase, entre une molécule d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> produite lors de la réaction catalysée par l'ACOX1 et deux molécules d'acide homovanillique (Brocard et al., 1993). Dans un premier temps, une gamme étalon d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> de 0 à 5 µM a été réalisée en préparant un milieu réactionnel composé de tampon Tris 55 mM pH 8,3, d'acide homovanillique 27 mM, de peroxydase HRP 1 mg/ml. La réaction est déclenchée par l'addition des solutions de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> de concentrations connues. Le volume réactionnel final est de 200 µl. Dans un deuxième temps, la mesure de l'activité ACOX1 a été réalisée en utilisant

le même milieu réactionnel que précédemment dans lequel est ajouté du palmitoyl-CoA à 50  $\mu\text{M}$  (substrat de l'ACOX1). La réaction est déclenchée par l'addition de l'extrait de foie ou cellulaire. La fluorescence est mesurée grâce à un fluorimètre à plaques (FLx 800, Bio-Tek instruments) thermostaté à 30°C. Le temps de lecture est de 30 min. Pour chaque réaction, un blanc ainsi qu'un témoin positif (acyl-CoA oxydase d'*Arthrobacter*, réf. A2167, Sigma-Aldrich) sont réalisés en parallèle dans les mêmes conditions (Brocard et al., 1993).



Ces tests ont été réalisés sur une plaque de 96 puits en utilisant un fluorimètre (FLx 800, Bio-Tek Instruments) thermostaté à 30°C.

La réaction est déclenchée par l'addition de 10  $\mu\text{l}$  d'extrait de foie ou 25 d'extrait cellulaire dans un milieu réactionnel ( $V_f=200\mu\text{l}$ ) composé de :

Mix	1 puit( $\mu\text{l}$ )
Tampon Tris 1M ph 8,3	11
Acide homovallinique (HVA) 27mM	6
Peroxydase (HRP) (1mg/ml)	2,5
Aminotriazole (AT) 1M (84,04mg/ml)	2
Palmitoyl-CoA (PCA) 0,5mM	20
H <sub>2</sub> O (qsp 175)	133,5

40000RFU correspond à 1 $\mu\text{M}$  d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

## 2. Mesure de l'activité acyl-CoA déshydrogénase :

L'acyl-CoA déshydrogénase (ACAD) est l'enzyme qui catalyse la première réaction de la  $\beta$ -oxydation mitochondriale :





La mesure de l'activité enzymatique des ACADs est basée sur la mesure de la cinétique de réduction de la forme oxydée de 2,6 DiChlorophénolIndoPhénol (DCIP) (bleu) par FADH<sub>2</sub> suivie par spectrophotométrie à 600 nm (Flatmark et coll., 1976).

Ces tests ont été réalisés sur une plaque de 96 puits en utilisant un spectrophotomètre.

La réaction est déclenchée par l'addition de 20 µl de substrat (0,5mM) dans le milieu réactionnel (Vf=200µl) composé de :

Milieu réactionnel	1 puits (µl)	[c] finale
Tampon phosphate 0,1M	40	20mM
FAD 10mM	1,54	100µM
DCIP 0,05%	20	0,005
Extrait de foie	4	
substrat 0,5mM	20	50µM
H <sub>2</sub> O	114,46	
Volume final	200	

Nous avons utilisé quatre dérivés ester-CoAs d'acide gras de différentes longueurs de chaîne pour mesurer l'activité enzymatique des différents ACADs :

Butyryl-CoA (C4), Octanoyl-CoA (C8) , Lauroyl-CoA (C12) , Palmitoyl-CoA (C16).

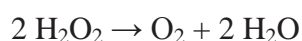
La réaction enzymatique est suivie pendant 3 minutes. L'unité enzymatique est définie comme étant la quantité d'enzyme produisant une variation d'absorbance d'une unité par minute dans 0,2 ml de volume à 30°C et à pH7 (λ=600nm).

Une unité correspond à 0,02381 d'absorbance, selon la convention du système international, correspondant à la quantité d'enzyme catalysant la déshydrogénation de 1 µmole de substrat par minute.

Ces mesures d'activité ACADs ont été réalisées au sein de Laboratoire de Pharmacologie et Pathophysiologie Cardiovasculaires Expérimentales à la faculté de Médecine et Pharmacie de l'Université de Bourgogne à Dijon.

### 3. Mesure de l'activité Catalase :

La catalase est une enzyme qui catalyse la dismutation de l'eau oxygénée (peroxyde d'hydrogène) :



L'activité de la catalase est déterminée par la disparition à 240 nm de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> avec un facteur d'extinction de 43,6 M<sup>-1</sup>.cm<sup>-1</sup> (Ni et al., 2001) durant une minute à une température de 25 °C.

Les tests ont été réalisés sur une plaque de 96 puits en utilisant un spectrophotomètre.

La réaction est déclenchée en ajoutant 40µl de peroxyde d'hydrogène 75mM dans le milieu réactionnel (Vf=200µl) composé de 100µl de tampon phosphate de potassium (0,1 M, pH 7,4) ,59µl de l'eau distillée et 1µl de l'extrait.

La mesure d'activité de la catalase a été réalisée au sein de Laboratoire de Pharmacologie et Pathophysiologie Cardiovasculaires Expérimentales à la faculté de Médecine et Pharmacie de l'Université de Bourgogne à Dijon.

## **XII. Analyse de l'expression de protéines par Western-blot**

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

### **1. Préparation des échantillons**

Dix microgrammes de protéine sont repris dans un tampon dénaturant (Tris HCl 250mM, glycérol 40%,β-mercaptoéthanol 20%, sodium dodécyl sulfate (SDS) 10%, blue de Bromophenol et à pH 6,8).

Les échantillons préparés sont chauffés à 100°C pendant 2minutes pour dénaturer les protéines

### **2. Séparation des protéines par électrophorèse sur gel en SDS-PAGE (PolyAcrylamid Gel Electrophoresis)**

Un gel de séparation de 8 à 14% (selon le poids moléculaire de la protéine cible) d'acrylamide/bisacrylamide (rapport : 37,5/1) et d'épaisseur 1 à 1,5 mm est d'abord coulé puis un gel de concentration de 4% est coulé dans un système d'électrophorèse Biorad. Les échantillons sont déposés dans le gel de concentration de 4% (Tris HCl 125 mM, SDS 0,1%, acrylamide/bisacrylamide 4%, pH6,8) à 70V, puis séparés à 120V dans le gel de séparation (Tris HCl 375 mM, SDS 0,1%, acrylamide/bisacrylamide 8 à 14%, pH8,8). La migration est fait dans un tampon d'électrophorèse composé par Tris base 50mM, Glycine 384mM et sodium dodécyl sulfate SDS 0,1% pendant 2 heures.

### 3. Transfert sur membrane des protéines et immunodécoration

Après leur séparation, les protéines sont transférées sur membranes polyvinylidène difluoride (PVDF) ou nitrocellulose (Biorad) en milieu liquide dans un tampon de transfert Tris/glycine/Acide borique sous l'action d'un champ électrique de 50V pendant une à deux heures. Les membranes obtenues sont ensuite incubées durant une heure ou sur la nuit sous agitation dans une solution de saturation PBS1X Tween-20 0,1% à laquelle sont ajoutées 5% de lait délipidées ou 5% de BSA. Les membranes sont ensuite incubées avec les anticorps primaires, dirigées spécifiquement contre les protéines étudiées diluées et incubées dans une solution de PBS1X Tween-20 0,1%, de lait délipidées 5% ou de BSA 5% sur la nuit à 4 °C sous agitation. Le lendemain, les membranes sont rincées trois fois 5 minutes avec du PBS1X puis incubées 1 heure en présence de l'anticorps secondaire couplé à la peroxydase HRP (Santa Cruz) diluée au 1/10000 dans PBS1X tween-20 0,1% lait 5%.

### 4. Détection par chimioluminescence

La membrane est lavée 3 fois avec tampon TBS-Tween 20 (0,1%) pendant 5 minutes à température ambiante sous agitation douce. Ensuite elle est imbibée par une solution chimioluminescente (Santa Cruz) pendant 2 minutes.

La détection et la capture de chimiluminescence sont faites par un appareil ChemiDoc MP Imaging System (Bio Rad), et l'analyse des bandes est fait par le logiciel Image Lab (Bio Rad). Le temps d'exposition du film varie en fonction de signal obtenu de 1 à 30 minutes.

## XIII. Immunofluorescence

Les cellules sont trypsinées puisensemencées en mettant 25000cellules/puits sur une lamelle ronde dans des plaques de 24 puits.

Le protocole d'immunomarquage est le suivant :

- Eliminer le milieu de culture
- Laver deux fois par PBS 1× (1ml)
- Ajouter 800 µl de Paraformaldéhyde (PFA) 4% sur chaque lamelle (pour la fixation des cellules),15min à température ambiante
- Laver deux fois par du PBS 1× (1ml)

- Ajouter 1ml de PBS 1× 0.2% tritonX100 (pour perméabiliser les cellules) 10 min. à température ambiante
- Laver deux fois par du PBS 1× (1ml)
- Saturer la lamelle avec 1 ml de PBS 1x 0.5%BSA, 10 min. à température ambiante
- Laver deux fois par PBS 1× (1ml)
- Ajouter 100µl d'anticorps primaire dilué dans du PBS 1x 1%BSA,30 min. à température ambiante
- Laver deux fois par du PBS 1× (1ml)
- Ajouter 100 µl d'anticorps secondaire dilué dans du PBS 1x 1%BSA, 1h à température ambiante et à l'abri de la lumière
- Laver deux fois par du PBS 1× (1ml)
- Ajouter 100 µl de Hoechst (1µg/ml) (intercalant qui se fixe sur l'ADN et colore les noyaux en bleu), 10min à température ambiante et à l'abri de la lumière
- Laver deux fois par du PBS 1× (1ml)
- Avec une aiguille et une pince décoller et égoutter la lamelle
- Mettre 10 µl du liquide de montage sur une lame et superposer la lamelle sur la lame du côté où il y a les cellules.
- Laisser la lame une nuit à 4°C (pour qu'elle sèche lentement)
- Les lames sont visualisées avec un microscope à fluorescence (AxioSkope,Zeiss)

Il est possible d'utiliser un mélange de deux anticorps dans la même solution en respectant leurs dilutions mais les anticorps primaires doivent être synthétisés dans deux animaux différents et les anticorps secondaires (Invitrogen) doivent avoir des fluorochromes de couleurs différents.

Les anticorps secondaire sont marqués à l'Alexa Fluor 488nm (colorant fluorescent, excitation à 488nm et émission à 520nm) Vert ou à l'Alexa Fluor 594nm (colorant fluorescent, excitation à 590nm et émission à 617nm) Rouge.

# RESULTATS

## I. Evaluation de l'acide férulique dans l'huile d'Argan

L'huile d'Argan est une huile naturelle caractérisée par une composition particulière, avec une prédominance des acides gras insaturés ainsi qu'une fraction insaponifiable très riche en antioxydant tels que les polyphénols et les tocophérols.

La composition phénolique de l'huile d'Argan est caractérisée par la présence de quatre polyphénols, l'acide vanillique, l'acide syringique, l'acide férulique et le tyrosol, avec une prédominance de l'acide férulique qui représente plus que 94% de la fraction des polyphénols (Khallouki et al., 2003).

L'acide férulique possède une forte activité antioxydante contre la peroxydation des lipides (Srinivasan et al., 2007). De plus, Il est largement utilisé dans la prévention contre les maladies cardiovasculaires (Suzuki et al., 2007).

Vu la richesse de l'huile d'Argan en acide férulique ainsi que ses effets bénéfiques sur la santé humaine, Nous avons caractérisé la teneur en acide férulique des huiles d'Argan artisanale et commerciale en évaluant les spectres d'excitation et d'émission de la fluorescence de l'acide férulique dans l'huile d'Argan.

### 1. Caractérisation de l'acide ferrulique par fluorimétrie

Le spectre d'excitation (200-370nm, Figure 15) de la solution de l'acide férulique (dissout dans l'éthanol) à 50 $\mu$ M a révélé la présence de deux pics d'excitation à 275 nm et à 337 nm.

D'après les études de Lichtenthaler (Lichtenthaler et Schweiger, 1998) le pic de l'excitation de l'acide férulique est à 337nm. Donc nous avons fait un scan d'émission (350-550nm) avec une excitation à 337nm.

Les résultats présentés dans la Figure 16 ont montrés la présence d'un pic d'émission à 402nm pour une excitation à 337nm

La caractérisation par spectrofluorimètre a montré que l'excitation de l'acide férulique est à 337nm et son longueur d'onde d'émission est à 402nm.

Après avoir caractériser l'acide férulique nous avons analysé sa présence dans les huiles d'Argan commerciale et artisanale.

Scan	Excitation
Lambda Scale	20nm/cm
Scan Speed	50nm/min
Excitation	370 nm
Emission	392 nm
Calibration	90%
High voltage	504 V
Blank	0,9
factor	1,01
response	8.0 sec

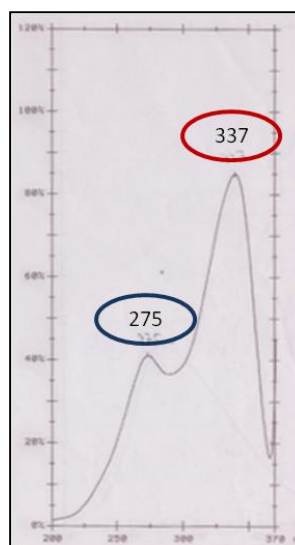


Figure 15 : Spectre d'excitation de fluorescence de l'acide férulique.

La solution de l'acide férulique est préparée dans l'éthanol à une concentration de 50 $\mu$ M. Le tableau représente les paramètres de calibration du fluorimètre. L'histogramme représente un spectre d'excitation de 200nm à 370nm avec une émission de 392nm

Scan	Emission
Lambda Scale	20nm/cm
Scan Speed	50nm/min
Excitation	337 nm
Emission	550 nm
Calibration	90%
High voltage	504 V
Blank	0,9
factor	1,01
response	8.0 sec

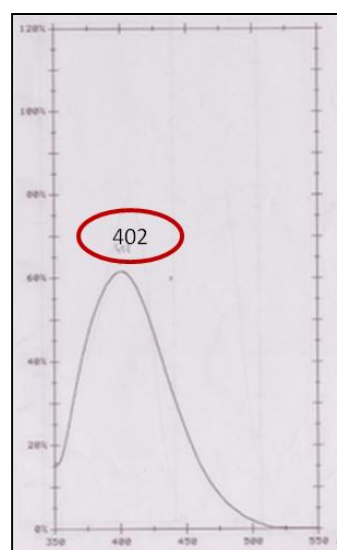


Figure 16 : Spectre d'émission de fluorescence de l'acide férulique

La solution de l'acide férulique est préparée dans l'éthanol à une concentration de 50 $\mu$ M. Le tableau représente les paramètres de calibration du fluorimètre. L'histogramme représente un spectre d'émission de 350nm à 550nm avec une excitation de 337nm

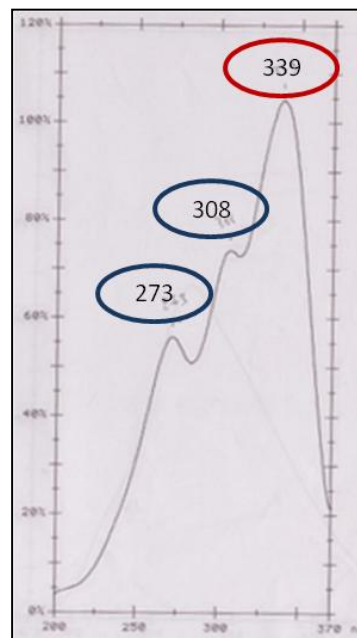
## 2. Caractérisation de l'huile d'Argan commerciale

La caractérisation de l'huile d'Argan commerciale est faite par spectrofluorimètre. L'huile d'Argan a été solubilisée dans l'éthanol avec un facteur de dilution de 33 (Figure 17).

Le spectre d'excitation a montré la présence de trois pics. le premier à 273nm le deuxième à 308nm et le troisième à 339nm. Dont le pic de 339nm représente l'acide férulique dans l'huile d'Argan. De plus, le spectre d'émission a montré la présence d'un pic à 402nm qui correspond à la fluorescence d'émission de l'acide férulique.

A

Scan	Excitation
Lambda Scale	20nm/cm
Scan Speed	50nm/min
Excitation	370 nm
Emission	400 nm
Calibration	100%
High voltage	522 V
Blank	0,9
factor	1,0
response	8.0 sec



B

Scan	Emission
Lambda Scale	20nm/cm
Scan Speed	50nm/min
Excitation	339 nm
Emission	550 nm
Calibration	100%
High voltage	522 V
Blank	0,9
factor	1,01
response	8.0 sec

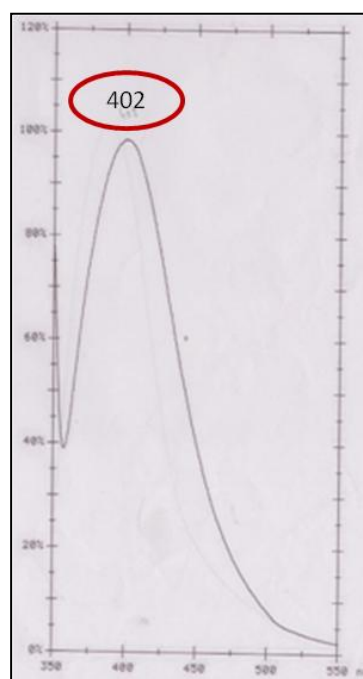


Figure 17 : Spectre de balayage d'excitation (A) et d'émission (B) de la solution de l'huile d'Argan commerciale.

L'huile d'Argan a été solubilisée dans l'éthanol avec un facteur de dilution de 33. L'histogramme A représente un spectre d'excitation de 200nm à 370nm avec une émission de 400nm. L'histogramme B représente un spectre d'émission de 350nm à 550nm avec une excitation de 339nm. Les tableaux représentent les paramètres de calibration du fluorimètre.



### 3. Caractérisation de l'huile d'Argan artisanale

L'huile d'argan utilisée pour cette étude, provient de la région d'Aklim (Nord-Est du Maroc). Elle a été préparée en juillet 2010 par un procédé d'extraction artisanal (voir partie matériels et méthodes).

L'huile d'Argan a été solubilisée dans de l'éthanol avec un facteur de dilution de 33. Le spectre d'excitation (Figure 18) a montré la présence de trois pics. le premier à 270nm le deuxième à 304nm et le troisième à 334nm. Dont le pic de 334nm représente l'acide férulique dans l'huile d'Argan. De plus, le spectre d'émission a montré la présence d'un pic à 410nm qui correspond à la fluorescence d'émission de l'acide férulique.

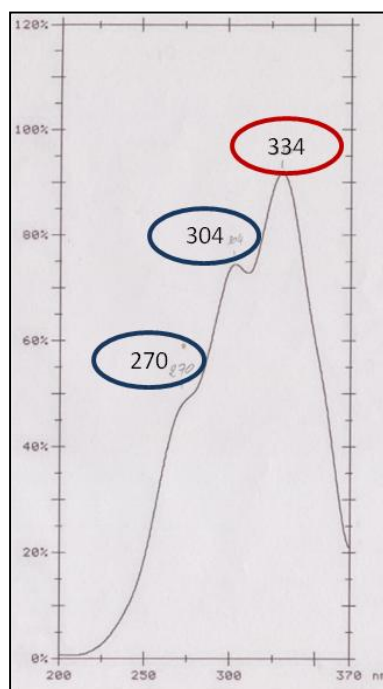
Les résultats de la caractérisation des huiles d'Argan commerciale et artisanale ont montrés la présence des pics de la fluorescence d'excitation et d'émission qui correspondent à ceux de l'acide férulique. Par conséquent, nos huiles d'Argan commerciale et artisanale contiennent l'acide férulique dans leurs compositions de la fraction phénolique.

L'huile d'argan présente une grande stabilité oxydative qui peut durée jusqu'à 2ans pour l'huile alimentaire. Cette stabilité est influencée par le procédé et la durée de stockage ainsi que la méthode d'extraction suivie (Gharby et al., 2012; Hilali et al., 2005).

Pour évaluer la stabilité oxydative de l'huile d'Argan nous avons caractérisé de nouveaux les huiles d'Argan artisanale et commerciale qui ont été conservées à -80°C pendant deux mois.

A

Scan	Excitation
Lambda Scale	20 nm/cm
Scan Speed	50 nm/min
Excitation	370 nm
Emission	402 nm
Calibration	90%
High voltage	444 V
Blank	0,9
factor	1,0
response	8.0 sec



B

Scan	Emission
Lambda Scale	20 nm/cm
Scan Speed	50 nm/min
Excitation	334 nm
Emission	500 nm
Calibration	90%
High voltage	444 V
Blank	0,9
factor	1,01
response	8.0 sec

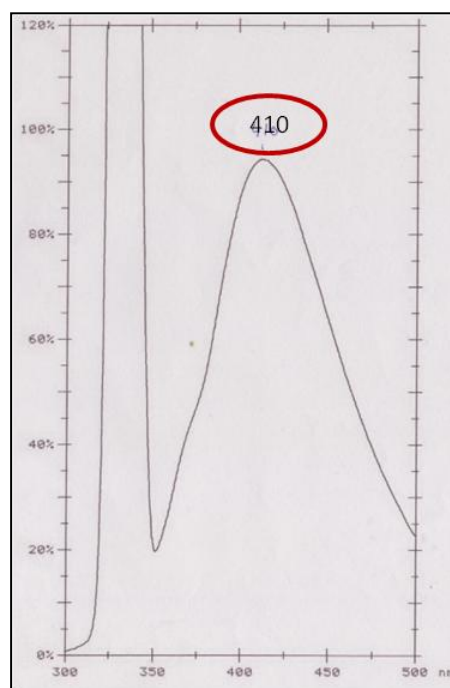


Figure 18 : Spectre de balayage d'excitation (A) et d'émission (B) de la solution de l'huile d'Argan artisanale.

L'huile d'Argan a été solubilisée dans l'éthanol avec un facteur de dilution de 33. L'histogramme A représente un scan d'excitation de 200 nm à 370 nm avec une émission de 402 nm. L'histogramme B représente un scan d'émission de 300 nm à 500 nm avec une excitation de 334 nm. Les tableaux représentent les paramètres de calibration du fluorimètre

## 4. Oxydation de l'huiles d'Argan

Les huiles d'Argan ont été solubilisées dans l'éthanol avec un facteur de dilution de 33, et analysées par fluorimètre.

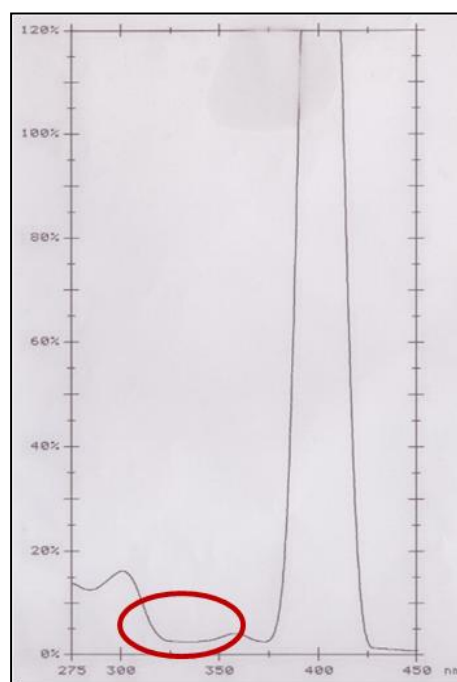
### 4.1 L'huile d'Argan commerciale

Les spectres de la fluorescence d'excitation et de la fluorescence d'émission (Figure 19) ont montrés la disparition des pics correspondent à l'acide férulique dans l'huile d'Argan commerciale.

Les résultats de la caractérisation de l'huile d'Argan commerciale ont montré la disparition de l'acide férulique de la composition de l'huile d'Argan après la conservation de deux mois à  $-80^{\circ}\text{C}$ . Ce qui pourrait être expliquée par une oxydation de l'acide férulique.

A

Scan	Excitation
Lambda Scale	20 nm/cm
Scan Speed	50 nm/min
Excitation	450 nm
Emission	402 nm
Calibration	90%
High voltage	444 V
Blank	0,9
factor	1,0
response	8.0 sec



B

Scan	Emission
Lambda Scale	20 nm/cm
Scan Speed	50 nm/min
Excitation	337 nm
Emission	500 nm
Calibration	90%
High voltage	444 V
Blank	0,9
factor	1,01
response	8.0 sec

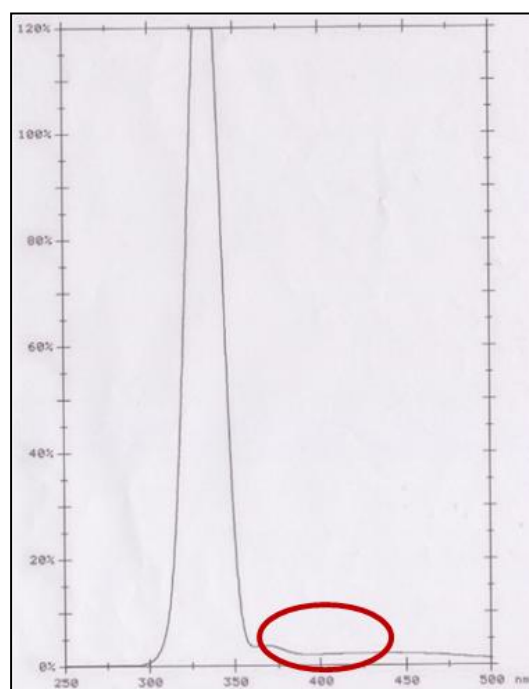


Figure 19 : Spectre de balayage d'excitation (A) et d'émission (B) de la solution de l'huile d'Argan commerciale.

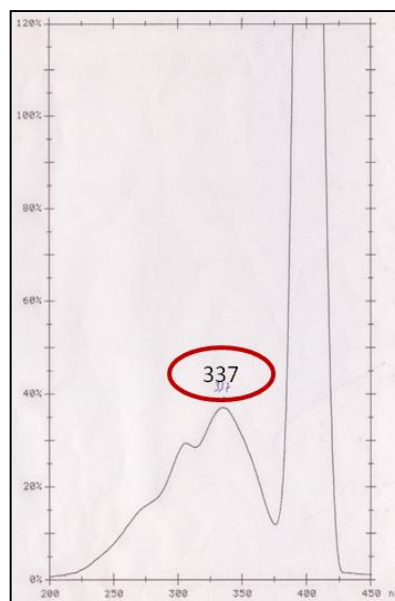
L'huile d'Argan a été solubilisée dans l'éthanol avec un facteur de dilution de 33. L'histogramme A représente un scan d'excitation de 275 nm à 450 nm avec une émission de 402 nm. L'histogramme B représente un scan d'émission de 250 nm à 500 nm avec une excitation de 337 nm. Les tableaux représentent les paramètres de calibration du fluorimètre.

## 4.2 L'huile d'Argan artisanale

Le spectre de la fluorescence d'excitation de l'huile d'Argan artisanale, a montré la présence de pic correspondant à l'acide férulique à 337 nm (Figure 20). Aussi, le spectre de la fluorescence d'émission, a montré la présence de pic correspondant à l'acide férulique à 415 nm. D'après les résultats de la fluorescence d'excitation et d'émission, l'huile d'Argan artisanale a conservé sa composition en acide férulique après deux mois de conservation à -80°C.

A

Scan	Excitation
Lambda Scale	20 nm/cm
Scan Speed	50 nm/min
Excitation	450 nm
Emission	402 nm
Calibration	90%
High voltage	444 V
Blank	0,9
factor	1,0
response	8.0 sec



B

Scan	Emission
Lambda Scale	20 nm/cm
Scan Speed	50 nm/min
Excitation	337 nm
Emission	500 nm
Calibration	90%
High voltage	444 V
Blank	0,9
factor	1,01
response	8.0 sec

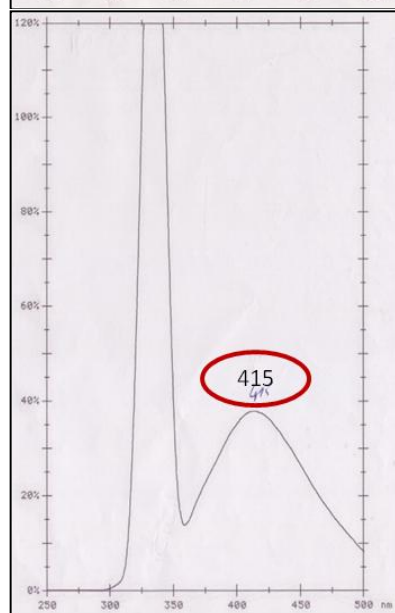


Figure 20 : Spectre de balayage d'excitation (A) et d'émission (B) de la solution de l'huile d'Argan artisanale.

L'huile d'Argan a été solubilisée dans l'éthanol avec un facteur de dilution de 33. L'histogramme A représente un scan d'excitation de 200 nm à 450 nm avec une émission de 402 nm. L'histogramme B représente un scan d'émission de 250 nm à 500 nm avec une excitation de 337 nm. Les tableaux représentent les paramètres de calibration du fluorimètre.

Les résultats de la caractérisation des huiles d'Argan artisanale et commerciale après deux mois de conservation à  $-80^{\circ}\text{C}$ , a montré que l'huile d'Argan artisanale conserve sa composition en acide férulique. Par contre, l'huile d'Argan commerciale a perdu l'acide férulique de la composition de sa fraction phénolique ce qui pourrait être dû à une oxydation de l'acide férulique.

Pour savoir à quoi dû cette disparition des pics de fluorescence d'excitation et d'émission dans l'huile d'Argan commerciale, nous avons évalué l'effet de l'oxydation sur l'acide férulique commerciale.

## 5. Oxydation de l'acide férulique

Pour évaluer l'effet de l'oxydation de l'acide férulique, nous avons fait des spectres de fluorescence d'excitation et d'émission, pour une solution de l'acide férulique dissoute dans l'éthanol à une concentration de  $50\mu\text{M}$ , ainsi qu'une solution de l'acide férulique dissoute dans l'éthanol à une concentration de  $50\mu\text{M}$  en ajoutant du peroxyde d'hydrogène ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) à  $100\mu\text{M}$  (Figure 21).

Les résultats de l'évaluation de l'effet de l'oxydation de l'acide férulique, par  $\text{H}_2\text{O}_2$ , sur la fluorescence ont montré une diminution de la taille des pics d'excitation et d'émission en mettant le peroxyde d'hydrogène.

Ces résultats pourraient confirmer l'hypothèse de l'oxydation de l'acide férulique dans l'huile d'Argan commerciale après deux mois de la première utilisation.

Scan	Excitation
Lambda Scale	20 nm/cm
Scan Speed	50 nm/min
Excitation	370 nm
Emission	402 nm
Calibration	90%
High voltage	444 V
Blank	0,9
factor	1,0
response	8.0 sec

Scan	Emission
Lambda Scale	20 nm/cm
Scan Speed	50 nm/min
Excitation	334 nm
Emission	500 nm
Calibration	90%
High voltage	444 V
Blank	0,9
factor	1,01
response	8.0 sec

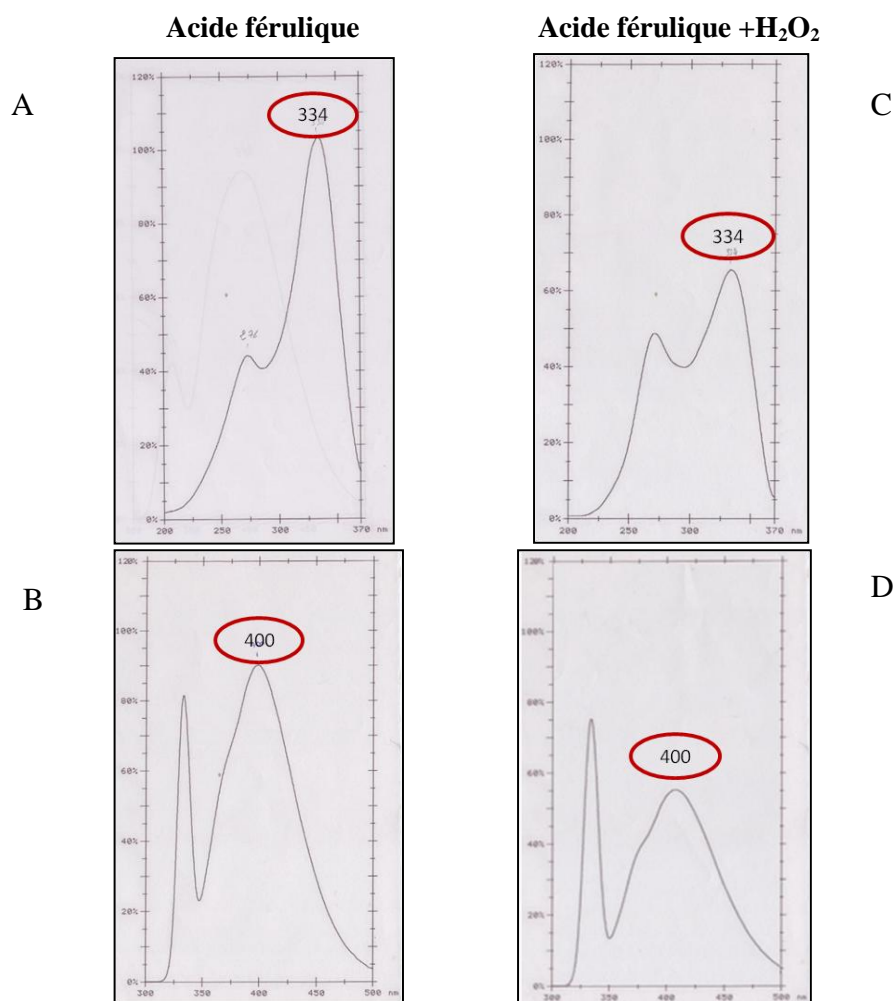


Figure 21 : Effet de l'oxydation sur l'acide férulique.

La solution de l'acide férulique est préparée dans l'éthanol à une concentration de 50µM. pour tester les effets de l'oxydation nous ajoutons une solution de peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) à 100µM. L'histogramme A représente un scan d'excitation de 200 nm à 370 nm avec une émission de 402 nm de la solution de l'acide férulique. L'histogramme B représente un scan d'émission de 200 nm à 500 nm avec une excitation de 337 nm de la solution de l'acide férulique. L'histogramme C représente un scan d'excitation de 200 nm à 370 nm avec une émission de 402 nm de la solution de l'acide férulique en ajoutant une solution de peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) à 100µM. L'histogramme D représente un scan d'émission de 200 nm à 500 nm avec une excitation de 337 nm de la solution de l'acide férulique en ajoutant une solution de peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) à 100µM. Les tableaux représentent les paramètres de calibration du fluorimètre.

## 6. Quantification de l'acide férulique dans l'huile d'Argan artisanale

L'acide férulique représente 94% de la fraction phénolique de l'huile d'Argan à raison de 3147  $\mu\text{g}/\text{kg}$  de l'huile d'Argan (Khallouki et al., 2003) ce qui représente une concentration molaire de 14,8  $\mu\text{M}$ .

Pour mesurer la concentration molaire de l'acide férulique dans notre huile d'Argan artisanale nous avons préparé une gamme étalon avec des concentrations en cascade de l'acide férulique (de 1,56  $\mu\text{M}$  à 50  $\mu\text{M}$ ) et nous avons mesuré la fluorescence relative par fluorimètre avec une excitation à 334 nm et une émission à 402 nm (Figure 22).

Ex	334 nm	[Ac Férulique] $\mu\text{M}$	RFU
Em	402 nm	1,5625	4,4
Calibration	90%	3,125	6,9
High voltage	504 V	6,25	10,4
Blank	0,9	12,5	21,8
factor	1,01	25	43
response	8.0 sec	50	85,1
		HAA (1/33 ETOH)	91,8

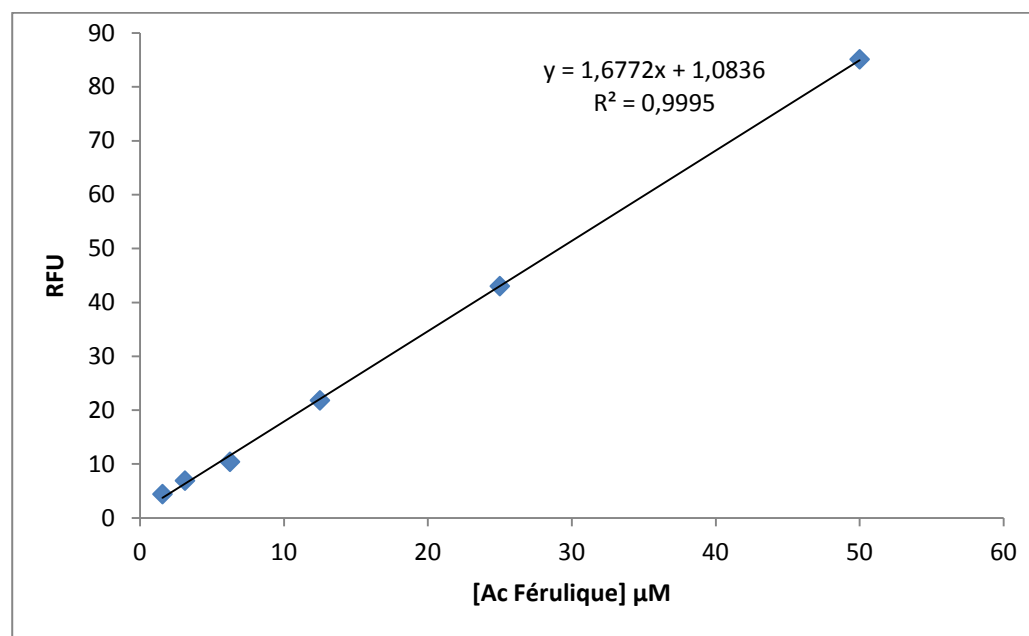


Figure 22 : Concentration de l'acide férulique dans l'huile d'argan artisanale

L'huile d'Argan a été solubilisée dans l'éthanol avec un facteur de dilution de 33. Le tableau A représente les paramètres de calibration du fluorimètre. Le tableau B représente les RFU correspondant aux différentes concentrations de la gamme étalon de la Solution de l'acide férulique et celle de l'huile d'Argan artisanale. Le graphique C représente la gamme étalon de l'acide férulique. RFU : unité relative de fluorescence



La concentration de l'acide férulique dans l'huile d'Argan artisanale qui correspond à 91,80RFU, d'après la gamme étalon, est égale à 54,09 $\mu$ M. Notre solution de l'huile d'Argan artisanale est diluée avec un facteur de dilution de 33 donc la concentration initiale de l'huile d'Argan est de 1,78mM.

Les résultats de la quantification de l'acide férulique dans l'huile d'Argan artisanale ont montré que notre huile contient une concentration 120fois plus grande que la concentration mentionnée dans la littérature. Avec une concentration de l'acide férulique de 1,78mM correspondant à 376,74mg/kg de l'huile. Cette richesse en acide férulique dans notre huile d'Argan artisanale par rapport la littérature pourrait être due à l'origine des fruits, au processus de l'extraction, au moyen de la quantification.

Les résultats de ce chapitre ont montré la présence de l'acide férulique dans la composition de la fraction phénolique de l'huile d'Argan artisanale et de l'huile d'Argan commerciale. De plus, l'acide férulique est bien conservé dans l'huile d'Argan artisanale. Par contre, il est oxydé dans l'huile d'Argan commerciale. Ainsi que, notre huile d'Argan artisanale est très riche en acide férulique avec 376,74mg/kg de l'huile contre 3147 $\mu$ g/kg de l'huile d'Argan dans la littérature (Khallouki et al., 2003).

---

## **II. Article: Modulation de l'abondance de peroxyosomes par l'huile d'Argan et les lipopolysaccharides dans les fibroblastes déficient en acyl-CoA oxydase1**

**Article accepté dans le journal "Health"**

**Riad El Kebbaj**, Soufiane El Kamouni, Hammam I. El Hajj, Pierre Andreoletti, Joseph Gresti, Norbert Latruffe, M'Hammed Saïd El Kebbaj, Joseph Vamecq, Gérard Lizard, Boubker Nasser and Mustapha Cherkaoui-Malki.

## Introduction

La Pseudo-adrénoleucodystrophie néonatale P-NALD est une maladie peroxysomale due à la déficience de l'acyl-coenzyme A oxydase 1 (ACOX1) peroxysomale ce qui conduit à une altération de la voie de la  $\beta$ -oxydation peroxysomale des acides gras affectant spécifiquement l'oxydation des d'acides gras à très longue chaîne (AGTLC). En conséquence, les AGTLC s'accumulent dans le plasma et les tissus (Poll-The et al., 1988). En effet, dans les fibroblastes P-NALD, la biogenèse des peroxysomes est altérée. Cette altération consiste en une réduction du nombre de peroxysomes par cellule et une augmentation de leur taille (Wanders and Waterham, 2006). L'augmentation rapide et importante du nombre de peroxysomes est qualifiée de prolifération des peroxysomes. Cette prolifération est contrôlée directement par le récepteur nucléaire PPAR $\alpha$  et le coactivateur PGC-1 $\alpha$  qui jouent également un rôle majeur dans la régulation de la  $\beta$ -oxydation peroxysomale (Bagattin et al., 2010; Cherkaoui-Malki et al., 2001). En outre, la prolifération des peroxysomes et la  $\beta$ -oxydation peroxysomale, sont modulées par des ligands synthétiques de structures diverses appelés proliférateurs de peroxysomes et par plusieurs acides gras saturés et polyinsaturés ainsi que par des endotoxines (lipopolysaccharides) LPS (Desvergne and Wahli, 1999; Paintlia et al., 2008).

Dans notre étude nous avons étudié la modulation de la prolifération des peroxysomes par le traitement avec l'huile d'Argan qui a une composition très riche en acides gras insaturés et par le traitement avec le LPS. En effet, pour caractériser les effets de l'huile d'Argan et du LPS sur la pseudo-adrénoleucodystrophie néonatale, nous avons traité les fibroblastes P-NALD par l'huile d'Argan ou le LPS et évalué les variations de la prolifération des peroxysomes par immunomarquage de la protéine L-PBE (enzyme qui catalyse la deuxième étape de la  $\beta$ -oxydation peroxysomale). De plus, nous avons estimé également l'expression de facteur de transcription PPAR $\alpha$  et son coactivateur PGC-1 $\alpha$  ainsi que leurs gènes cibles L-PBE et PEX11 $\alpha$  (peroxine impliqué dans la biogenèse du peroxysome). Parallèlement, nous avons évalué le niveau d'inflammation par la mesure de l'expression du gène pro-inflammatoire IL-6.

## **Modulation of peroxisomes abundance by Argan oil and lipopolysaccharides in acyl-CoA oxidase 1-deficient fibroblasts**

(Accépté par le journal “Health”)

Riad El Kebbaj<sup>1,2</sup>, Soufiane El Kamouni<sup>1,2</sup>, Hammam I. El Hajj<sup>1</sup>, Pierre Andreoletti<sup>1</sup>, Joseph Gresti<sup>3</sup>, Norbert Latruffe<sup>1</sup>, M’Hammed Saïd El Kebbaj<sup>4</sup>, Joseph Vamecq<sup>5</sup>, Gérard Lizard<sup>1</sup>, Boubker Nasser<sup>2</sup> and Mustapha Cherkaoui-Malki<sup>1#</sup>

<sup>1</sup>Université de Bourgogne, Laboratoire BioPeroXIL EA7270, Dijon F-21000, France; <sup>2</sup>Laboratoire de Biochimie et Neurosciences, Faculté des Sciences et Techniques, Université Hassan I, BP 577 26 000 Settat, Morocco;

<sup>3</sup>Université de Bourgogne, Centre de recherche INSERM, UMR866, 6 Boulevard Gabriel, 21000 Dijon, France;

<sup>4</sup>Laboratoire de recherche sur les lipoprotéines et l’Athérosclérose, Faculté des Sciences Ben M’sik, Avenue Cdt Driss El Harti BP. 7955, Université Hassan II-Mohammedia-Casablanca, Morocco.

<sup>5</sup>INSERM and HMNO, CBP, CHRU Lille, 59037 Lille, France.

Keywords: Acyl-CoA oxidase 1, Argan oil, LPS, PGC-1 $\alpha$ , peroxisome proliferation, P-NALD, PPAR- $\alpha$ .

<sup>#</sup>Corresponding author: Mustapha Cherkaoui-Malki, Centre de Recherche BioPerxIL, Université de Bourgogne, 6, Bd Gabriel, 21000 Dijon, France Tel.: 33380396205; malki@u-bourgogne.fr

**Abstract**

Pseudo-neonatal adrenoleukodystrophy (P-NALD) is a neurodegenerative disorder caused by acyl-CoA oxidase 1 (ACOX1) deficiency with subsequent impairment of peroxisomal fatty acid  $\beta$ -oxidation, accumulation of very long chain fatty acids (VLCFAs) and strong reduction in peroxisome abundance. Increase in peroxisome number has been previously suggested to improve peroxisomal disorders, and in this perspective, the present work was aimed at exploring whether modulation of peroxisomes abundance could be achieved in P-NALD fibroblasts. Here we showed that treatment with the natural Argan oil induced peroxisome proliferation in P-NALD fibroblasts. This induction was independent on activations of both nuclear receptor PPAR $\alpha$  and its coactivator PGC-1 $\alpha$ . Lipopolysaccharides (LPS) treatment, which caused inflammation, induced also a peroxisome proliferation that, in contrast, was dependent on activations of PPAR $\alpha$  and PGC-1 $\alpha$ . By its ability to induce peroxisome proliferation, Argan oil is suggested to be of potential therapeutic use in patients with P-NALD.

## 1. Introduction

Alteration of peroxisome biogenesis in the neurodegenerative pseudo-neonatal adrenoleukodystrophy (P-NALD; OMIM 264470) is correlated to the underlying mutation in acyl-CoA oxidase 1 (ACOX1) gene, which encodes the first and rate-limiting enzyme in peroxisomal  $\beta$ -oxidation pathway [1, 2]. In this single-enzyme deficiency, the metabolic defect impairs peroxisomal acyl-CoAs  $\beta$ -oxidation and, because causing accumulation of very long chain fatty acids (VLCFAs), evokes biochemically the Zellweger syndrome [1-3]. However, in contrast to P-NALD, Zellweger syndrome underlying defect addresses one of the many peroxin genes required for proper peroxisome biogenesis and maintenance [2]. Peroxin-encoding gene defect leads to deficient import of peroxisomal matrix proteins, which precedes the defect in peroxisomal fatty acid  $\beta$ -oxidation and accumulation of VLCFAs [2]. In P-NALD disorder, peroxisome biogenesis appears to be secondarily altered, as reported in fibroblasts and hepatocytes from patients, and this alteration consists of a reduced number of peroxisomes per cell and an increase in peroxisome size [1, 2].

Singularly, peroxisome abundance is the result of a cellular balance between peroxisome biogenesis and peroxisome proliferation. Accordingly, substantial data have been collected on the plasticity of peroxisomes in adapting their morphology, enzyme content, and abundance to environmental stresses [2, 4, 5]. Peroxisomes biogenesis involves sequentially budding of peroxisomal membranes from endoplasmic reticulum components, import of peroxisomal matrix enzymes and fission of the organelles [6, 7]. As for mitochondria, the biogenesis of peroxisomes relies heavily on transcriptional coactivator Peroxisome Proliferator-Activated Receptor-Coactivator-1 $\alpha$  (PGC-1 $\alpha$ ) which controls the expression of several key genes involved in peroxisomal biogenesis (i.e. peroxines) and metabolism [8]. In contrast to peroxisome proliferation, which is under the strict control of nuclear receptor PPAR $\alpha$  [9, 10], forced expression of PGC-1 $\alpha$  by adenofection into human and rodent cells is sufficient to drive peroxisomal remodeling and biogenesis in a PPAR $\alpha$ -independent manner [8].

Alongside, peroxisome proliferation and induction of peroxisomal fatty acid  $\beta$ -oxidation may be induced by structurally diverse synthetic ligands referred to as peroxisome proliferators and by several saturated fatty acids and their polyunsaturated forms [9-13]. Ligand-dependent activation of nuclear receptor PPAR $\alpha$  leads to its heterodimerization with

RXR $\alpha$ . This PPAR $\alpha$ /RXR $\alpha$  complex binds to PPAR $\alpha$ -response elements (PPRE) of target genes which encompass diverse genes coding for mitochondrial and peroxisomal enzymes involved in fatty acid  $\beta$ -oxidation pathways [4, 5, 10]. Mice lacking *Acox1* exhibit a severe liver steatosis with a chronic hepatic endoplasmic reticulum stress and, importantly, these mice present with a sustained activation of PPAR $\alpha$  [14, 15]. Interestingly also, only regenerated hepatocytes lacking steatosis show a massive peroxisome proliferation, which is dependent on the activation of PPAR $\alpha$  [14, 15]. The particular phenotype of this *Acox1 null* mouse model, i.e. sustained PPAR $\alpha$ -driven peroxisome proliferation, can be reversed by restoring the expression of the human ACOX1b isoform [16]. Thus, peroxisome abundance and PPAR $\alpha$  activation seem to be correlated to the level of ACOX1 activity.

In a previous work, we have shown that P-NALD patient-derived deficient fibroblasts exhibited a strongly reduced number and enlarged size of peroxisomes [3]. Although no apparent genotype-phenotype correlation has been established in P-NALD [17], residual VLCFA  $\beta$ -oxidation, due to a branched chain-ACOX2 non-specific activity, reached an average of 25% in P-NALD fibroblasts [3, 17]. Earlier study had suggested that increase in peroxisome number might have a favorable effect on peroxisomal biogenesis disorders [18]. Regarding the key role of peroxisome biogenesis in the development of peroxisomal disorders, this study was designed to determine whether modulation of peroxisomes abundance could be achieved in P-NALD fibroblasts. For this purpose, we tested the natural Argan oil, attending the role of unsaturated fatty acids in the activation of PPAR $\alpha$ . Indeed, Argan oil is a rich source in unsaturated fatty acids, when compared to olive oil, with a higher unsaturation index 120.4 *versus* 108.3 for olive oil (supplementary Table 1 and SFig.1). On the other hand, we challenged P-NALD fibroblasts with lipopolysaccharides (LPS), which have been reported to be modulators of peroxisome proliferation [19]. In the present work, the abilities of these approaches (argan oil and LPS) to modulate or not the peroxisomal population of P-NALD fibroblasts have been studied.

## 2. Material and Methods:

### 2.1 Cell culture and argan oil treatment:

Skin fibroblasts were cultured as described elsewhere [17] and handled according to national and institutional guidelines. Skin fibroblasts were maintained in EMEM medium (Lonza) containing fetal bovine serum (10%), sodium pyruvate (1mM) with penicillin and

streptomycin (1%) at 37°C with 5% CO<sub>2</sub>. The virgin Argan oil used in this work was obtained from the Essaouira area in the southwest of Morocco. For fibroblasts treatment, Argan oil was solubilized in ethanol and Lipopolysaccharides (LPS Sigmaaldrich; 1 mg/mL) were dissolved in phosphate buffer saline. Final concentration of ethanol (vehicle) in the culture medium was 0.2%. For fibroblasts treatment, the final concentration of Argan oil and LPS were as indicated in figure legends.

## 2.2 Immunostaining and morphometry:

Fluorescence microscopy was achieved as previously described [20]. To perform immunofluorescence staining, cells were seeded at  $2 \times 10^5$  cells/cm<sup>2</sup> on 12 mm glass coverslips, which have been introduced into the wells of micro-plates containing 1 ml of medium culture. After 48h of culture, cells were fixed with 2% paraformaldehyde for 5 min at room temperature, washed three times with PBS, pre-incubated with FACS permeabilizing solution (BD-Biosciences) for 5 min at room temperature, and incubated with blocking buffer (PBS, 0.05% saponin (Sigma-Aldrich), 10% goat serum (PAN<sup>TM</sup> Biotech GmbH)) for 20 min at room temperature. Following washing in PBS, cells were incubated at room temperature for one hour with 1/100 dilution of L-PBE primary antibodies (rabbit polyclonal antibodies directed against rat L-PBE) in PBS containing 10 % goat serum, washed twice in PBS, and then incubated for 30 min with a 488-Alexa goat anti-rabbit at 1/300. After extensive washings with PBS, slides were mounted, and digital images acquisitions were collected with an SP2 AOBS confocal laser microscope (Leica, Wetzlar, Germany) equipped for epifluorescence microscopy. The number of peroxisomes were evaluated from confocal microscopy image stacks with Velocity 3D Image Analysis® (PerkinElmer) and ImageJ (National Institute of Mental Health, Bethesda, Maryland, USA) softwares.

## 2.3 Quantitative PCR analysis:

Cells were harvested with 0.25% trypsin/EDTA and washed twice with PBS. Total RNA from fibroblasts was extracted using the RNeasy Mini kit (Qiagen) following the manufacturer's instructions. cDNA was generated by reverse transcription using Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase (Promega) according to the manufacturer's protocol and analyzed by quantitative PCR using the GoTaq® qPCR Master Mix (Promega), and a StepOnePlus Real-Time PCR System (Applied Biosystem). The Beacon Designer Software (Bio-Rad) was used to determine primer sequences specific of *PPARα*: (forward 5'AGAGTGGGCTTCCGTGTC3' and reverse 5'GGACTCAACAGTTTGTGGCA-3'), *PGC-1α* (forward



5'AATCCGTCTTCATCCACAGG3' and reverse 5'GGTGCAGTGACCAATCAGAA3'), *L-PBE* (forward 5'AAGAAGGACTACAGAAAGCTGTA3' and reverse 5'CCCAGTGTAAGGCCAAATGT3'), *PEX11 $\alpha$*  (forward 5'GGTAATGAAGCTCAAGAAA CTGGAG3' and reverse 5'TGCTCTGCTCAGTTGCCTGT3'), and *ribosomal 36B4* (forward 5'ATCTGCTTGGAGCCCACAT3' and reverse 5'GCGACCTGGAAGTCCAATA3'). Subsequent PCR reactions were carried out in duplicate in a final volume of 12.5  $\mu$ L containing 6.25  $\mu$ L of MESA Green qPCR Mastermix (Eurogentec), 2.5  $\mu$ L of cDNA and forward and reverse primers at 300 nM. The PCR enzyme (*Taq* DNA polymerase) was heat-activated at 95°C for 10 min, and the DNA was amplified for 40 cycles at 95°C for 15 s, 60°C for 30 s, and 72°C for 30 s, followed by a melting curve analysis to control the absence of nonspecific products. For each transcript, the amplification efficiency was determined by the slope of the standard curve generated from two fold serial dilutions of cDNA. Gene expression was quantified using cycle to threshold (Ct) values and normalized by the  $\beta$ -Actin reference gene. To this end, the quantitative expression of *PPAR $\alpha$*  and *PGC-1 $\alpha$*  was determined according to  $2^{-\Delta C_t}$  with  $\Delta C_t = (\text{Ct of the gene studied}) - (\text{Ct of the } \beta\text{-Actin gene})$ .

## 2.4 Statistical analysis

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

## 3. Results

### 3.1 Argan oil and LPS increase peroxisome population in P-NALD- fibroblasts

Peroxisome abundance was assessed in P-NALD fibroblasts by immunofluorescence staining. Typical punctuated fluorescence pattern of peroxisomes was shown in control fibroblasts using the antibody against L-peroxisomal bifunctional enzyme (L-PBE) (Fig.1 a and b). When compared to control fibroblasts, P-NALD cells exhibited a few number of large peroxisomes per cell (Fig. 1b and c) and the peroxisome density (peroxisome/ $\mu\text{m}^2$ ) was decreased by 60% (Table1). To modulate peroxisome abundance in P-NALD fibroblasts, we used the natural Argan oil, rich in unsaturated fatty acids, as an activator of *PPAR $\alpha$* . 48 hours Argan oil exposure showed an increase in peroxisome population in these P-NALD fibroblasts (Fig. 1d and e) and peroxisome density was increased by 26% compared to untreated P-NALD fibroblasts (Table1). On the other hand, LPS has been shown to modulate peroxisome  $\beta$ -oxidation in fibroblasts. So we treated P-NALD fibroblasts with LPS for 48

hours. Figure 1 (f and g) shows that LPS treatment provoked also an increase in peroxisomes population of about 40% in term of density (Table1). Intriguingly, co-treatment with both Argan oil and LPS has no additional effect on the increased peroxisome population obtained by each treatment alone (Fig. 1i, 1j and Table1). These results indicate that different exogenous compounds, such as Argan oil or LPS, may modulate peroxisome abundance in a non-additive way.

### 3.2 Roles of PPAR $\alpha$ and PGC-1 $\alpha$ in the increase of peroxisome population in P-NALD fibroblasts by Argan oil and LPS:

Due to the strong implication of PPAR $\alpha$  and PGC-1 $\alpha$  in peroxisome proliferation and in peroxisome biogenesis respectively [4, 5, 8], we evaluated first the levels of their transcripts in control and P-NALD fibroblasts by real-time PCR. Fig. 1a and b showed that the expression levels of PPAR $\alpha$  mRNA were significantly reduced in P-NALD fibroblasts by 20% compared to the control. The PGC-1 $\alpha$  mRNAs level was strongly induced by 4 fold in these P-NALD/ACOX1-deficient cells. As we showed before [3], higher gene expression of IL-6 cytokine (10 folds) underlined the strong inflammatory status in the ACOX1-deficient P-NALD fibroblasts (Fig.1e).

Treatment with argan oil revealed only a slight decrease of PPAR $\alpha$  mRNA level in control fibroblasts, while this treatment has no effect on the levels of PPAR $\alpha$  and PGC-1 $\alpha$  gene expressions in P-NALD fibroblasts (Fig. 1 a and b). To assess PPAR $\alpha$  and PGC-1 $\alpha$  coactivation, we tested the expression of their respective specific target genes L-PBE and PEX11 $\alpha$  [4, 5, 8]. L-PBE encodes the peroxisomal bifunctional enzyme, a known marker of PPAR $\alpha$ -dependent peroxisome proliferation, and PEX11 $\alpha$  encodes a peroxin involved in PGC-1 $\alpha$ -dependent peroxisome biogenesis. Downregulation of L-PBE and PEX11 $\alpha$  mRNAs, in P-NALD versus control fibroblasts, accounted for the reduced peroxisome biogenesis in P-NALD fibroblasts (Fig.2c and 2d). However, treatment with Argan oil has no effect on the expression or activation of PPAR $\alpha$  and PGC-1 $\alpha$  mRNAs in P-NALD fibroblasts. Surprisingly, in Figure 1e and 1f, we showed that Argan oil treatment increased peroxisome population in P-NALD cells (Fig.1b and 1d). Thus peroxisome abundance can be increased in P-NALD fibroblasts independently of PPAR $\alpha$  and PGC-1 $\alpha$  activations.

As we showed recently, P-NALD fibroblasts present a high inflammatory status [3] and this was confirmed here in figure 1 (C, insert), showing that P-NALD/ACOX1 deficient fibroblasts exhibit a 10-fold induction of interleukine-6 (IL-6) mRNAs level due to the

activation of IL-1 pathway [3]. Whether PPAR $\alpha$  and PGC-1 $\alpha$  mRNA expressions were regulated in this inflammatory context was unknown. So we treated both control and P-NALD fibroblasts with LPS in the absence or in the presence of argan oil. Figure 2 shows that LPS had no effect on PPAR $\alpha$  and PGC-1 $\alpha$  mRNA levels in control fibroblasts, while LPS alone induced significantly PPAR $\alpha$  (1.5-fold) and PGC-1 $\alpha$  (1.5-fold) mRNAs levels in P-NALD fibroblasts when compared to untreated cells. The incidence of the LPS-induced PPAR $\alpha$  and PGC-1 $\alpha$  mRNAs was shown by the induction of their target genes, L-PBE (1.5-fold) and PEX11 $\alpha$  (2.2-fold). Surprisingly, co-treatment of P-NALD fibroblasts with LPS and Argan oil had a higher effect on the expression of both PPAR $\alpha$  and PGC-1 $\alpha$  mRNA, showing, in comparison to untreated cells, an increase in the mRNA levels by 1.75-fold for PPAR $\alpha$  and 3.75-fold for PGC-1 $\alpha$  respectively (Figure 2 a and b). These increases impacted also the expressions of L-PBE (1.3 folds) and PEX11 $\alpha$  (2 folds) in LPS-treated P-NALD fibroblasts (Figure 2 c and d). LPS treatment exacerbated the expression of IL-6 mRNAs (30-fold), revealing aggravated inflammatory status in P-NALD fibroblasts (Figure 2 e). However, in control fibroblasts, even in the inflammatory conditions, raised by LPS treatment as shown by a 20-fold increase of IL-6 mRNA (figure 2e), co-treatment with LPS and argan oil had no effect on PPAR $\alpha$  and PGC-1 $\alpha$  mRNA levels. Thus, changes in the expression of PPAR $\alpha$  and PGC-1 $\alpha$  mRNAs seem to be not correlated to the level of inflammation in the control fibroblasts. By contrast, in the P-NALD fibroblasts, aggravation of the inflammatory context is concomitant to a net induction of PPAR $\alpha$  and PGC-1 $\alpha$  mRNAs.

#### 4. Discussion

P-NALD disorder is characterized by a defect in peroxisomal fatty acid  $\beta$ -oxidation, due to ACOX1 deficiency, and subsequent accumulation of VLCFAs with a strong reduction in peroxisome abundance [1, 2]. This biochemical status is shared in common with other peroxisomal biogenesis disorders, in which, however, defect in peroxisome biogenesis is linked to mutation in a peroxin involved in the import machinery [2]. Thus, increase in peroxisome number has been stipulated to have favorable effect on peroxisomal biogenesis disorders [18]. Using immunofluorescence microscopy, we showed here an increase in peroxisome population in P-NALD fibroblasts by Argan oil, which is rich in polyunsaturated fatty acids particularly oleic (45%) and linoleic (34%) acids. The latter, is a precursor of arachidonic acid. Accordingly, it has been shown that polyunsaturated fatty acids, in particular arachidonic acid, induce the formation of tubular peroxisomes in HepG2 cells [21].

Thus, the availability of linoleic acid in Argan oil-treated P-NALD fibroblasts probably increased the number of peroxisomes with a rounded shape and a normal size comparable to control fibroblasts. This is in the opposite of what we observed in untreated P-NALD fibroblasts, which have reduced number of peroxisomes with enlarged size. The shape of these proliferating peroxisomes, under Argan oil treatment, resembles more to the one obtained under 4-phenyl butyrate treatment in fibroblasts with peroxisomal biogenesis disorders [18, 22].

In our hand, the moderate peroxisome proliferation induced by Argan oil seems to be PPAR $\alpha$ -independent. This is underlined by the absence of induction of L-PBE gene expression, a PPAR $\alpha$ -target gene. The existence of PPAR $\alpha$ -independent peroxisome proliferation has been described in PPAR $\alpha$  null mice treated with fenofibrate or 4-phenyl butyrate, the well-known PPAR $\alpha$  ligands [23, 24]. Furthermore, the PPAR $\alpha$ -independent induction of peroxisomal protein encoding gene in mice seems to be tissue-specific as this independency phenomenon is only partial in hepatocytes and total in fibroblasts [23]. Thus, the implication of other compounds present in Argan oil, such as sterols and/or polyphenols, cannot be excluded. Hence, phytol-enriched diet has been shown to induce several peroxisomal proteins in PPAR $\alpha$  null mice [25]. In addition, the coactivator PGC-1 $\alpha$ , as the mRNA expression of its target gene PEX11 $\alpha$  is not augmented, does not promote this peroxisome proliferation. Nevertheless, induction of peroxisome biogenesis relies on the induction of several peroxin genes in a PGC-1 $\alpha$ -dependent manner and this can be achieved independently of PPAR $\alpha$  via a yet uncharacterized transcription factor [8]. Accordingly, evidence of the participation of other PPAR isotypes in peroxisome proliferation induction has been reported elsewhere [26]. However, absence of the induction of PPAR $\alpha$ -target gene, L-PBE, which is highly correlatable with peroxisome proliferation [27], attests for the existence of other pathway activated by Argan oil.

Earlier studies on the effect of LPS on peroxisome functions have shown that these endotoxins induced peroxisomal proteins, affected peroxisomal membrane composition and reduced the yield of peroxisome fraction in rat liver [28, 29]. In rat C6 glial cells, LPS strongly diminished the activity of ACOX1 and the oxidation of VLCFAs [30]. Nonetheless, to our knowledge, the effect of LPS in ACOX1 deficiency context has not been studied yet. Here we showed that LPS induced peroxisomes population in P-NALD fibroblasts. This induction is associated with the activation of both PPAR $\alpha$  and PGC-1 $\alpha$  only in P-NALD

fibroblasts, as shown by the increase of their target genes (i.e. L-PBE and PEX11 $\alpha$ ). Thus, the action of LPS seems to be correlated to the ACOX1 activity level and/or, at least partially, to the aggravated inflammatory context in P-NALD-treated cells. However, the induced expression of PPAR $\alpha$  and PGC-1 $\alpha$  by the co-treatment with both LPS and Argan oil is not associated to an additional activation of their target genes or induction of peroxisome proliferation. By contrast, LPS were associated, in cytokines-dependent manner, to the induction of oxidative stress, inhibition of PPAR $\alpha$  activity, and peroxisomal dysfunction in developing rat oligodendrocytes [31]. Apparent dissimilarity with our results may be linked to the peroxisomal dysfunction, as in P-NALD fibroblasts the chronic cytokine induction is mainly correlated to ACOX1 deficiency without any LPS treatment [3]. Thus, the metabolic context may account for the differential cell response. Accordingly, recent data reported that LPS molecules triggered the cellular energy metabolic reprogramming through depression of PGC-1 $\alpha$  activity [32]. In addition, numerous studies have reported such differential cell adaptation in term of peroxisome morphology, abundance and enzymes content; and in term of PPAR $\alpha$  activation as well [3, 4, 8, 9, 16, 23, 28, 31].

In conclusion, the present study showed that Argan oil is able to stimulate peroxisome proliferation in P-NALD fibroblasts in the absence of PPAR $\alpha$  and PGC-1 $\alpha$  activation, while LPS, which aggravate the inflammatory status in P-NALD cells, induced peroxisome proliferation and activation of PPAR $\alpha$  and PGC-1 $\alpha$ .

#### **Acknowledgement:**

Financial support for this study was received from grants from the Action Intégrée of the Comité Mixte Inter-universitaire Franco-Marocain (CMIFM, AIMA/10/238, EGIDE) from the PHC *volubilis* program, Ministère des Affaires Etrangères, the Conseil Régional de Bourgogne, the Ministère de l'enseignement et de la Recherche.

**References:**

1. Poll-The, B. T. et al. (1988) A new peroxisomal disorder with enlarged peroxisomes and a specific deficiency of acyl-CoA oxidase (pseudo-neonatal adrenoleukodystrophy). *American journal of human genetics*, **42**, 422-434.
2. Wanders, R. J. and Waterham, H. R. (2006) Peroxisomal disorders: the single peroxisomal enzyme deficiencies. *Biochimica et biophysica acta*, **1763**, 1707-1720. [10.1016/j.bbamcr.2006.08.010](https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2006.08.010)
3. El Hajj, H. I. et al. (2012) The inflammatory response in acyl-CoA oxidase 1 deficiency (pseudoneonatal adrenoleukodystrophy). *Endocrinology*, **153**, 2568-2575. [10.1210/en.2012-1137](https://doi.org/10.1210/en.2012-1137)
4. Cherkaoui-Malki, M. et al. (2012) Hepatic steatosis and peroxisomal fatty acid beta-oxidation. *Curr Drug Metab*.
5. Reddy, J. K. (2004) Peroxisome proliferators and peroxisome proliferator-activated receptor alpha: biotic and xenobiotic sensing. *American Journal of Pathology*, **164**, 2305-2321.
6. Delille, H. K., Alves, R. and Schrader, M. (2009) Biogenesis of peroxisomes and mitochondria: linked by division. *Histochem Cell Biol*, **131**, 441-446. [10.1007/s00418-009-0561-9](https://doi.org/10.1007/s00418-009-0561-9)
7. Girzalsky, W., Saffian, D. and Erdmann, R. (2010) Peroxisomal protein translocation. *Biochim Biophys Acta*, **1803**, 724-731. [10.1016/j.bbamcr.2010.01.002](https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2010.01.002)
8. Bagattin, A., Hugendubler, L. and Mueller, E. (2010) Transcriptional coactivator PGC-1alpha promotes peroxisomal remodeling and biogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **107**, 20376-20381. [10.1073/pnas.1009176107](https://doi.org/10.1073/pnas.1009176107)
9. Cherkaoui-Malki, M. et al. (2001) Identification of novel peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PPARalpha) target genes in mouse liver using cDNA microarray analysis. *Gene Expr*, **9**, 291-304.
10. Vluggens, A. and Reddy, J. K. (2012) Nuclear Receptors and Transcription Factors in the Development of Fatty Liver Disease. *Curr Drug Metab*.
11. Forman, B. M., Chen, J. and Evans, R. M. (1997) Hypolipidemic drugs, polyunsaturated fatty acids, and eicosanoids are ligands for peroxisome proliferator-activated receptors alpha and delta. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **94**, 4312-4317.
12. Gottlicher, M. et al. (1992) Fatty acids activate a chimera of the clofibrilic acid-activated receptor and the glucocorticoid receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **89**, 4653-4657.
13. Issemann, I. and Green, S. (1990) Activation of a member of the steroid hormone receptor superfamily by peroxisome proliferators. *Nature*, **347**, 645-650. [10.1038/347645a0](https://doi.org/10.1038/347645a0)
14. Fan, C. Y. et al. (1998) Steatohepatitis, spontaneous peroxisome proliferation and liver tumors in mice lacking peroxisomal fatty acyl-CoA oxidase. Implications for peroxisome proliferator-activated receptor alpha natural ligand metabolism. *J Biol Chem*, **273**, 15639-15645.
15. Huang, J. et al. (2011) Progressive endoplasmic reticulum stress contributes to hepatocarcinogenesis in fatty acyl-CoA oxidase 1-deficient mice. *The American journal of pathology*, **179**, 703-713. [10.1016/j.ajpath.2011.04.030](https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2011.04.030)
16. Vluggens, A. et al. (2010) Reversal of mouse Acyl-CoA oxidase 1 (ACOX1) null phenotype by human ACOX1b isoform [corrected]. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology*, **90**, 696-708. [10.1038/labinvest.2010.46](https://doi.org/10.1038/labinvest.2010.46)
17. Ferdinandusse, S. et al. (2007) Clinical, biochemical, and mutational spectrum of peroxisomal acyl-coenzyme A oxidase deficiency. *Human mutation*, **28**, 904-912. [10.1002/humu.20535](https://doi.org/10.1002/humu.20535)
18. Wei, H. et al. (2000) Pharmacological induction of peroxisomes in peroxisome biogenesis disorders. *Annals of neurology*, **47**, 286-296.
19. Paintlia, M. K. et al. (2008) Lipopolysaccharide-induced peroxisomal dysfunction exacerbates cerebral white matter injury: attenuation by N-acetyl cysteine. *Exp Neurol*, **210**, 560-576. [10.1016/j.expneurol.2007.12.011](https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2007.12.011)
20. Baarine, M. et al. (2009) Peroxisomal and mitochondrial status of two murine oligodendrocytic cell lines (158N, 158JP): potential models for the study of peroxisomal disorders

associated with dysmyelination processes. *Journal of neurochemistry*, **111**, 119-131. [10.1111/j.1471-4159.2009.06311.x](https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2009.06311.x)

21. Schrader, M., Krieglstein, K. and Fahimi, H. D. (1998) Tubular peroxisomes in HepG2 cells: selective induction by growth factors and arachidonic acid. *Eur J Cell Biol*, **75**, 87-96.

22. Savary, S. et al. (2012) Fatty acids-induced lipotoxicity and inflammation. *Curr Drug Metab.*

23. Gondcaille, C. et al. (2005) Phenylbutyrate up-regulates the adrenoleukodystrophy-related gene as a nonclassical peroxisome proliferator. *Journal of Cell Biology*, **169**, 93-104. [10.1083/jcb.200501036](https://doi.org/10.1083/jcb.200501036)

24. Zhang, X. et al. (2006) Peroxisome proliferator-activated receptor alpha-independent peroxisome proliferation. *Biochemical and biophysical research communications*, **346**, 1307-1311. [10.1016/j.bbrc.2006.06.042](https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2006.06.042)

25. Gloerich, J. et al. (2005) A phytol-enriched diet induces changes in fatty acid metabolism in mice both via PPARalpha-dependent and -independent pathways. *Journal of lipid research*, **46**, 716-726. [10.1194/jlr.M400337-JLR200](https://doi.org/10.1194/jlr.M400337-JLR200)

26. DeLuca, J. G. et al. (2000) Evidence for peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)alpha-independent peroxisome proliferation: effects of PPARgamma/delta-specific agonists in PPARalpha-null mice. *Mol Pharmacol*, **58**, 470-476.

27. Jia, Y. et al. (2003) Overexpression of peroxisome proliferator-activated receptor-alpha (PPARalpha)-regulated genes in liver in the absence of peroxisome proliferation in mice deficient in both L- and D-forms of enoyl-CoA hydratase/dehydrogenase enzymes of peroxisomal beta-oxidation system. *Journal of Biological Chemistry*, **278**, 47232-47239. [10.1074/jbc.M306363200](https://doi.org/10.1074/jbc.M306363200)

28. Contreras, M. A. et al. (2000) Endotoxin induces structure-function alterations of rat liver peroxisomes: Kupffer cells released factors as possible modulators. *Hepatology*, **31**, 446-455. [10.1002/hep.510310226](https://doi.org/10.1002/hep.510310226)

29. Dhaunsi, G. S., Hanevold, C. D. and Singh, I. (1994) Impairment of peroxisomal beta-oxidation system by endotoxin treatment. *Mol Cell Biochem*, **135**, 187-193.

30. Khan, M. et al. (1998) Cytokine-induced accumulation of very long-chain fatty acids in rat C6 glial cells: implication for X-adrenoleukodystrophy. *Journal of neurochemistry*, **71**, 78-87.

31. Paintlia, M. K. et al. (2008) Modulation of peroxisome proliferator-activated receptor-alpha activity by N-acetyl cysteine attenuates inhibition of oligodendrocyte development in lipopolysaccharide stimulated mixed glial cultures. *J Neurochem*, **105**, 956-970. [10.1111/j.1471-4159.2007.05199.x](https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2007.05199.x)

32. Schilling, J. et al. (2011) Toll-like receptor-mediated inflammatory signaling reprograms cardiac energy metabolism by repressing peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator-1 signaling. *Circ Heart Fail*, **4**, 474-482. [10.1161/CIRCHEARTFAILURE.110.959833](https://doi.org/10.1161/CIRCHEARTFAILURE.110.959833)

Table1: Effect of Argan oil and LPS on peroxisome density in P-NALD fibroblasts.

	Peroxisome density/ $\mu\text{m}^2$ *	% of the control	% of Untreated P-NALD
Control	0,0864 $\pm$ 0,0124	100%	-
P-NALD	0,0337 $\pm$ 0,0059	39%	100%
P-NALD + AO	0,0425 $\pm$ 0,0156	49%	126%
P-NALD + LPS	0,0472 $\pm$ 0,0025	55%	140%
P-NALD + LPS + AO	0,0491 $\pm$ 0,0109	57%	146%

\* Values are mean  $\pm$  SD



**Figure legends:**

**Figure 1: Argan oil and LPS treatments induce peroxisome proliferation in P-NALD fibroblasts.** Typical punctuated fluorescent pattern of peroxisomes in control fibroblasts are illustrated in a and b panels. In comparison, P-NALD fibroblasts show a reduced number of peroxisomes which present with an enlarged size (c and d panels). P-NALD fibroblasts were treated with argan oil at 56 ng/mL (e, f), LPS at 0.2  $\mu\text{g/mL}$  (g, h) or concomitantly by argan oil at 56 ng/mL and LPS at 0.2  $\mu\text{g/mL}$  (i, j) during 48h. Fibroblasts were seeded at  $2 \times 10^5$  cells/cm<sup>2</sup> on 12-mm glass coverslips and immunofluorescence staining was performed as described by *Baarine et al.* [20]. L-PBE Immunostaining was performed in order to visualize peroxisomes using anti-L-PBE antibodies (1/100). Microscope images magnifications were x100 and bar =10  $\mu\text{m}$ .

**Fig 2: Differential effect of argan oil on the expressions of PPAR $\alpha$  and PGC-1 $\alpha$  in P-NALD fibroblasts.** Real-time PCR was used to quantify the mRNA levels of PPAR $\alpha$  (a), PGC-1 $\alpha$  (b), L-PBE (c), PEX11 $\alpha$  (d) and IL-6 (e) genes after a 48h exposure of P-NALD fibroblasts to argan oil. Fibroblasts were seeded at  $5 \times 10^5$  cells per 10 cm plate in duplicate. Control fibroblasts were treated with vehicle, 0.2% ethanol (Ctrl), Argan oil (AO) at 56 ng/ mL, LPS at 0.2  $\mu\text{g/mL}$  (LPS), or Argan oil at 56 ng/ mL plus LPS at 0.2  $\mu\text{g/mL}$  (AO+LPS). All real-time PCR reactions were performed in duplicate. All values are means  $\pm$  SEM from two experiments and are normalized to control. Statistical significance was determined by unpaired two-tailed Student's test. Symbols (\*) correspond to a statistical significance, ( $p < 0.01$  for \*\*\*,  $p < 0.02$  for \*\*,  $p < 0.05$  for \*), compared with the control (\*).

Figure 1.

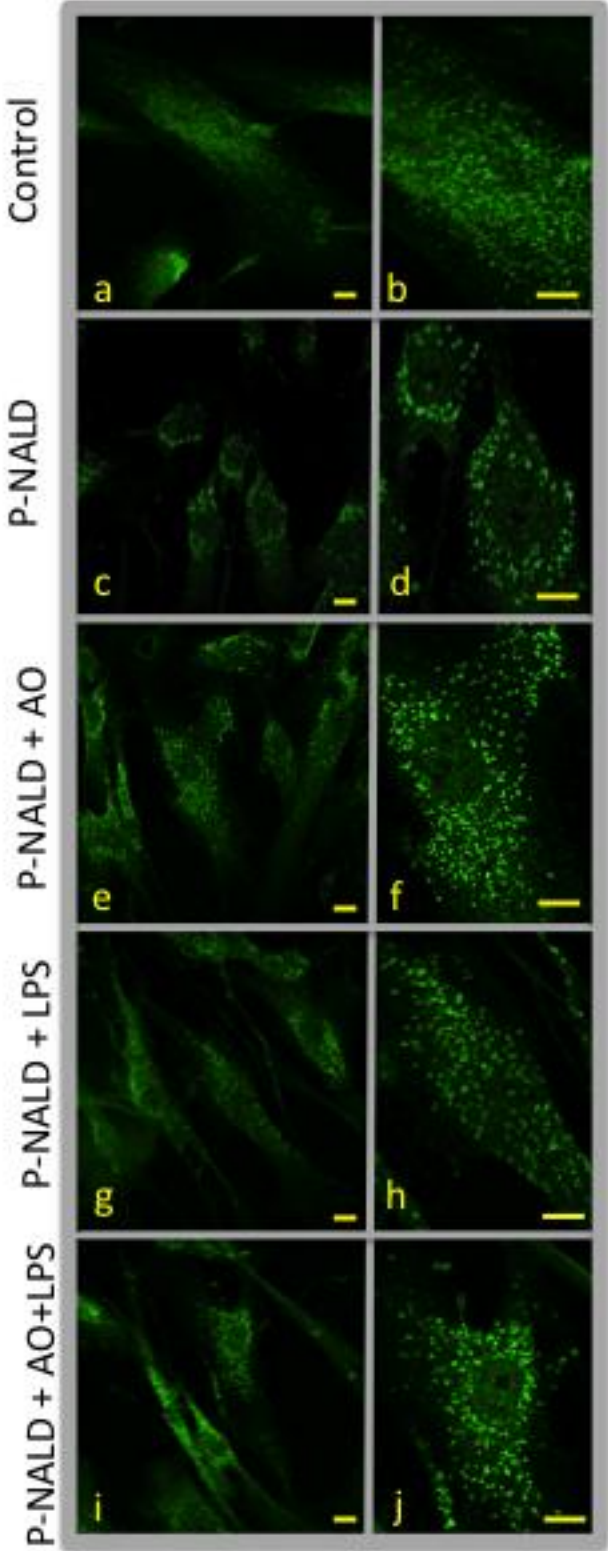
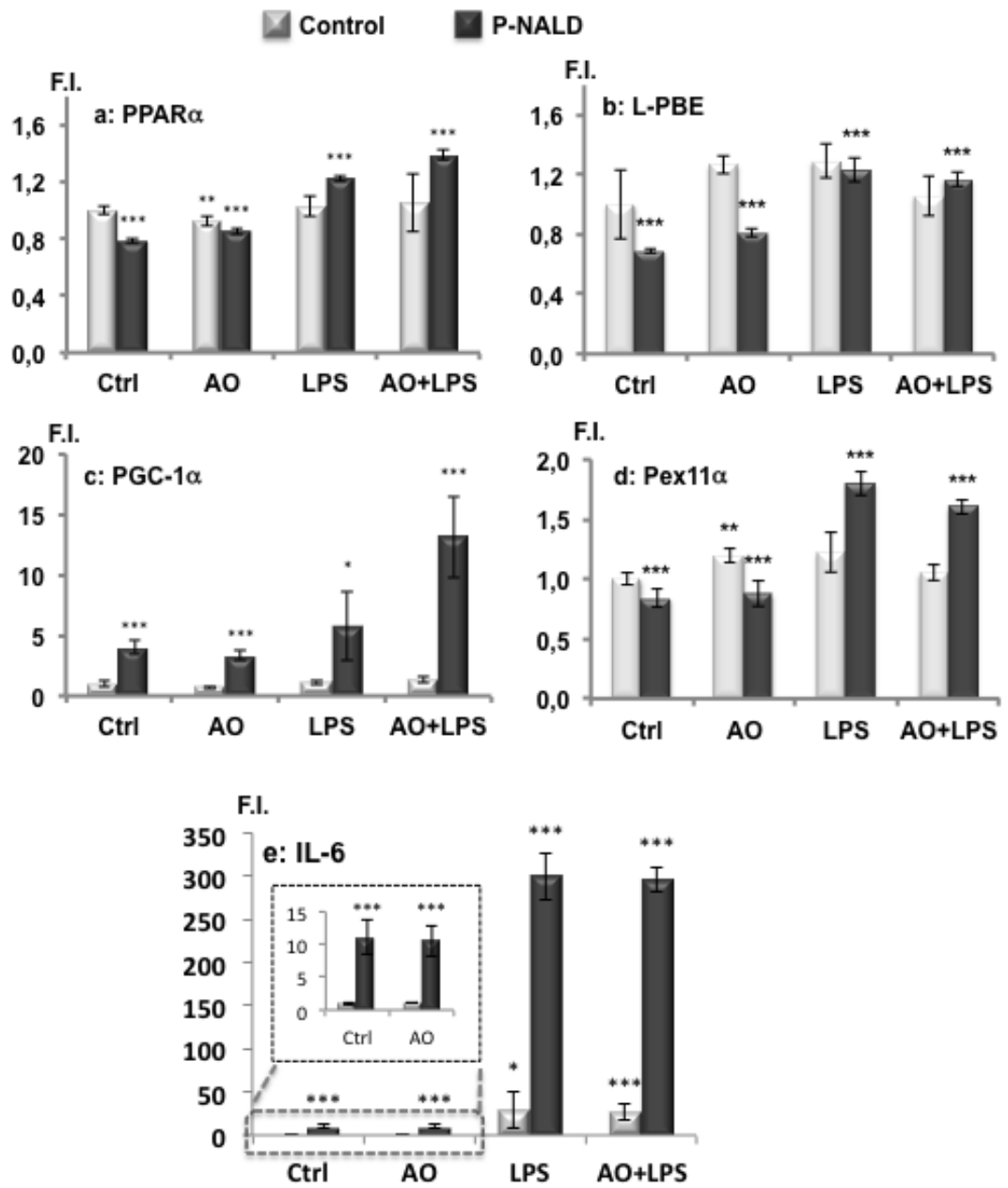


Figure 2.



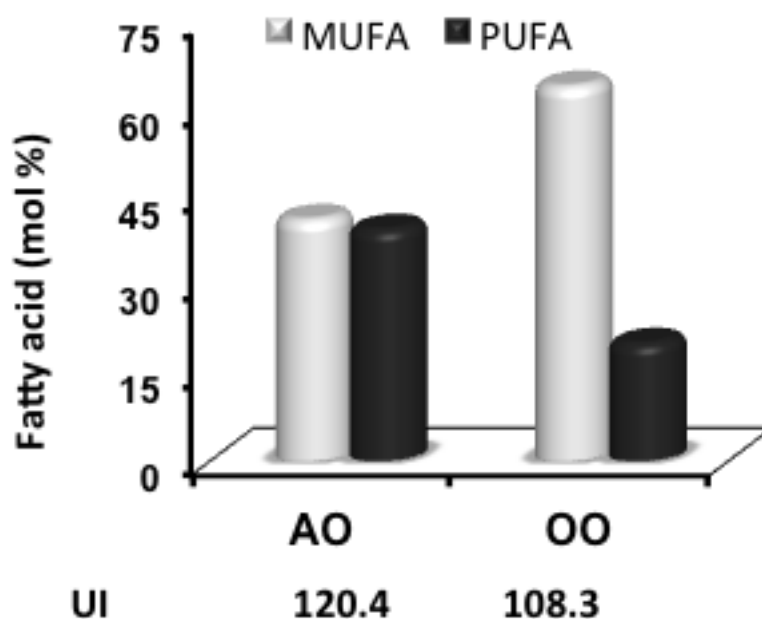
### Supplementary data

**Table S1: Comparison of individual fatty acid compositions of Argan and olive oils inferred from published and present data expressed in % of total oil fatty acid contents.**

Fatty acid	Argan oil		Olive oil
	Published <sup>a</sup>	This Study	This Study
C14:0	0.11± 0.01	0.17±0.017	-
C16:0	12.38±0.37	12.72±0.07	11.66
C16:1	0.057±0.029	0.18±0.046	0.89
C18:0	5.99±0.39	5.45±0.25	3.02
C18:1	47.75±1.33	45.97±0.76	76.89
C18:2	32.08±1.39	34.75±1.02	6.13

<sup>a</sup> Benzaria A. et al. Nutrition, 2006, 22:628-637.

Figure S1



**Figure S1:** Comparison of monounsaturated fatty acids (MUFA) versus polyunsaturated fatty acids (PUFA) contents of argan oil and olive oil. Argan oil (AO) has an equilibrated mixed content in mono- and polyunsaturated fatty acids contrarily to olive oil (OO). Unsaturation index (UI) is calculated as summed moles per 100 moles multiplied by the number of double bonds.

## Conclusion

L'évaluation de l'effet de l'huile d'Argan ou du LPS *in vitro* sur l'abondance des peroxyosomes dans un modèle des fibroblastes de patient atteint par la Pseudo-adrénoleucodystrophie néonatale a montré que :

- Le traitement des fibroblastes P-NALD par l'huile d'argan induit la prolifération des peroxyosomes indépendamment de l'activation à la fois du récepteur nucléaire PPAR $\alpha$  et son coactivateur PGC-1 $\alpha$ .
- Le traitement des fibroblastes P-NALD par le LPS a induit une augmentation de l'inflammation élucidée par l'induction de l'IL-6.
- Le traitement des fibroblastes P-NALD par le LPS induit la prolifération des peroxyosomes accompagnée d'une activation de la transcription du récepteur nucléaire PPAR $\alpha$  et son coactivateur PGC-1 $\alpha$ .

Nos résultats suggèrent que l'huile d'Argan aurait un potentiel thérapeutique à utiliser chez les patients atteints de P-NALD et qu'il serait intéressant d'aller plus loin dans l'exploration de ce potentiel pour comprendre les mécanismes moléculaires sous-jacents.

### III. Effet de l'huile d'Argan sur le métabolisme lipidique et glucidique

#### 1. Le métabolisme des acides gras

Les acides gras sont des molécules biologiques importantes pour la croissance et le développement de l'organisme. Ils sont utilisés en tant que source énergétique, régulateurs de la signalisation moléculaire et en tant que composants essentiels des membranes cellulaires (Jump et al., 2005). En effet, chez l'homme certains troubles (maladies cardiovasculaires, l'hyperlipidémie, l'obésité, résistance à l'insuline) sont caractérisés par des niveaux altérés d'acides gras ou de leurs métabolites qui provoquent par leur accumulation dans la cellule du stress oxydant et de l'inflammation dérégulant ainsi l'homéostasie cellulaire. Il est donc important de maintenir un contrôle strict sur les niveaux des acides gras dans la cellule et dans l'organisme (Forman et al., 1997).

Ce contrôle sur la régulation du taux des acides gras, se fait principalement dans le foie qui est le carrefour de métabolisme énergétique aussi bien lipidique que glucidique (Jump et al., 2005). Ce contrôle est exercé par des récepteurs nucléaires du type PPAR et dont le PPAR $\alpha$  joue un rôle majeur dans la régulation de la transcription de gènes codant des enzymes impliquées dans l'oxydation des acides gras (Cherkaoui-Malki et al., 2001).

En tant que ligands naturels, les acides gras activent le PPAR $\alpha$ , ensuite ce dernier recrute le coactivateur PGC-1 $\alpha$  pour stimuler la transcription des gènes cibles, en l'occurrence ceux codant pour des enzymes impliquées dans les deux voies de la  $\beta$ -oxydation des acides gras, mitochondriale et peroxysomale (Gulick et al., 1994; Reddy et Hashimoto, 2001). Parmi ces gènes cibles on trouve notamment les gènes codant respectivement pour l'Acyl-CoA oxydase (ACOX1), l'enzyme bifonctionnelle (L-PBE) au niveau peroxysomal et l'Acyl-CoA déshydrogénase des moyennes chaînes (ACADM) au niveau mitochondrial. Ces gènes sont des cibles directes de PPAR $\alpha$  (Meng et al., 2009; Pyper et al., 2010).

Dans notre étude, les souris ont été traitées par l'huile d'Argan ou l'huile d'Olive. Deux huiles naturelles très riches en acides gras mono et polyinsaturés. Par conséquence, l'administration de ces huiles est susceptible d'avoir un effet sur le métabolisme lipidique au niveau du foie des souris en activant PPAR $\alpha$ . Dans ce contexte, nous avons évalué les effets de ces traitements, au niveau du tissu hépatique chez la souris, sur les variations d'expression du facteur de transcription PPAR $\alpha$  et son coactivateur PGC-1 $\alpha$  ainsi que leurs gènes cibles au niveau de la voie de la  $\beta$ -oxydation, des acides gras, mitochondriale et peroxysomale.

Cette évaluation est faite à trois niveaux :

- Au niveau post-transcriptionnelle par l'évaluation des taux des ARNm
- Au niveau post-traductionnelle par l'évaluation de l'expression protéique
- Au niveau de l'activité enzymatique des enzymes codées par les gènes cibles de PPAR $\alpha$

### 1.1 Effet de l'huile d'Argan sur le récepteur nucléaire PPAR $\alpha$ et son coactivateur PGC-1 $\alpha$

#### 1.1.1 Expression des ARNm codants pour PPAR $\alpha$ et PGC-1 $\alpha$

L'évaluation des taux d'expression relatif des ARNm de facteur de transcription PPAR $\alpha$  et PGC-1 $\alpha$  par qPCR a montré (Figure 23) que le traitement induit significativement le taux des ARNm de PPAR $\alpha$  au niveau hépatique aussi bien par le traitement à l'huile d'Argan que par le traitement à l'huile d'Olive. Alors qu'il y avait une diminution du taux des ARNm du coactivateur PGC-1 $\alpha$  avec le traitement à l'huile d'Argan et pas de changement significatif avec l'huile d'Olive.

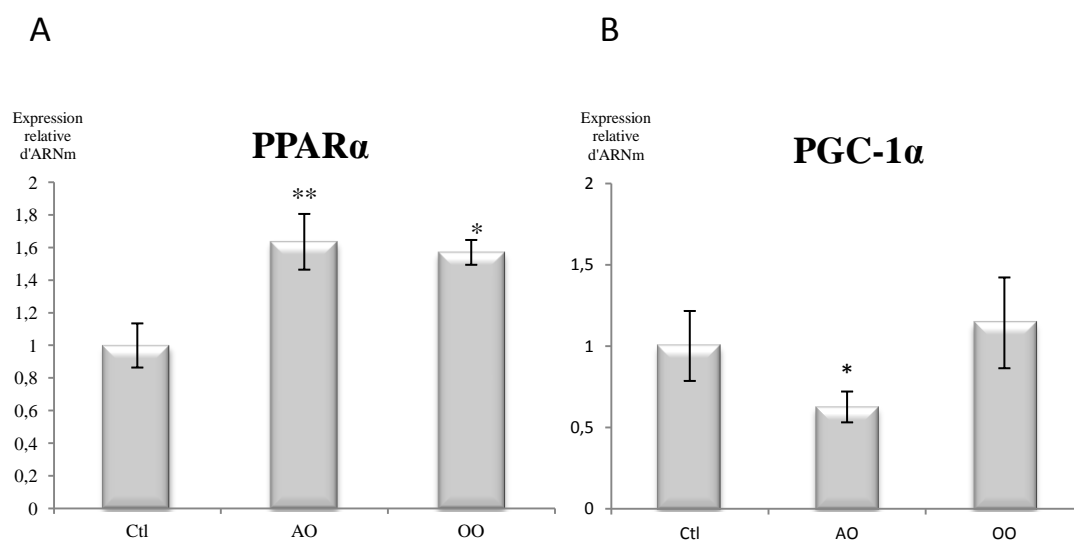


Figure 23 : Effet de l'huile d'Argan ou de l'huile d'Olive sur les niveaux relatifs d'expression des ARNm de (A) PPAR $\alpha$  et (B) PGC-1 $\alpha$ , dans le foie des souris.

Les ARNm ont été extraits à partir du foie puis analysés par RT-qPCR en utilisant des amorces spécifiques pour le PPAR $\alpha$  et pour le PGC-1 $\alpha$ . Les valeurs de Ct obtenues pour chaque gène après qPCR ont été normalisées par rapport au gène de référence 36B4, ensuite ces valeurs normalisées ont été rapportées à celle du contrôle pour obtenir le taux d'expression relatif pour chaque gène. La valeur représente la moyenne  $\pm$  SEM de 5 souris par traitement. \*\*P<0.01,\*P<0.05 représentent les probabilités de significativité statistique après comparaison par le test Student.

Ces résultats montrent que la nature de la composition de l'huile administrée affecte de manière différentielle les expressions d'ARNm PPAR $\alpha$  et PGC-1 $\alpha$ , en particulier pour l'huile d'Argan. En effet, l'huile d'Argan présente un index de saturation plus élevé que celui de



l'huile d'olive. La participation à cette régulation d'autres composés présents uniquement dans l'huile d'Argan ne peut pas être exclue.

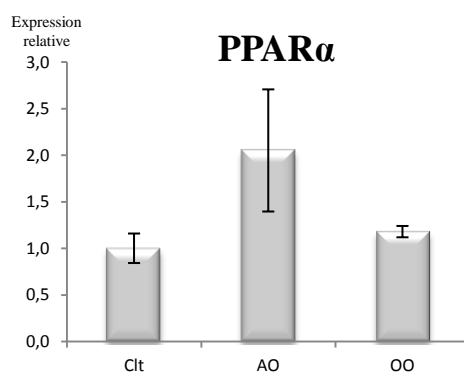
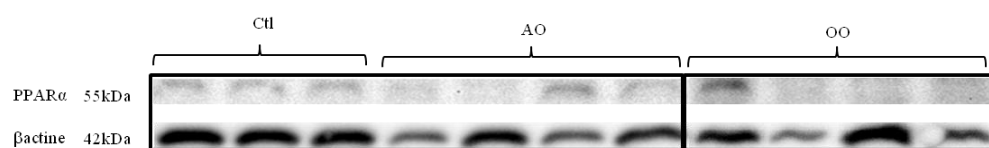
Par la suite, les variations montrées des taux d'expression relatif des ARNm de facteur de transcription PPAR $\alpha$  et de son coactivateur PGC-1 $\alpha$  par qPCR au niveau hépatique, nous ont poussé à évaluer les taux d'expressions protéiques par Western-blot en utilisant des anticorps polyclonaux dirigés contre PPAR $\alpha$  ou PGC-1 $\alpha$ .

### 1.1.2 Expression relative protéique de PPAR $\alpha$ et PGC-1 $\alpha$

Les homogénats de foies de souris contrôles et traités ont été séparées par électrophorèse dénaturantes (PAGE-SDS) et analysées par western blot. Le résultat montre respectivement une bande à 55kDa pour PPAR $\alpha$  et une de 92kDa pour PGC-1 $\alpha$  avec des variations inter-individuelles dans les groupes de souris traités par l'AO ou l'OO. Les membranes ont été ensuite analysées par densitométrie. L'analyse de l'intensité des bandes obtenues par western-blot (Figure 24) a montré que le traitement par l'huile d'Olive n'a pas d'effet sur l'expression relative protéique de PPAR $\alpha$  au niveau de foie des souris. Alors que, le traitement par l'huile d'Argan a augmenté l'expression relative protéique de PPAR $\alpha$  par rapport au contrôle mais cette augmentation n'est pas significative.

Cependant, l'expression relative protéique de coactivateur PGC-1 $\alpha$  est stable sans aucune variation avec les deux traitements en l'huile d'Argan et en l'huile d'Olive.

A



B

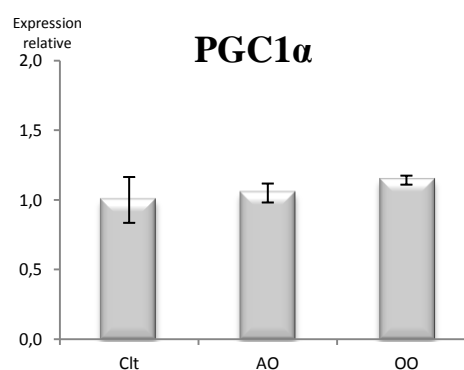
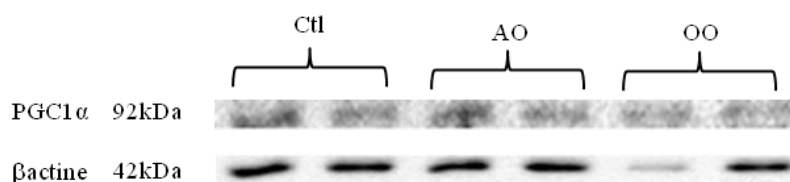


Figure 24 : Effet de l'huile d'Argan ou de l'huile d'Olive sur l'expression relative protéique de (A) PPAR $\alpha$  et (B) PGC-1 $\alpha$  dans le foie des souris.

Les extraits des foies des souris ont été séparés par électrophorèse en gel de polyacrylamide en présence de SDS puis transférés sur une membrane de PVDF et immunodétectés avec l'anticorps anti-PPAR $\alpha$  ou l'anticorps anti-PGC-1 $\alpha$ . La membrane a été ensuite « strippée » par une solution acide et exposée à l'anticorps anti- $\beta$ -actine. La détection et la capture de chimiluminescence sont faites par un appareil ChemiDoc MP Imaging System (Bio Rad). Les histogrammes représentent l'analyse de la densité relative des bandes par rapport à celle de la  $\beta$ -actine faite par le logiciel Image Lab (Bio Rad). La figure A représente les résultats de deux membranes réalisés parallèlement dans la même expérience dans les mêmes conditions et au même temps. Les histogrammes représentent la moyenne  $\pm$  SEM pour au moins deux souris par traitement.

Les résultats obtenus à partir de la qPCR (Figure 23) et du western blot (Figure 24) montrent que le traitement par l'huile d'Argan augmente le taux d'expression des ARNm de PPAR $\alpha$ . Ainsi qu'une augmentation chez certaines souris traitées de l'expression protéique de PPAR $\alpha$  qui est globalement non significative à cause de variation des réponses individuelles avec le traitement.

De plus, le traitement par l'huile d'Argan a montré une diminution du taux d'expression relatif des ARNm de PGC-1 $\alpha$  (Figure 23), qui ne se reflète pas au niveau protéique. Ceci pourrait s'expliquer par une régulation post-transcriptionnelle du taux des ARNm PGC-1 $\alpha$  à cause de la variation d'expression par exemple du taux de certains ARN interférents (miRNAs).

Les résultats du traitement par l'huile d'Olive ont montré une augmentation du taux d'expression relatif des ARNm de PPAR $\alpha$  (Figure 23). Cette augmentation ne s'est pas reflétée au niveau de l'expression protéique de PPAR $\alpha$  (Figure 24). Cependant, le traitement par l'huile d'Olive n'a pas montré d'effets aussi bien sur le taux d'expression des ARNm et sur l'expression protéique du PGC-1 $\alpha$  (Figure 23 et Figure 24).

L'ensemble de ces données montre que les traitements à l'huile d'Argan ou à l'huile d'olive, même si elles indiquent des variations des expressions au niveau des ARNm, ces variations ne se traduisent pas au niveau protéique. Cependant, ces résultats ne nous renseignent pas sur les niveaux d'activation de PPAR $\alpha$  et/ou de la co-activation par PGC-1 $\alpha$ . En effet, les traitements par l'huile d'Argan ou par l'huile d'Olive pourraient affecter les voies de signalisation responsables de la régulation des activités nucléaires de ces deux protéines et par la suite l'expression de leurs gènes cibles. Dans ce sens, considérant le rôle important de PPAR $\alpha$  et de PGC-1 $\alpha$  dans la régulation de métabolisme des acides gras, nous avons étudié les variations d'expressions des gènes cibles de PPAR $\alpha$ , qui sont impliqués dans les deux voies de la  $\beta$ -oxydation des acides gras au niveau peroxysomal et mitochondriale.

## 1.2 Effet de l'huile d'Argan sur les gènes impliqués dans $\beta$ -oxydation

La  $\beta$ -oxydation est la voie de la dégradation des acides gras aussi bien au niveau de la mitochondrie et au niveau du peroxysome. Le mécanisme de la  $\beta$ -oxydation dans les mitochondries et dans les peroxysomes est identique et comporte un ensemble de quatre réactions consécutives :

(1) la déshydrogénation, (2) l'hydratation (de la double liaison); (3) la déshydrogénation à nouveau, et (4) le clivage thiolytique (Wanders, 2004).

### 1.2.1 Effet de l'huile d'Argan sur la $\beta$ -oxydation au niveau peroxysomal

Les quatre réactions de la  $\beta$ -oxydation peroxysomale sont catalysées par trois enzymes :

(1) Acyl-CoA oxydase (déshydrogénation), (2) enzyme bifonctionnelle (hydratation de la double liaison et déshydrogénation à nouveau) et (3)  $\beta$ -cétotiolase (clivage thiolitique) (Wanders et Waterham, 2006).

#### a. Expression des ARNm codants pour l'ACOX1

L'acyl-CoA oxydase (ACOX) est l'enzyme clé de la voie de la  $\beta$ -oxydation peroxysomale. Il catalyse la première réaction dans le cycle de la  $\beta$ -oxydation peroxysomale, qui est considérée être la principale étape enzymatique qui contrôle le flux des acides gras à travers cette voie (Poirier et al., 2006). De plus, l'ACOX1 est codée par un gène cible directe du facteur de transcription PPAR $\alpha$  (Pyper et al., 2010).

L'évaluation des taux d'expression relatif des ARNm de l'ACOX1 (Figure 25) a montré que le traitement par l'huile d'Argan ou par l'huile d'Olive induit une augmentation significative du gène de l'ACOX1 au niveau hépatique des souris.

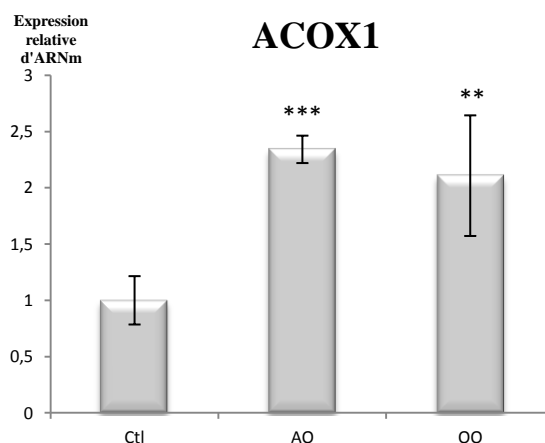


Figure 25 : Effet de l'huile d'Argan ou de l'huile d'Olive sur les niveaux relatifs d'expression des ARNm d' ACOX1, dans les foie de souris.

Les ARNm ont été extraits à partir du foie puis analysés par RT-qPCR en utilisant des amorces spécifiques pour l'ACOX1. Les valeurs de Ct obtenues pour chaque gène après qPCR ont été normalisées par rapport au gène de référence 36B4, ensuite ces valeurs normalisées ont été rapportées à celle du contrôle pour obtenir le taux d'expression relatif pour chaque gène. La valeur représente la moyenne  $\pm$  SEM de n = 5 souris par traitement. \*\*\*P<0.001, \*\*P<0.01 représentent les probabilités de significativité statistique après comparaison par le test Student.

Les résultats de la qPCR (Figure 25) ont montré une augmentation significative des taux d'expression relatif des ARNm de l'ACOX1 en traitant par l'huile d'Argan (AO) ou par l'huile d'Olive (OO). De plus, l'ACOX1 est un gène cible du facteur de transcription PPAR $\alpha$ .

Le traitement par l'huile d'Argan ou l'huile d'Olive active le PPAR $\alpha$ . Par conséquent, le PPAR $\alpha$  pourrait stimuler donc la transcription du gène codant de l'ACOX1 dans le foie de la souris.

#### b. Expression protéique de l'ACOX1

L'ACOX1 est une protéine dimérique de 140 kDa composée de deux sous unités de 72 kDa (polypeptide A), qui peut être clivée dans la matrice peroxysomale par une protéase en deux sous-unités de 51 (polypeptide B) et 21 kDa (polypeptide C) (Hashimoto, 1999).

Le résultat du western blot montre que les extraits de foie des souris révèlent trois bandes 21, 51 et 72kDa caractéristiques de l'ACOX1. Ces bandes correspondent aux trois polypeptides de l'ACOX1 (Figure 26).

L'évaluation par densitométrie de l'expression relative protéique de l'ACOX1 (Figure 26) a montré une augmentation non significative (à cause des variations individuelles) suite au traitement par l'huile d'Argan ou par l'huile d'Olive au niveau du foie de souris.

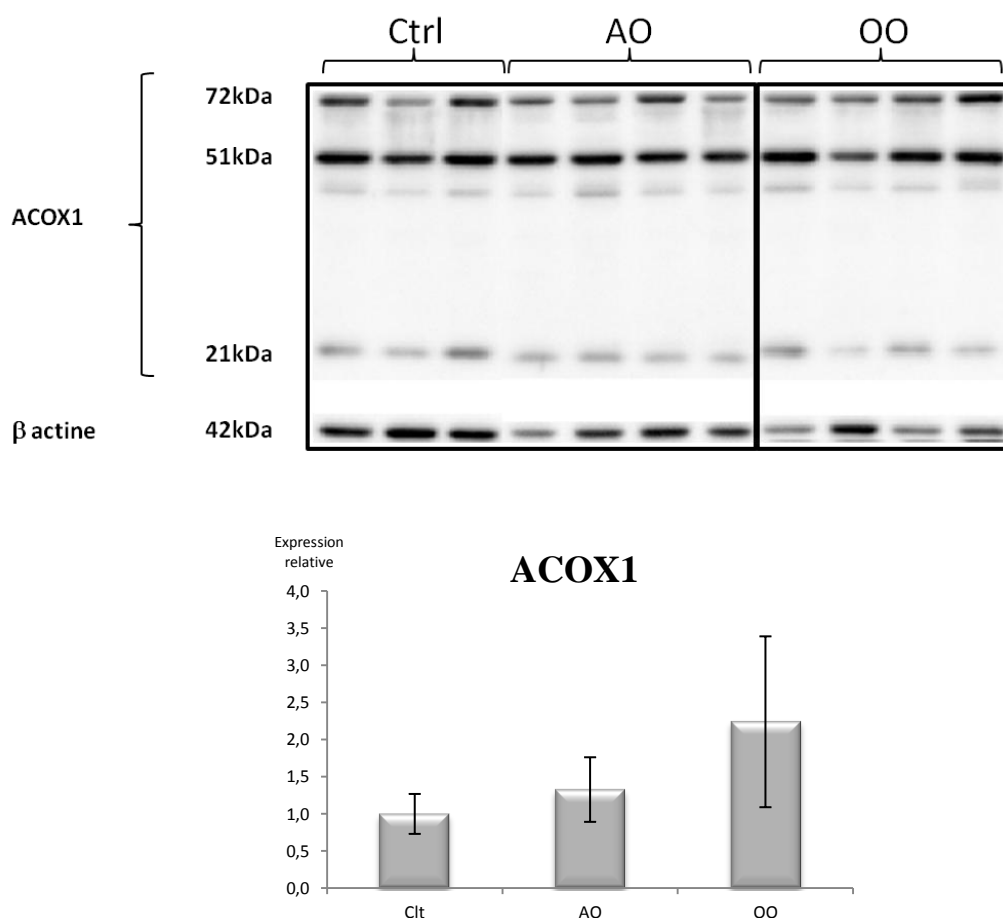


Figure 26 : Effet de l'huile d'Argan ou de l'huile d'Olive sur l'expression relative protéique de l'ACOX1 dans le foie des souris.

La protéine ACOX1 est caractérisée par 3 bandes respectivement de 21, 51 et 72kDa. Les extraits des foies des souris ont été séparés par électrophorèse en gel de polyacrylamide en présence de SDS puis transférés sur une membrane de PVDF et immunodétectés avec l'anticorps anti-ACOX1. La membrane a été ensuite « strippée » par une solution acide et exposée à l'anticorps anti- $\beta$ -actine. La détection et la capture de chimiluminescence sont faites par un appareil ChemiDoc MP Imaging System (Bio Rad). L'histogramme représente l'analyse de la densité relative des bandes par rapport à celle de la  $\beta$ -actine faite par le logiciel Image Lab (Bio Rad). L'image représente deux membranes d'une même expérience réalisée dans les mêmes conditions et au même temps. L'histogramme représente la moyenne  $\pm$  SEM pour au moins trois souris par traitement.

### c. Expression protéique de L-PBE

L'enzyme bifonctionnelle L-PBE est une protéine monomérique de 79kDa. Elle catalyse à la fois les étapes 2 et 3 (l'hydratation et déshydrogénation) de la voie de la  $\beta$ -oxydation peroxysomale (Poirier et al., 2006).

Les résultats de western-blot (Figure 27) ont montré que les traitements par l'huile d'Argan ou par l'huile d'Olive n'ont pas d'effet sur l'expression relative protéique de L-PBE au niveau hépatique chez la souris.

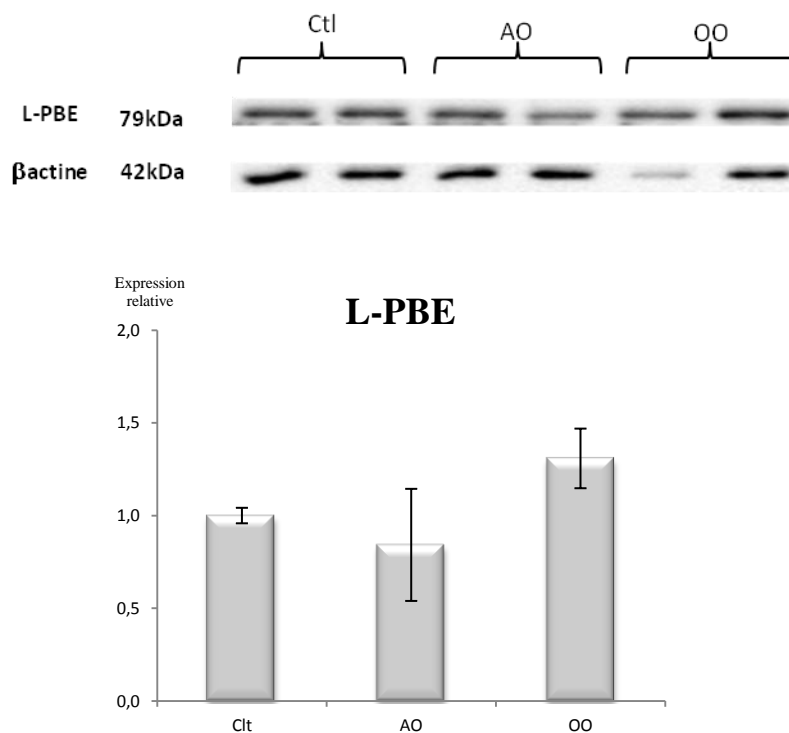


Figure 27 : Effet de l'huile d'Argan ou de l'huile d'Olive sur l'expression relative protéique de L-PBE dans le foie des souris.

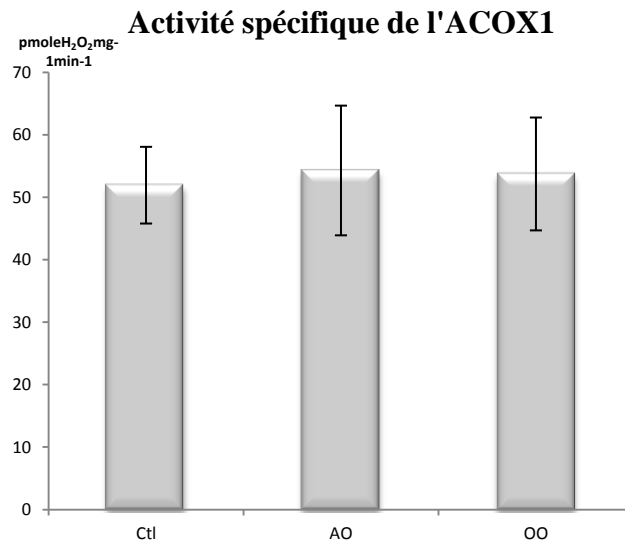
Les extraits des foies des souris ont été séparés par électrophorèse en gel de polyacrylamide en présence de SDS puis transférés sur une membrane de PVDF et immunodétectés avec l'anticorps anti-L-PBE. La membrane a été ensuite strippée par une solution acide et exposée à l'anticorps anti-β-actine. La détection et la capture de chimiluminescence sont faites par un appareil ChemiDoc MP Imaging System (Bio Rad). L'histogramme représente l'analyse de la densité relative des bandes par rapport à celle de la β-actine faite par le logiciel Image Lab (Bio Rad). L'histogramme représente la moyenne ± SEM pour deux souris par traitement.

Les résultats de western-blot ont montré que les traitements par l'huile d'Argan ou par l'huile d'Olive n'ont pas d'effet sur l'expression relative protéique des enzymes de la β-oxydation peroxysomale ACOX1 et L-PBE. Tandis que, les résultats de la qPCR ont montré une augmentation des taux d'expression relatifs des ARNm de l'ACOX1. Cette variation entre l'évaluation des taux d'expression relatifs d'ARNm et l'expression relative protéique pourrait être expliquée par une régulation post-transcriptionnelle.

#### d. Activité enzymatique de l'ACOX1

Pour confirmer les résultats de la qPCR et du western blot nous avons mesuré l'activité enzymatique de l'ACOX1 par la méthode fluorimétrique (voir partie matériels et méthodes).

La mesure de l'activité enzymatique de l'ACOX1 (Figure 28) a montré que les traitements par l'huile d'Argan ou par l'huile d'Olive n'ont pas d'effet sur l'activité spécifique de l'ACOX1.



*Figure 28 : Effet de l'huile d'Argan et de l'huile d'Olive sur l'activité enzymatique de l'ACOX1 dans le foie des souris.*

La mesure de l'activité enzymatique de l'ACOX1 dans le foie des souris a été réalisée par la méthode fluorimétrique en mesurant la fluorescence émise à 420 nm du produit de peroxydation de l'acide homovanillique par la peroxydase qui utilise l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> produite par l'ACOX1 en présence de palmitoyl-CoA comme substrat. La réaction est déclenchée par l'addition de l'extrait de foie dans le milieu réactionnel et le temps de lecture est de 30 min. L'histogramme représente la moyenne  $\pm$  SEM de 5 souris par traitement.

Les résultats obtenus par qPCR, par western blot et par mesure de l'activité enzymatique de l'ACOX1 avec le traitement par l'huile d'Argan ou l'huile d'Olive ont révélé :

- une induction des taux d'expressions relatives des ARNm
- une augmentation non significative de l'expression relative protéique
- une absence d'effet au niveau de l'activité enzymatique.

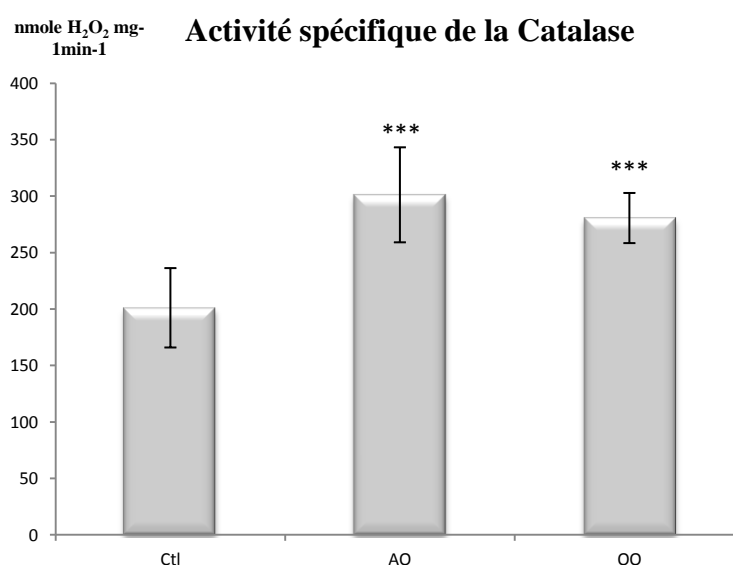
Ces différences de régulation entre les trois niveaux d'évaluation pourraient être dues à des régulations post-transcriptionnelles et/ou post-traductionnelles.



### e. Activité enzymatique de la catalase

La catalase est une enzyme qui joue un rôle important de protection contre les effets toxiques des peroxydes générés dans les peroxysomes par les réactions enzymatiques des oxydases. Elle possède une grande efficacité catalytique pour la dégradation de  $H_2O_2$  (Schrader et Fahimi, 2006).

Les résultats de la mesure de l'activité enzymatique de la catalase (Figure 29) ont montré que les traitements par l'huile d'Argan ou par l'huile d'Olive induisent une augmentation de l'ordre de 50% pour l'huile d'Argan et d'environ 40% pour l'huile d'olive de l'activité de la catalase au niveau de tissu hépatique des souris.



*Figure 29 : Effet de l'huile d'Argan ou de l'huile d'Olive sur l'activité enzymatique de la catalase dans le foie des souris.*

La mesure de l'activité enzymatique de la catalase dans le foie des souris a été réalisée par la méthode spectrophotométrique en mesurant la disparition à 240 nm du  $H_2O_2$  durant une minute. La réaction est déclenchée par l'addition de peroxyde d'hydrogène dans le milieu réactionnel. L'histogramme représente la moyenne  $\pm$  SEM de  $n=5$  souris par traitement. \*\*\* $P<0,001$  représentent les probabilités de significativité statistique après comparaison par le test de Student.

Les résultats de la mesure des activités enzymatiques de l'ACOX1 et de la catalase ont montré une stabilité de l'activité de l'ACOX1 avec les différents traitements et une induction de l'activité de la catalase. Cette augmentation spécifique de l'activité catalase pourrait s'expliquer par l'effet antioxydant de l'huile d'Argan ou de l'huile d'olive. Sachant que ces deux huiles sont riches en polyphénols et en tocophérols (huile d'Argan) ayant des propriétés antioxydantes, mais c'est la première fois que l'on montre une induction d'une enzyme

antioxydante par l'huile d'Argan. Cette induction pourrait être également une réponse cellulaire à une surproduction d' $H_2O_2$  par d'autres oxydases peroxysomales.

### 1.2.2 Effet de l'huile d'Argan sur la $\beta$ -oxydation au niveau mitochondriale

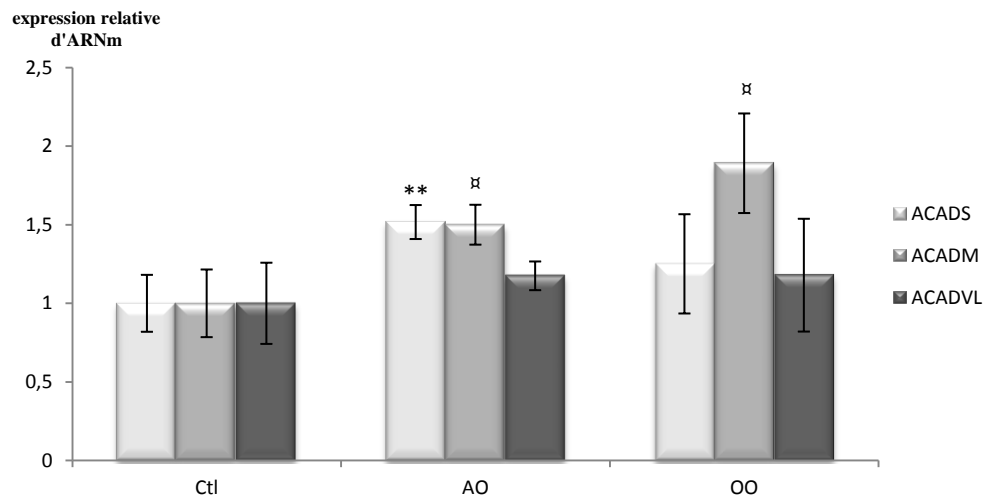
La première étape de la  $\beta$ -oxydation mitochondriale est catalysée par une famille d'acyl-CoA déshydrogénases qui catalysent des réactions de déshydrogénation en fonction de la longueur d'acide gras à chaîne linéaire. A l'exemple de l'ACADS pour les chaînes courtes (C4-C6), l'ACADM pour les chaînes moyennes (C4-C12), l'ACADL pour les chaînes longues (C8-C20) et l'ACADVL pour les chaînes très longues (C12-C24) (Bartlett et Eaton, 2004). Les longueurs de chaînes indiquées représentent les optima d'activité de ces différentes déshydrogénases pour leur substrats, mais elles sont capables chacune de déborder cet optimum. Les étapes suivantes de cette voie de  $\beta$ -oxydation mitochondriale sont catalysées par une seule protéine hétérotrimériques (Hashimoto, 1999).

#### a. Expression des ARNm codants pour les enzymes ACADs

Nous avons évalué les taux d'expression relatifs des ARNm d'acyl-CoA déshydrogénases des acides gras à courte chaîne (ACADS) à moyenne chaîne (ACADM) et à très longue chaîne (ACADVL) suivant les différents traitements réalisés.

Les résultats de la qPCR (Figure 30) ont montré que le traitement par l'huile d'Argan induit une augmentation des taux d'expression relatifs des ARNm de l'ACADS et de l'ACADM. Par contre, ce traitement n'a pas d'effet sur le taux d'expression relatifs des ARNm de l'ACADVL au niveau hépatiques des souris.

Cependant, le traitement par l'huile d'Olive induit une augmentation des taux d'expression relatifs des ARNm de l'ACADM, tandis qu'il n'a pas d'effet sur l'expression de ceux codant l'ACADS ou l'ACADVL.



*Figure 30 : Effet de l'huile d'Argan ou de l'huile d'Olive sur les niveaux relatifs d'expression des ARNm des ACADs, dans le tissu de foie des souris.*

Les ARNm ont été extraits à partir du foie puis analysés par RT-qPCR en utilisant des amorces spécifiques pour l'ACADS, l'ACADM et l'ACADVL. Les valeurs de Ct obtenues pour chaque gène après qPCR ont été normalisées par rapport au gène de référence 36B4, ensuite ces valeurs normalisées ont été rapportées à celle du contrôle pour obtenir le taux d'expression relatif pour chaque gène. La valeur représente la moyenne  $\pm$  SEM de  $n = 5$  souris par traitement. \*\* $P < 0,01$ , ♂  $P < 0,05$  représentent les probabilités de significativité statistique après comparaison par le test student.

#### b. Expression relative protéique de l'ACADM

Les résultats de western-blot (Figure 31) ont montré que les traitements par l'huile d'Argan ou l'huile d'Olive n'ont pas d'effet sur l'expression relative protéique de l'ACADM au niveau hépatique chez la souris.

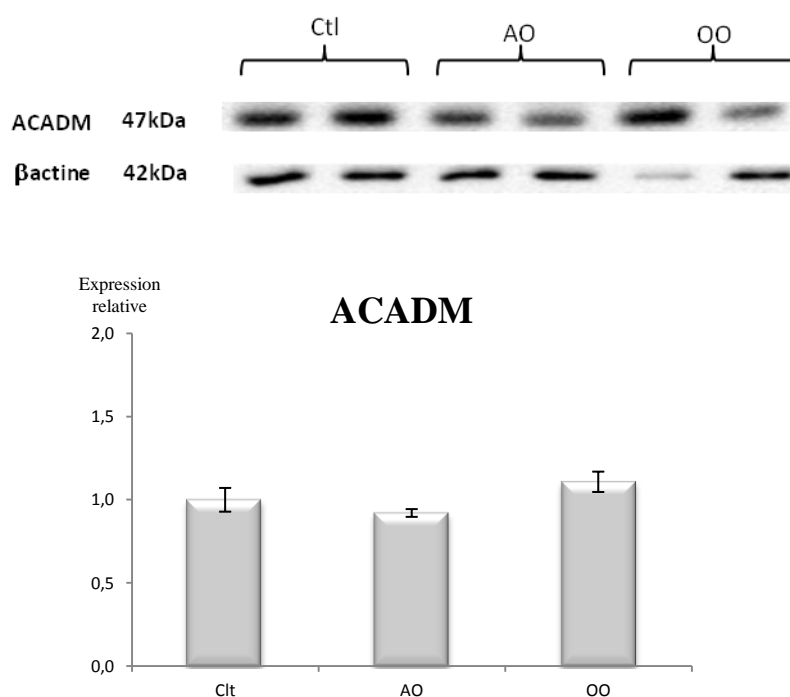


Figure 31 : Effet de l'huile d'Argan ou de l'huile d'Olive sur l'expression relative protéique de l'ACADM au niveau de tissu de foie des souris.

Les extraits des foies des souris ont été séparés par électrophorèse en gel de polyacrylamide en présence de SDS puis transférés sur une membrane de PVDF et immunodétectés avec l'anticorps anti-ACADM. La membrane a été ensuite strippée par une solution acide et exposée à l'anticorps anti-β-actine. La détection et la capture de chimiluminescence sont faites par un appareil ChemiDoc MP Imaging System (Bio Rad). L'histogramme représente l'analyse de la densité relative des bandes par rapport à celle de la β-actine faite par le logiciel Image Lab (Bio Rad). L'histogramme représente la moyenne ± SEM pour deux souris par traitement.

### c. Activité des enzymes de la β-oxydation mitochondriale

La mesure de l'activité enzymatique des ACADs est faite par spectrophotométrie à 600nm en utilisant quatre dérivés ester-CoAs d'acide gras de différentes longueurs de chaîne : Butyryl-CoA (C4) pour l'ACADS, Octanoyl-CoA (C8) pour l'ACADM, Lauroyl-CoA (C12) pour l'ACADM et l'ACADL, Palmitoyl-CoA (C16) pour l'ACADL et l'ACADVL.

La mesure des activités enzymatiques (Figure 32) a montré une augmentation significative de l'activité de l'ACADS avec le traitement par l'huile d'Argan et par l'huile d'Olive accompagné d'une augmentation des activités spécifiques des autres déshydrogénases mitochondriales pour Lauroyl-CoA (C12), Palmitoyl-CoA (C16) alors qu'il n'y a pas d'effet pour le substrat Octanoyl-CoA (C8) avec les différents traitements.

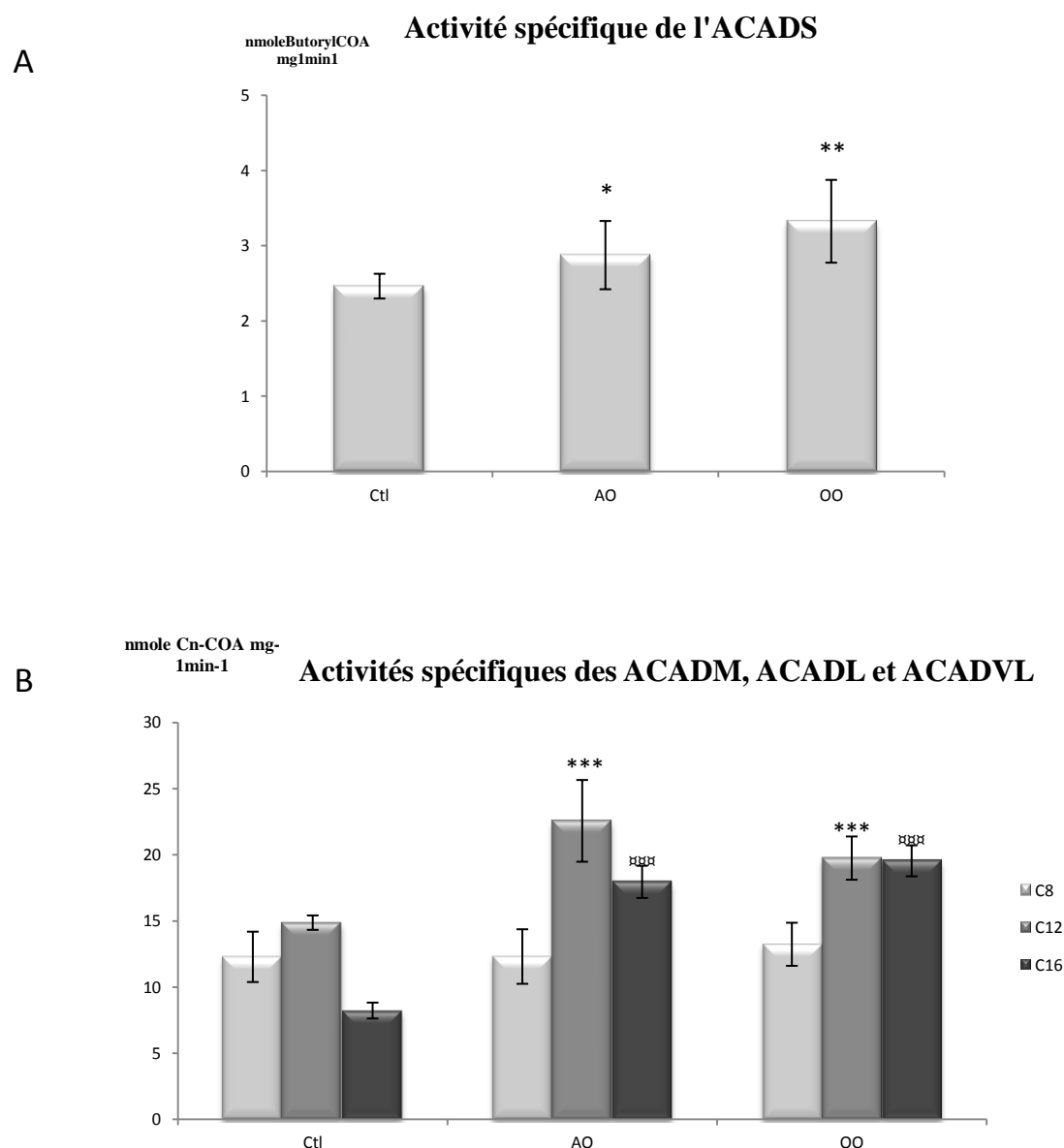


Figure 32 : Effet de l'huile d'Argan et de l'huile d'Olive sur l'activité enzymatique de (A) ACADS et (B) activités spécifiques des ACADM, ACADL et ACADVL vis-à-vis des substrats C8, C12, C16 au niveau de tissu de foie des souris.

La mesure de l'activité enzymatique des ACADS dans le foie des souris a été réalisée par la méthode spectrophotométrique en utilisant quatre dérivés ester-CoAs d'acide gras de différentes longueurs de chaîne : Butyryl-CoA (C4) pour mesurer l'activité de l'ACADS, Octanoyl-CoA (C8), Lauroyl-CoA (C12) et Palmitoyl-CoA (C16). Les histogrammes représentent la moyenne  $\pm$  SEM de 5 souris par traitement. \*\*\* $P < 0,001$ , \*\* $P < 0,01$ , \* $P < 0,05$ ; \*\*\*\* $P < 0,001$  représentent les probabilités de significativité statistique après comparaison par le test Student.

Les résultats de la qPCR, du western blot et de l'activité enzymatique des ACADs avec le traitement par l'huile d'Argan ou l'huile d'Olive ont montré :

- Une induction des taux d'expressions relatives des ARNm de l'ACADS et de l'ACADM
- Une absence d'effet sur l'expression protéique de l'ACADM
- Une induction des activités spécifiques des déshydrogénases mitochondriales (ACADS, ACADM, ACADL et ACADVL).

Les résultats de la qPCR ont montré une induction des taux des ARNm du facteur de transcription PPAR $\alpha$  et de ces gènes cibles ACOX1 et ACADM avec le traitement par l'huile d'Argan et par l'huile d'Olive. Ainsi qu'une induction de l'ACADS avec le traitement par l'huile d'Argan. De plus, les résultats de western blot ont montré des variations non significatives au niveau de l'expression protéique du PPAR $\alpha$ , de l'ACOX1 et de la L-PBE. Des résultats similaires ont été obtenus montrant l'absence d'effet de traitement à l'huile d'Argan sur l'expression protéique du PGC-1 $\alpha$  et de l'ACADM.

Cependant, les résultats de la mesure de l'activité enzymatiques ont montré une augmentation de l'activité de la catalase, de l'ACADS et les activités spécifiques d'ACADM d'ACADL et d'ACADVL pour respectivement le C12-lauroyl-CoA et C16-palmitoyl-CoA. Par contre, nous n'avons pas relevé d'effet du traitement à l'huile d'Argan sur l'activité enzymatique de l'ACOX1.

## 2. Effet du traitement à l'huile d'Argan sur la néoglucogénèse

La néoglucogénèse est la synthèse de glucose à partir des précurseurs non-glucidiques tels que le lactate, le pyruvate, le glycérol et l'alanine. Le taux de la néoglucogénèse est contrôlée par les activités des trois enzymes clés: la phospho énoypyruvate carboxykinase (PEPCK), le fructose-1,6-bisphosphatase, et le glucose-6-phosphatase (G6PH) (Puigserver et Spiegelman, 2003). La modulation de ces trois enzymes est principalement contrôlée au niveau transcriptionnel, notamment par le facteur de transcription HNF4 $\alpha$  (Yoon et al., 2001). L'absorption du glucose dans les cellules implique une protéine de transport du glucose appelé Glut4 (Steinbusch et al., 2011).

Les acides gras représentent avec le glucose les sources énergétiques majeures des cellules eucaryotes (Steinbusch et al., 2011). Le foie est le principal site de synthèse du glucose notamment par la voie de la néoglucogénèse (Puigserver et Spiegelman, 2003).

De plus, l'oxydation des acides gras dans le foie fournit des cofacteurs (ATP, NADH, acétyl-CoA) nécessaires aux étapes clés de la néoglucogenèse, conduisant à une production accrue de glucose par le foie (Boden, 2003; Girard, 2003).

Comme ligand, les acides gras ont un rôle important dans l'activation du facteur de transcription HNF4 $\alpha$  (Chamouton et Latruffe, 2012). Ce dernier régule l'expression des enzymes clés de la néoglucogenèse telles que la phosphoénolpyruvate carboxykinase (PEPCK), le fructose-1,6-bisphosphatase, et le glucose-6-phosphatase (Yoon et al., 2001).

Vu le rôle des acides gras dans la régulation de la néoglucogenèse, ainsi que la composition des huiles naturelles riches en acides gras, nous avons évalué au niveau transcriptionnel les effets de l'huile d'Argan sur le facteur de transcription HNF4 $\alpha$  et ses gènes cibles.

### 2.1 Expression des ARNm codants pour HNF4 $\alpha$

L'évaluation des taux d'expression relatifs des ARNm de facteur de transcription HNF4 $\alpha$ , par qPCR, (Figure 33) a montré chez les souris qu'il n'y a pas d'effet de traitement par l'huile d'Argan ou par l'huile d'Olive au niveau hépatiques.

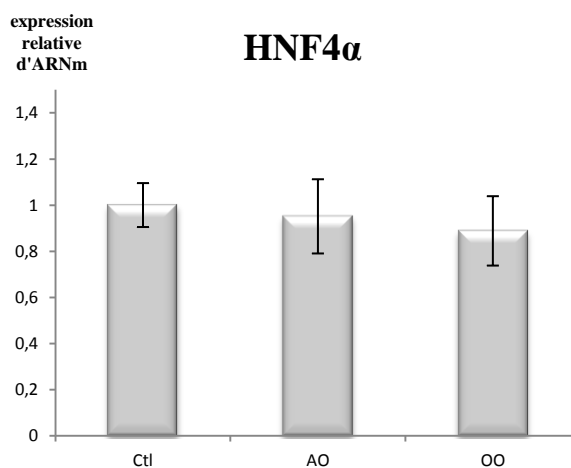


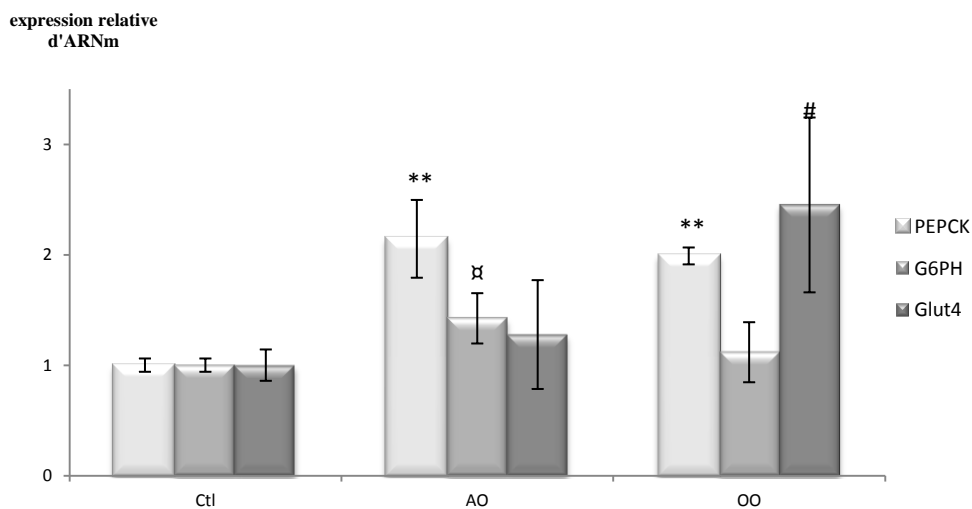
Figure 33 : Effet de l'huile d'Argan ou de l'huile d'Olive sur les niveaux relatifs d'expression des ARNm d'HNF4 $\alpha$ , dans le foie des souris.

Les ARNm ont été extraits à partir du foie puis analysés par RT-qPCR en utilisant des amorces spécifiques pour l'HNF-4 $\alpha$ . Les valeurs de Ct obtenues pour chaque gène après qPCR ont été normalisées par rapport au gène de référence 36B4, ensuite ces valeurs normalisées ont été rapportées à celle du contrôle pour obtenir le taux d'expression relatif pour chaque gène. La valeur représente la moyenne  $\pm$  SEM de 5 souris par traitement.

## 2.2 Expression des gènes cibles d' HNF4 $\alpha$

L'évaluation des taux d'expression relatifs des ARNm, de gènes cibles d' HNF4 $\alpha$ , codant des enzymes clés de la néoglucogenèse PEPCK et G6PH, et du transporteur membranaire Glut4 a montré (Figure 34):

- Une induction des taux d'expression relatifs des ARNm de PEPCK avec le traitement par l'huile d'Argan et par l'huile d'Olive
- Une induction des taux d'expression relatifs des ARNm de G6PH avec le traitement par l'huile d'Argan
- Une induction des taux d'expression relatifs des ARNm de Glut4 uniquement avec le traitement par l'huile d'Olive.



*Figure 34 : Effet de l'huile d'Argan ou de l'huile d'Olive sur les niveaux relatifs d'expression des ARNm de PEPCK, G6PH et Glut4 dans le foie des souris.*

Les ARNm ont été extraits à partir du foie puis analysés par RT-qPCR en utilisant des amorces spécifiques pour PEPCK, G6PH et Glut4. Les valeurs de Ct obtenues pour chaque gène après qPCR ont été normalisées par rapport au gène de référence 36B4, ensuite ces valeurs normalisées ont été rapportées à celle du contrôle pour obtenir le taux d'expression relatif pour chaque gène. Les valeurs représentent la moyenne  $\pm$  SEM de 5 souris par traitement. \*\*P<0,01 ;  $\alpha$  P<0,05 ; # P<0,05 représentent les probabilités de significativité statistique après comparaison par le test student.

Les résultats de la qPCR ont montré une induction des taux d'expression relatifs des ARNm des enzymes clés de la néoglucogenèse sans augmentation de l'expression des ARNm d'HNF4 $\alpha$ . La transcription des gènes codant les enzymes de la néoglucogenèse pourrait être due à une activation post-transcriptionnelle et/ou post-traductionnelle d'HNF4 $\alpha$  et sa



translocation nucléaire ou encore due à l'activation d'autres facteurs de transcriptions tels que le récepteur des glucocorticoïdes ou le CREB (cAMP response element-binding protein) ou du facteur de transcription FOXO1 (Puigserver et al. 2003; Rhee et al. 2003)

### 2.3 Expression relative protéique de HNF4 $\alpha$

Les résultats de western blot de l'expression relative protéique de HNF4 $\alpha$  (Figure 35) ont montré au niveau hépatique chez les souris des augmentations non significatives avec les traitements par l'huile d'Argan ou par l'huile d'Olive par rapport au contrôle.

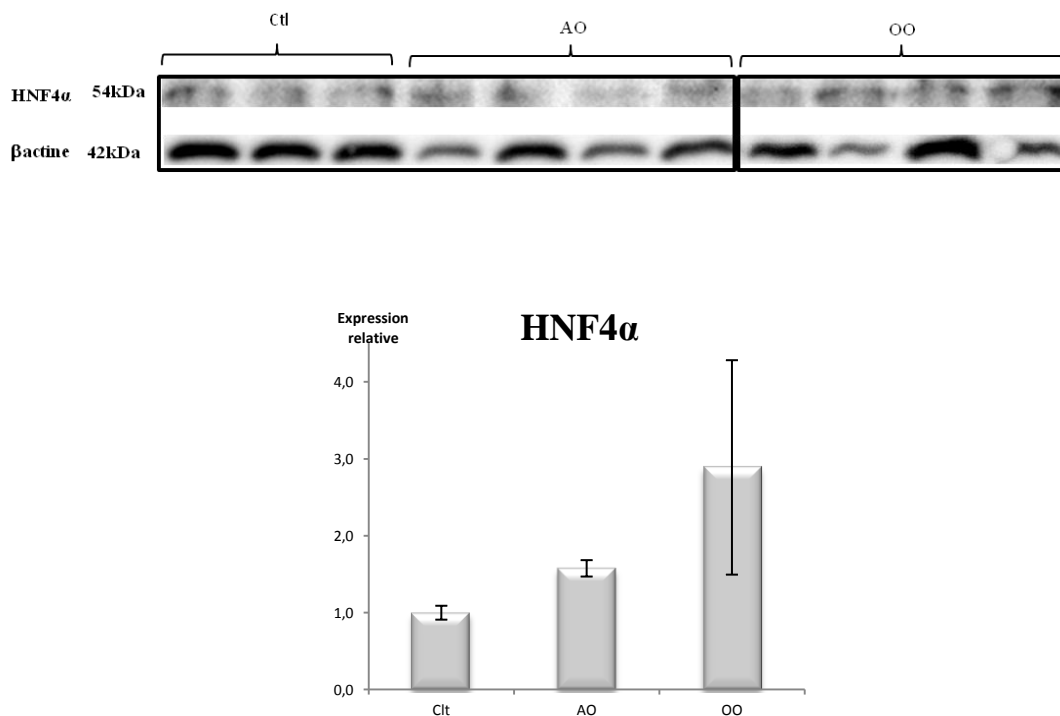


Figure 35 : Effet de l'huile d'Argan ou de l'huile d'Olive sur l'expression relative protéique de l' HNF4 $\alpha$  dans le foie des souris.

Les extraits des foies des souris ont été séparés par électrophorèse en gel de polyacrylamide en présence de SDS puis transférés sur une membrane de PVDF et immunodétectés avec l'anticorps anti-HNF4 $\alpha$ . La membrane a été ensuite « strippée » par une solution acide et exposée à l'anticorps anti- $\beta$ -actine. La détection et la capture de chimiluminescence sont faites par un appareil ChemiDoc MP Imaging System (Bio Rad). L'histogramme représente l'analyse de la densité relative des bandes par rapport à celle de la  $\beta$ -actine par le logiciel Image Lab (Bio Rad). L'image représente deux membranes de la même expérience réalisée dans les mêmes conditions et en même temps. L'histogramme représente la moyenne  $\pm$  SEM pour deux souris par traitement.

### 3. Conclusion

L'ensemble des résultats obtenus, après traitements par l'huile d'Argand ou par l'huile d'olive, a été récapitulé dans les Tableau 7 et Tableau 8 :

*Tableau 7: Récapitulation des effets de l'huile d'argan et l'huile d'olive sur le taux d'expression relatifs des ARNm des gènes de métabolisme lipidique*

Les voies	Les gènes	L'huile d'Argan	L'huile d'Olive
signalisation	PPAR $\alpha$	++	+
	PGC-1 $\alpha$	-	~
$\beta$ -oxydation	ACOX1	+++	++
	ACADS	+++	~
	ACADM	+	+
	ACADVL	~	~
néoglucogenèse	HNF4 $\alpha$	~	~
	G6PH	+	~
	PEPCK	++	++
	Glut4	~	+

Le signe (+) indique une augmentation de la significativité (+++> ++ > +), Le signe (-) indique une diminution de la significativité (---> -- > -) Le signe (~) indique aucun effet du traitement

*Tableau 8: Récapitulation des effets de l'huile d'argan et l'huile d'olive sur l'activité enzymatique des enzymes clés de la voie de la  $\beta$ -oxydation*

	Enzymes	L'huile d'Argan	L'huile d'Olive
$\beta$ -oxydation	ACOX1	~	~
	Catalase	+++	+++
	ACADS	+	++
	C8	~	~
	C12	+++	++
	C16	+++	++

L'analyse des résultats obtenus montre que le traitement par l'huile d'Argan ou l'huile d'olive a des effets contrastés sur le métabolisme des acides gras au niveau peroxysomale et au niveau mitochondriale :

- Au niveau transcriptionnel, les résultats de qPCR indiquent une régulation positive de PPAR $\alpha$  et de ses gènes cibles codant pour des protéines peroxysomales (ACOX1) ou mitochondriales (ACADM, ACADS). Cette régulation positive est plus marquée pour l'huile d'Argan que pour l'huile d'olive.
- Cette régulation positive est retrouvée également au niveau des taux d'expression relatifs des ARNm des enzymes clés de la néoglucogénèse PEPCK et G6PH alors que l'expression des ARNm du facteur de transcription HNF4 $\alpha$  ne sont pas augmenté par ces traitements.
- Au niveau traductionnel, les augmentations des expressions des ARNm (PPAR $\alpha$ , ACOX1, ACADS et ACADM) ne se traduisent pas au niveau protéique mais on constate des variations individuelles.
- Au niveau post-traductionnel, seul l'activité de la catalase est augmentée alors que celle de l'ACOX1 ne l'est pas. Par contre, les activités de  $\beta$ -oxydation mitochondriales des acides gras à courte, moyenne et longue chaînes sont augmentées aussi bien par le traitement à l'huile d'Argan que par le traitement à l'huile d'olive.

En conclusion, nos résultats montrent que le traitement à l'huile d'Argan, et dans une certaine mesure avec l'huile d'Olive, a un effet positif sur la dégradation mitochondriale des acides gras mais sans augmentation de l'activité de  $\beta$ -oxydation peroxysomale. De plus, cette induction de la  $\beta$ -oxydation mitochondriale est accompagnée par une augmentation de l'activité catalase. Ceci montre une action bénéfique de l'huile d'Argan sur le métabolisme des acides gras et une activité antioxydante (catalase) au niveau hépatique. L'induction des gènes G6PH et PEPCK par l'huile d'Argan ou l'huile d'olive en même temps que l'augmentation de la  $\beta$ -oxydation mitochondriale des acides gras ressemble à l'état de jeûne où il y a une coordination bénéfique de la néoglucogénèse et de l'oxydation des acides gras.

#### **IV. Effet préventif de l'huile d'Argan contre la perturbation du métabolisme lipidique par les endotoxines (lipopolysaccharides)**

Malgré les progrès considérables en médecine, les septicémies (ou sepsies) restent la cause principale d'origine infectieuse de décès dans le monde. En effet, plus de 18 millions de cas de septicémie sont recensés dans le monde (PRNewswire-USNewswire, 2010). Aux Etats-Unis, ces septicémies représentent annuellement 750 000 cas avec plus de 200 000 décès. La septicémie est définie comme une réponse systémique à une infection dont la cause la plus commune est la contamination du sang par des bactéries (Hotchkiss et Karl, 2003).

Par ailleurs, les endotoxémies gastro-intestinales représentent un facteur important dans l'hépatotoxicité liée aux endotoxines ou lipopolysaccharides d'origine bactérienne. Au niveau hépatique, les cellules de Kupffer, qui sont des macrophages résidents, sont responsables de la réponse cytokinique inflammatoire observée suite à l'exposition aux bactéries Gram-négative (Vassalli, 1992). Ces cytokines sont responsables, au moins en partie, de la réponse pathophysiologique du foie, en l'occurrence, de la phase de réponse aiguë, de l'hyperlipidémie, de la formation de radicaux oxygénés, de la fibrogenèse et de la cholestase (Camussi et al., 1991; Fiers, 1991).

C'est dans le cas de l'hyperlipidémie hépatique et la perturbation du métabolisme des acides gras que nous situons ce travail. En effet, le but de ces travaux est d'étudier l'effet préventif potentiel de l'huile d'Argan contre l'hyperlipémie hépatique provoquée par les endotoxines bactériennes comme le LPS. Cet effet éventuel de l'huile d'Argan a été comparé à celui de l'huile d'olive comme huile référence de consommation.

##### **1. Effets du LPS et de l'huile d'Argan sur le métabolisme des acides gras**

L'infection et l'inflammation peuvent induire de nombreuses altérations du métabolisme des lipides et des lipoprotéines. Dans ces conditions, l'augmentation de la lipolyse dans le tissu adipeux blanc provoque une augmentation de la sécrétion des VLDL induisant une augmentation du taux de TG plasmatique. Au niveau hépatique, le métabolisme des acides gras montre une induction de leur synthèse et une diminution de leur  $\beta$ -oxydation (Khovidhunkit et al., 2004).

Parmi les déclencheurs exogènes de l'inflammation on trouve des endotoxines bactériennes « les lipopolysaccharides » (Calder, 2006). Les travaux récents ont montré que les expressions de PPAR $\alpha$  et de son coactivateur PGC-1 $\alpha$  sont diminuées dans le foie et le cœur des souris suite à l'administration de LPS (Feingold et al., 2004).

D'après les résultats du chapitre I, l'huile d'Argan a un effet bénéfique sur le métabolisme lipidique par l'activation du facteur de transcription PPAR $\alpha$  et la voie de la  $\beta$ -oxydation. Par conséquent, cette huile est susceptible d'avoir un effet préventif contre les effets de LPS sur le métabolisme des acides gras.

Dans ce contexte nous avons évalué, au niveau hépatique chez la souris, les variations d'expression de gènes impliqués dans la régulation et le métabolisme des acides gras suite au traitement par le LPS seul, en cotraitement avec l'huile d'Argan ou encore en cotraitement avec l'huile d'Olive. Parmi les gènes étudiés on trouve le facteur de transcription PPAR $\alpha$  et son coactivateur PGC-1 $\alpha$  ainsi que leurs gènes cibles impliqués dans les voies de la  $\beta$ -oxydation des acides gras mitochondriale et peroxysomale.

Cette évaluation est suivie à trois niveaux :

- Au niveau post-transcriptionnelle par l'évaluation des taux des ARNm
- Au niveau post-traductionnelle par l'évaluation de l'expression protéique
- Au niveau de l'activité enzymatique des enzymes codées par les gènes cibles de PPAR $\alpha$ .

## 1.1 Effet préventif de l'huile d'Argan au niveau de PPAR $\alpha$ et de PGC-1 $\alpha$

### 1.1.1 Expression des ARNm codants pour PPAR $\alpha$ et PGC-1 $\alpha$

Les résultats de la qPCR, sur des ARN de foie de souris contrôles et traitées, ont montré (Figure 36) un effet négatif du LPS sur le taux d'expression relatif des ARNm de PPAR $\alpha$  et de PGC-1 $\alpha$  se traduisant par une diminution de presque 80% par rapport aux contrôles.

Le cotraitement par AO+LPS ou OO+LPS a permis le retour du taux d'expression des ARNm de PPAR $\alpha$  au même niveau que les contrôles. Cependant, si le cotraitement par AO+LPS à permis également un retour du taux d'expression relatif des ARNm de PGC-1 $\alpha$  au niveau de contrôle, le cotraitement par OO+LPS a montré uniquement une compensation partielle du taux d'expression des ARNm PGC-1 $\alpha$  par rapport au traitement par le LPS seul, et cette augmentation n'a pas permis le rétablissement de ce taux au niveau du contrôle.

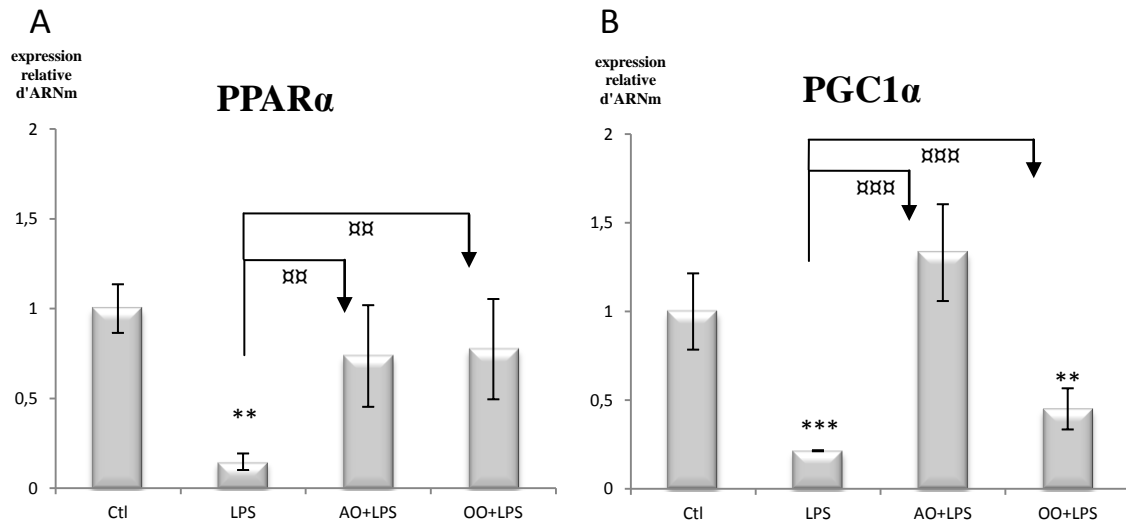


Figure 36 : Niveaux relatifs d'expression des ARNm de (A) PPAR $\alpha$  et (B) PGC-1 $\alpha$ , dans le foie des souris avec le traitement par les lipopolysaccharides, l'huile d'Argan et les lipopolysaccharides ou par l'huile d'Olive et les lipopolysaccharides.

Les ARNm ont été extraits à partir du foie de souris, puis analysés par RT-qPCR en utilisant des amorces spécifiques pour le PPAR $\alpha$  et pour le PGC-1 $\alpha$ . Les valeurs de Ct obtenues pour chaque gène après qPCR ont été normalisées par rapport au gène de référence 36B4, ensuite ces valeurs normalisées ont été rapportées à celle du contrôle pour obtenir le taux d'expression relatif pour chaque gène. La valeur représente la moyenne  $\pm$  SEM de 5 souris par traitement. \*\*\*P<0,001 ; \*\*P<0,01 ; ↔↔P<0,001 ; ↔↔P<0,01 représentent les probabilités de significativité statistique après comparaison par le test Student.

L'évaluation des taux d'expression relatifs des ARNm a montré la prévention de l'huile d'Argan et de l'huile d'Olive contre l'effet négatif du LPS sur le PPAR $\alpha$ . De plus, L'évaluation des taux d'expression relatifs des ARNm de PGC-1 $\alpha$  a montré que la prévention par l'huile d'Argan contre l'effet négatif du LPS est plus forte que celle de l'huile d'Olive.

Suite aux variations montrées par la qPCR des taux d'expression relatif des ARNm de PPAR $\alpha$  et de PGC-1 $\alpha$  dans le foie de souris, nous avons évalué leurs expressions relatives protéiques par la méthode de western-blot en utilisant des anticorps polyclonaux de PPAR $\alpha$  et de PGC-1 $\alpha$ .

### 1.1.2 Expression relative protéique de PPAR $\alpha$ et PGC-1 $\alpha$

Les résultats du western blot (Figure 37) ont montré que le traitement par LPS n'a pas d'effet sur l'expression relative protéique de PPAR $\alpha$  au niveau de foie de souris. Cependant, l'ajout de l'huile d'Argan ou l'huile d'Olive au LPS induit une augmentation de l'expression relative protéique de PPAR $\alpha$ .

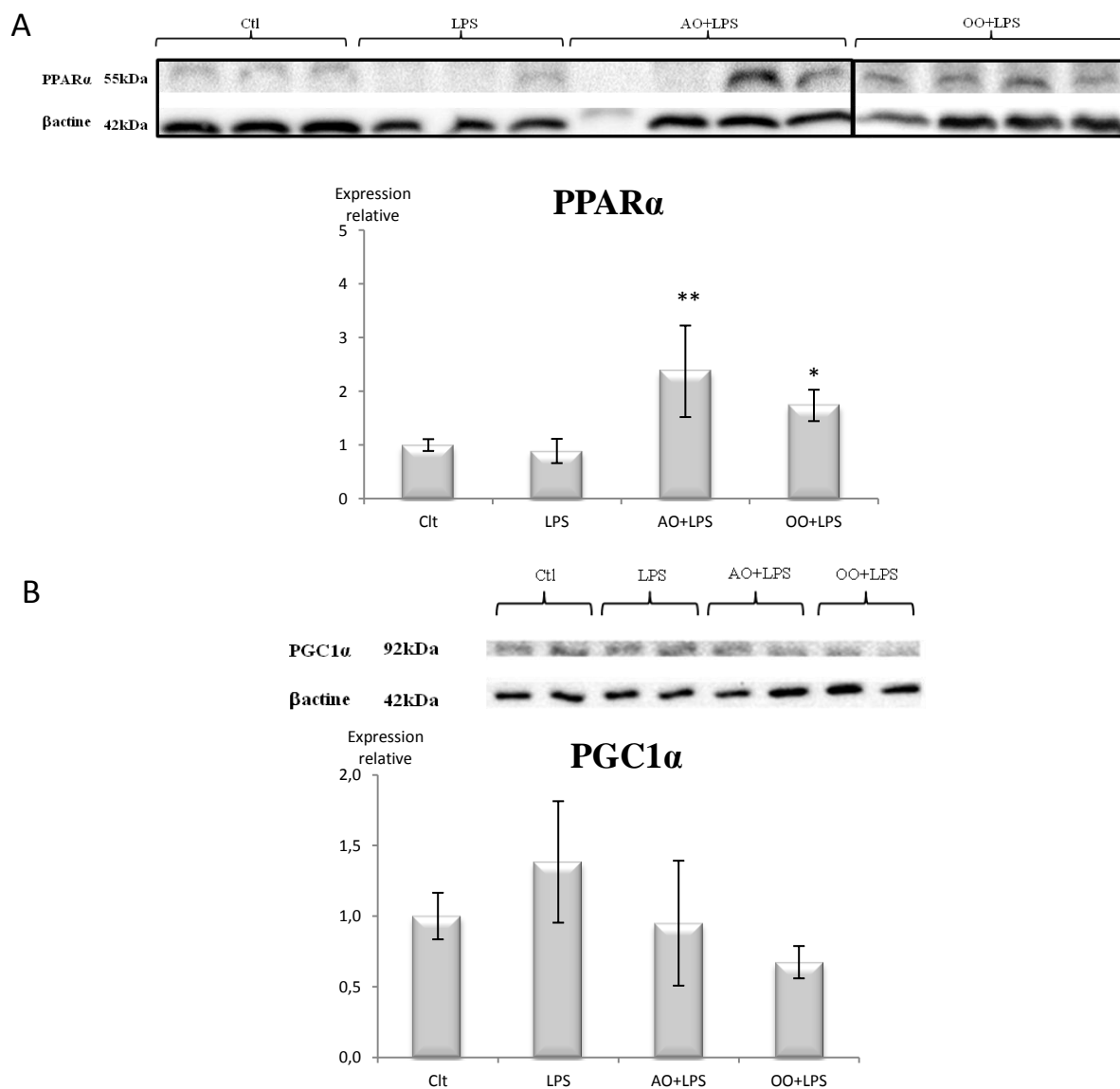


Figure 37 : Expression relative protéique de PPAR $\alpha$  (A) et PGC-1 $\alpha$  (B) dans le foie des souris avec le traitement par le lipopolysaccharide, l'huile d'Argan et le lipopolysaccharide ou par l'huile d'Olive et le lipopolysaccharide.

Les extraits des foies des souris ont été séparés par électrophorèse en gel de polyacrylamide en présence de SDS puis transférés sur une membrane PVDF et immunodécorsés avec l'anticorps anti-PPAR $\alpha$  ou l'anticorps anti-PGC-1 $\alpha$ . La membrane a été ensuite « strippée » par une solution acide et exposée à l'anticorps anti- $\beta$ -actine. La détection et la capture de chimiluminescence sont faites par un appareil ChemiDoc MP Imaging System (Bio Rad). Les histogrammes représentent l'analyse de la densité relative des bandes par rapport à celle de la  $\beta$ -actine faite par le logiciel Image Lab (Bio Rad). L'image A représente deux membranes d'une même expérience dans les mêmes conditions et au même temps. Les histogrammes représentent la moyenne  $\pm$  SEM pour au moins deux souris par traitement. \*\* $P < 0,01$  ; \* $P < 0,05$  représentent les probabilités de significativité statistique après comparaison par le test Student.

De plus, le traitement par LPS et le cotraitement par AO+LPS n'ont pas montré d'effet sur l'expression relative protéique de PGC-1 $\alpha$ . Cependant, le cotraitement par OO+LPS a montré une petite diminution non significative.

Les résultats de la qPCR montrent que le traitement par le lipopolysaccharide a un effet négatif sur le taux d'expression relatif des ARNm de PPAR $\alpha$  et de son coactivateur PGC-1 $\alpha$  au niveau hépatique des souris. Par contre aucun effet significatif n'est observé au niveau de l'expression relative protéique. Cependant, le co-traitement par l'huile d'Argan ou par l'huile d'Olive en présence de LPS révèle un effet préventif au niveau du taux d'expression relatif des ARNms de PPAR $\alpha$  et de PGC-1 $\alpha$ , et une induction de l'expression protéique de PPAR $\alpha$  seul.

Les variations entre les résultats de la qPCR et du western blot pourraient s'expliquer par une régulation post-transcriptionnelle de l'expression de PPAR $\alpha$  et de PGC-1 $\alpha$ . De plus, l'activation de PPAR $\alpha$  par un ligand et le recrutement du coactivateur PGC-1 $\alpha$  ne nécessitent pas forcément une augmentation des taux de leurs protéines. Dans ce sens, nous avons essayé donc d'évaluer l'expression des gènes cibles de PPAR $\alpha$ , qui sont impliqués dans les deux voies de la  $\beta$ -oxydation des acides gras au niveau peroxysomale et mitochondriale.

## 1.2 Effet préventif de l'huile d'Argan sur la $\beta$ -oxydation des acides gras

La  $\beta$ -oxydation est la voie de la dégradation des acides gras au niveau de la mitochondrie ou au niveau du peroxysome. Le mécanisme de la  $\beta$ -oxydation dans les mitochondries et dans les peroxysomes est identique et comporte un ensemble de quatre réactions consécutives : (1) la déshydrogénation, (2) l'hydratation (de la double liaison); (3) la déshydrogénation à nouveau, et (4) le clivage thiolitique (Wanders, 2004).

### 1.2.1 Au niveau peroxysomale

Les quatre réactions de la  $\beta$ -oxydation peroxysomale sont catalysées par trois enzymes : (1) l'acyl-CoA oxydase (déshydrogénation), (2) l'enzyme bifonctionnelle (hydratation de la double liaison et déshydrogénation à nouveau) et (3) la  $\beta$ -cétotiolase (clivage thiolitique) (Wanders et Waterham, 2006).

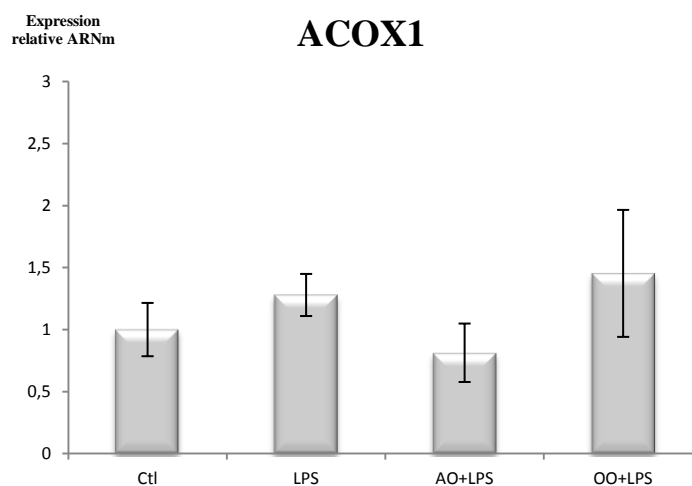
#### a. Expression des ARNm codants pour ACOX1

L'acyl-CoA oxydase1 (ACOX1) est l'enzyme clé de la voie de la  $\beta$ -oxydation peroxysomale. Il catalyse la première réaction dans le cycle de la  $\beta$ -oxydation peroxysomale,



qui est considérée être la principale étape enzymatique qui contrôle le flux des acides gras à travers cette voie (Poirier et al., 2006). De plus, l'ACOX1 est codée par un gène cible directe de facteur de transcription PPAR $\alpha$  (Pyper et al., 2010).

L'évaluation du taux d'expression relatif des ARNm de l'ACOX1 (Figure 38), n'a pas montré d'effet avec les différents traitements au niveau de foie de souris par rapport aux souris contrôles.



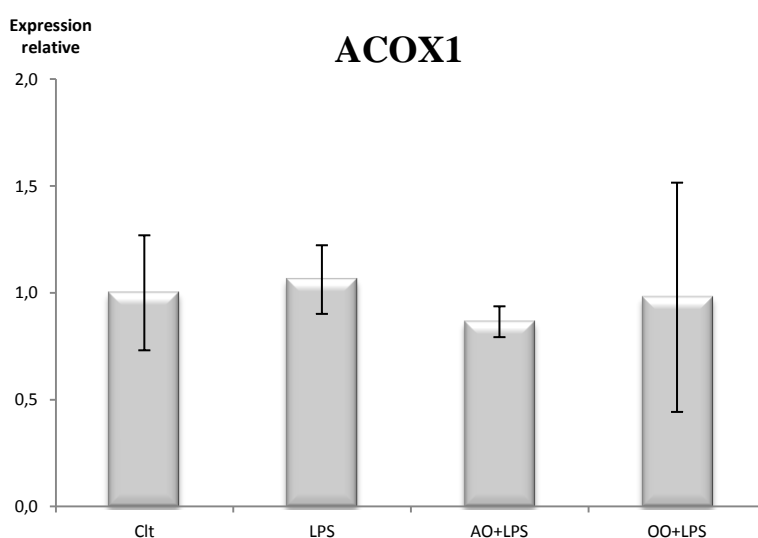
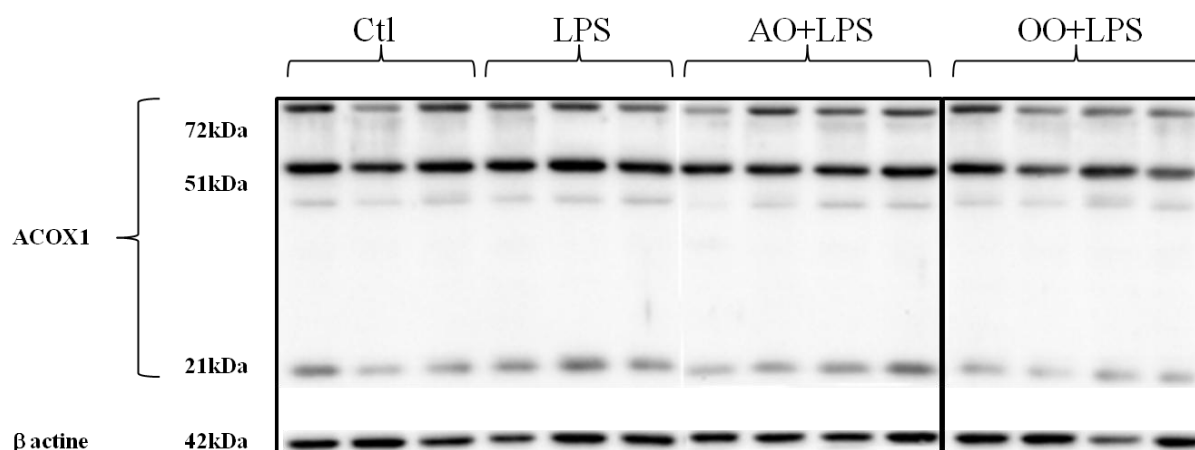
*Figure 38 : Niveaux relatifs d'expression des ARNm de l'ACOX1, dans le foie des souris avec le traitement par le lipopolysaccharide, l'huile d'Argan et le lipopolysaccharide ou par l'huile d'Olive et le lipopolysaccharide.*

Les ARNm ont été extraits à partir du foie puis analysés par RT-qPCR en utilisant des amorces spécifiques pour l'ACOX1. Les valeurs de Ct obtenues pour chaque gène après qPCR ont été normalisées par rapport au gène de référence 36B4, ensuite ces valeurs normalisées ont été rapportées à celle du contrôle pour obtenir le taux d'expression relatif pour chaque gène. La valeur représente la moyenne  $\pm$  SEM de 5 souris par traitement.

#### b. Expression protéique de l'ACOX1

L'ACOX1 est une protéine dimérique de 140 kDa composée de deux sous unités de 72 kDa (polypeptide A), qui peut être clivée dans la matrice peroxysomale par une protéase en deux polypeptides de 51 (polypeptide B) et 21 kDa (polypeptide C) (Hashimoto, 1999).

Les images des membranes montrent que les extraits de foie de souris révèlent trois bandes 21, 51 et 72 kDa caractéristiques de l'ACOX1. Ces bandes correspondent aux trois polypeptides de l'ACOX1. L'analyse des images de western blot (Figure 39) a montré que le traitement par LPS et le cotraitement par AO+LPS ou OO+LPS n'ont pas d'effet sur l'expression relative protéique de l'ACOX1 au niveau du foie des souris.



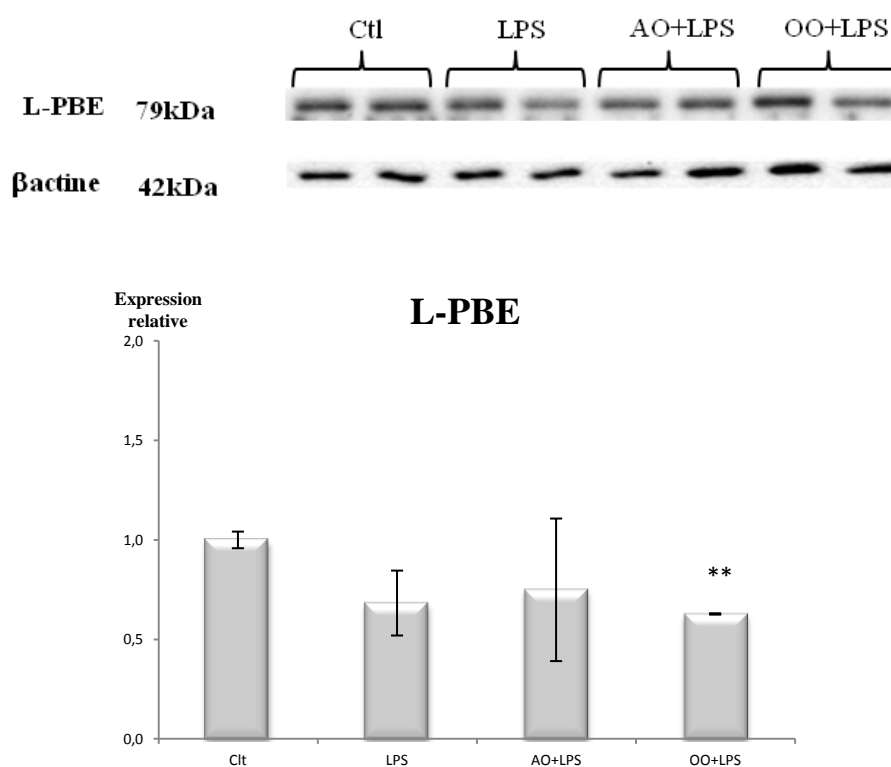
*Figure 39 : Expression relative protéique de l'ACOX1 dans le foie des souris avec le traitement par le lipopolysaccharide, l'huile d'Argan et le lipopolysaccharide ou par l'huile d'Olive et le lipopolysaccharide.*

La protéine ACOX1 est caractérisée par 3 bandes à 21,51 et 72kDa. Les extraits des foies des souris ont été séparés par électrophorèse en gel de polyacrylamide en présence de SDS puis transférés sur une membrane de PVDF et immunodéTECTÉS avec l'anticorps anti-ACOX1. La membrane a été ensuite strippée par une solution acide et exposée à l'anticorps anti- $\beta$ -actine. La détection et la capture de chimiluminescence sont faites par un appareil ChemiDoc MP Imaging System (Bio Rad). L'histogramme représente l'analyse de la densité relative des bandes par rapport à celle de la  $\beta$ -actine faite par le logiciel Image Lab (Bio Rad). L'image représente deux membranes d'une même expérience dans les mêmes conditions et au même temps. L'histogramme représente la moyenne  $\pm$  SEM pour au moins trois souris par traitement.

### c. Expression protéique de L-PBE

L'enzyme bifonctionnelle L-PBE est une protéine monomérique de 79kDa. Elle catalyse à la fois les étapes 2 et 3 (l'hydratation et déshydrogénation) de la voie de la  $\beta$ -oxydation peroxysomale (Poirier et al., 2006).

L'analyse de l'image de la membrane du western blot (Figure 40), a montré une diminution non significative de l'expression relative protéique de L-PBE avec le traitement par LPS et avec le cotraitement par AO+LPS. Cependant le cotraitement par OO+LPS induit une diminution significative de l'expression relative protéique de L-PBE au niveau hépatique chez la souris.



*Figure 40 : Expression relative protéique de L-PBE dans le foie des souris avec le traitement par le lipopolysaccharide, l'huile d'Argan et le lipopolysaccharide ou par l'huile d'Olive et le lipopolysaccharide.*

Les extraits des foies des souris ont été séparés par électrophorèse en gel de polyacrylamide en présence de SDS puis transférés sur une membrane de PVDF et immunodétectés avec l'anticorps anti-ACOX1. La membrane a été ensuite strippée par une solution acide et exposée à l'anticorps anti- $\beta$ -actine. La détection et la capture de chimiluminescence sont faites par un appareil ChemiDoc MP Imaging System (Bio Rad). L'histogramme représente l'analyse de la densité relative des bandes par rapport à celle de la  $\beta$ -actine faite par le logiciel Image Lab (Bio Rad). Chaque histogramme représente la moyenne  $\pm$  SEM pour au moins trois souris par traitement. \*\* $P < 0,01$  représentent les probabilités de significativité statistique après comparaison par le test Student

#### d. Activité enzymatique de l'ACOX1

Pour confirmer les résultats de la qPCR et du western blot nous avons mesuré l'activité enzymatique de l'ACOX1 par la méthode fluorimétrique (voir partie matériels et méthodes).

Les résultats (Figure 41) ont montrés que le traitement par LPS a un effet négatif sur l'activité enzymatique de l'ACOX1 dans le foie des souris avec une diminution de 40% de cette activité. Cet effet est contré par l'huile d'Argan ou par l'huile d'Olive dans le cotraitement avec du LPS.

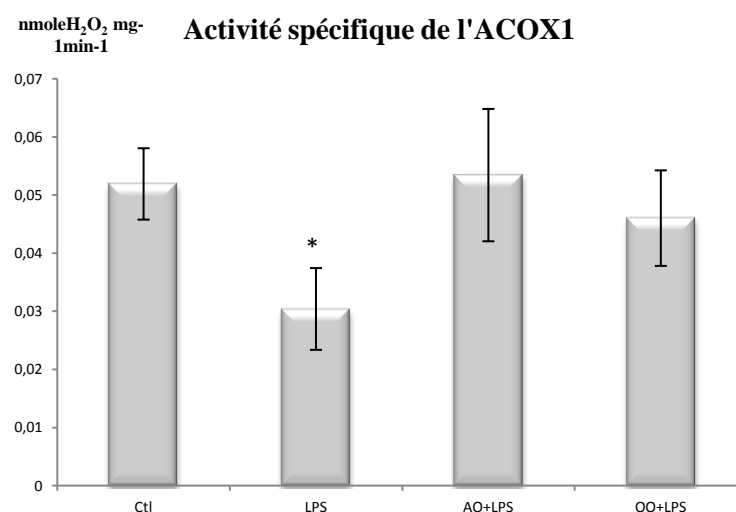


Figure 41 : L'activité enzymatique de l'ACOX1 dans le foie des souris avec le traitement par le lipopolysaccharide, l'huile d'Argan et le lipopolysaccharide ou par l'huile d'Olive et le lipopolysaccharide.

La mesure de l'activité enzymatique de l'ACOX1 dans le foie des souris a été réalisée par la méthode fluorimétrique en mesurant la fluorescence émise à 420 nm du produit de peroxydation de l'acide homovanillique par la peroxydase qui utilise l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> produite par l'ACOX1 en présence de palmitoyl-CoA comme substrat. La réaction est déclenchée par l'addition de l'extrait de foie dans le milieu réactionnel et le temps de lecture est de 30 min. Chaque histogramme représente la moyenne  $\pm$  SEM de 5 souris par traitement. \*P<0,05 représentent les probabilités de significativité statistique après comparaison par le test Student.

Les résultats de la mesure de l'activité enzymatique de l'ACOX1, ont montré l'effet préventif de l'huile d'Argan et de l'huile d'Olive contre le LPS au niveau hépatiques chez la souri.

#### e. Activité enzymatique de la catalase

La catalase est une enzyme qui joue un rôle important de protection contre les effets toxiques des peroxydes générés dans la cellule en général et dans les peroxysomes en

particulier par les oxydases. Elle possède une grande efficacité catalytique pour la dégradation de  $H_2O_2$  (Schrader et Fahimi, 2006).

Les résultats de la mesure de l'activité enzymatique ont montré (Figure 42) que le traitement par LPS et le cotraitement par l'huile d'Olive et le LPS induisent une augmentation significative de 25% de l'activité de la catalase. Cependant le cotraitement avec l'huile d'Argan et le LPS induit une augmentation qui n'est pas significative à cause des variations interindividuelles.

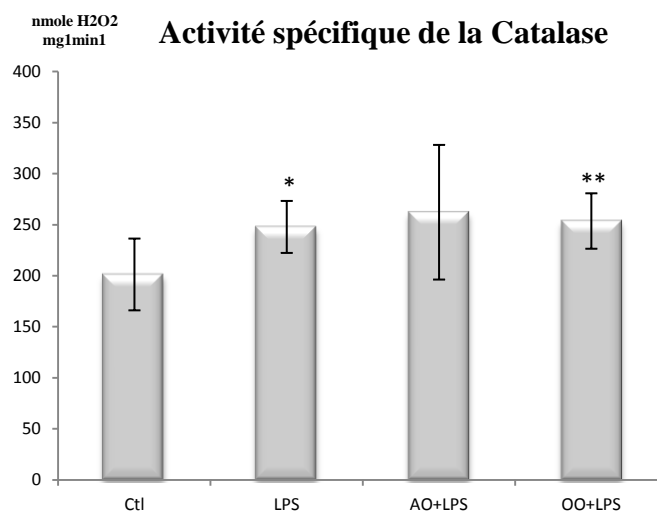


Figure 42 : L'activité enzymatique de la catalase dans le foie des souris avec le traitement par le lipopolysaccharide, l'huile d'Argan et le lipopolysaccharide ou par l'huile d'Olive et le lipopolysaccharide.

La mesure de l'activité enzymatique de la catalase dans le foie des souris a été réalisée par la méthode spectrophotométrique en mesurant la disparition à 240 nm de  $H_2O_2$  durant une minute. La réaction est déclenchée par l'addition de peroxyde d'hydrogène dans le milieu réactionnel. Chaque histogramme représente la moyenne  $\pm$  SEM de 5 souris par traitement. \* $P < 0,05$ , \*\* $P < 0,01$  représentent les probabilités de significativité statistique après comparaison par le test Student.

### 1.2.2 Au niveau mitochondriale

La première étape de la  $\beta$ -oxydation mitochondriale est catalysée par une famille d'acyl-CoA déshydrogénase selon la longueur d'acide gras à chaîne linéaire (ACADS, ACADM, ACADL, ACADVL) (Hashimoto, 1999). Les étapes 2, 3 et 4 de la voie de  $\beta$ -oxydation mitochondriale sont catalysées par une seule protéine hétérotrimériques (Reddy et Rao, 2006)

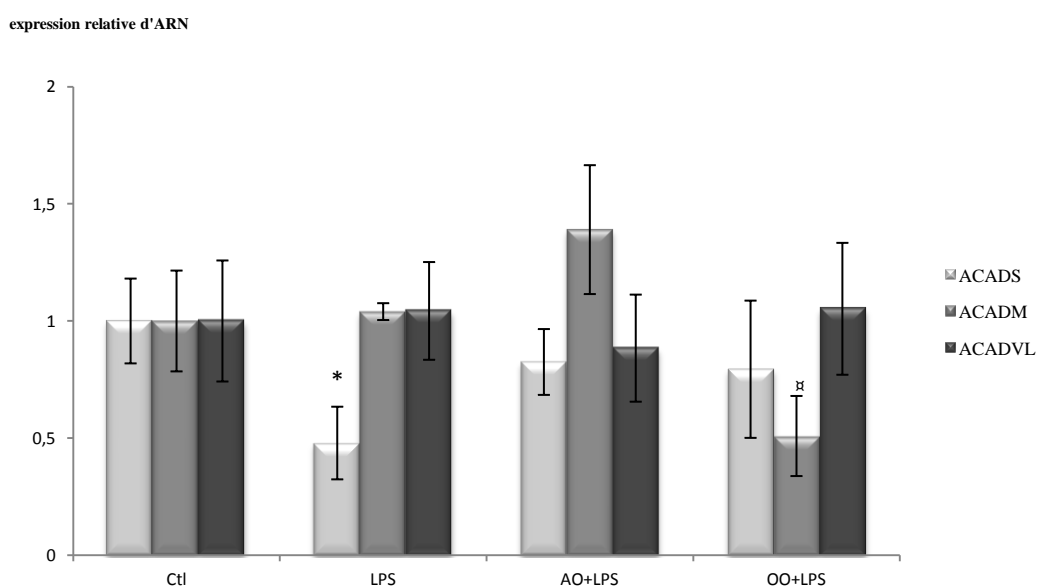
#### a. Expression des ARNm codants pour les enzymes ACADs

Nous avons évalué les taux d'expression relatifs des ARNm d'acyl-CoA déshydrogénases des acides gras à courte chaîne (ACADS) à moyenne chaîne (ACADM) et à très longue chaîne (ACADVL) avec les différents traitements.

L'évaluation des niveaux relatifs d'expression des ARNm codant pour les enzymes de la voie de  $\beta$ -oxydation mitochondriale a montré (Figure 43):

- Un effet négatif du LPS sur le taux d'expression relatif des ARNm de l'ACADS contré par le cotraitement avec huile d'Argan et LPS ou avec l'huile d'Olive.
- Le taux d'expression relatif des ARNm codant pour l'ACADM n'est pas influencé par le traitement par LPS, augmente non significativement avec le cotraitement par l'huile d'Argan et LPS et diminue en cotraitant avec l'huile d'Olive et le LPS
- Le taux d'expression relatif des ARNm codants pour ACADVL n'est pas influencé par ces différents traitements

Ces résultats montrent un effet spécifique négatif du LPS sur le niveau d'expression des ARNm codant l'ACADS mitochondriale.

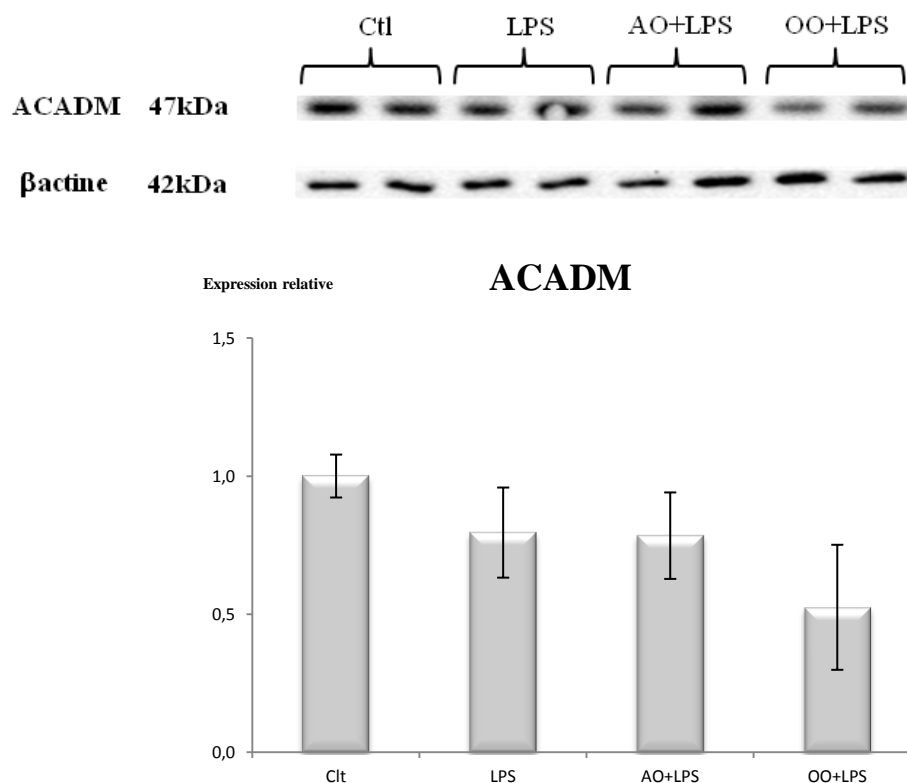


*Figure 43 : Niveaux relatifs d'expression des ARNm des ACADs, dans le foie des souris avec le traitement par le lipopolysaccharide, l'huile d'Argan et le lipopolysaccharide ou par l'huile d'Olive et le lipopolysaccharide.*

Les ARNm ont été extraits à partir du foie puis analysés par RT-qPCR en utilisant des amorces spécifiques pour l'ACADS, l'ACADM et l'ACADVL. Les valeurs de Ct obtenues pour chaque gène après qPCR ont été normalisées par rapport au gène de référence 36B4, ensuite ces valeurs normalisées ont été rapportées à celle du contrôle pour obtenir le taux d'expression relatif pour chaque gène. La valeur représente la moyenne  $\pm$  SEM de 5 souris par traitement. \*P<0.05,  $\square$  P<0,05 représentent les probabilités de significativité statistique après comparaison par le test Student.

### b. Expression relative protéique de l'ACADM

Les résultats de western-blot (Figure 44) n'ont pas montré de changement d'expression protéique de l'ACADM dans le tissu hépatique de souris avec le traitement en LPS et en l'huile d'Argan et LPS. Cependant l'analyse a révélé une diminution de l'expression relative protéique de l'ACADM avec le cotraitement par l'huile d'Olive et LPS, mais n'est significative à cause des variations interindividuelles.



*Figure 44 : Expression relative protéique de l'ACADM au niveau de tissu de foie des souris avec le traitement par le lipopolysaccharide, l'huile d'Argan et le lipopolysaccharide ou par l'huile d'Olive et le lipopolysaccharide.*

Les extraits des foies des souris ont été séparés par électrophorèse en gel de polyacrylamide en présence de SDS puis transférés sur une membrane de PVDF et immunodétectés avec l'anticorps anti-ACADM. La membrane a été ensuite strippée par une solution acide et exposée à l'anticorps anti- $\beta$ -actine. La détection et la capture de chimiluminescence sont faites par un appareil ChemiDoc MP Imaging System (Bio Rad). L'histogramme représente l'analyse de la densité relative des bandes par rapport à celle de la  $\beta$ -actine faite par le logiciel Image Lab (Bio Rad). Chaque histogramme représente la moyenne  $\pm$  SEM pour deux souris par traitement.

c. Activité des enzymes de la  $\beta$ -oxydation mitochondriale

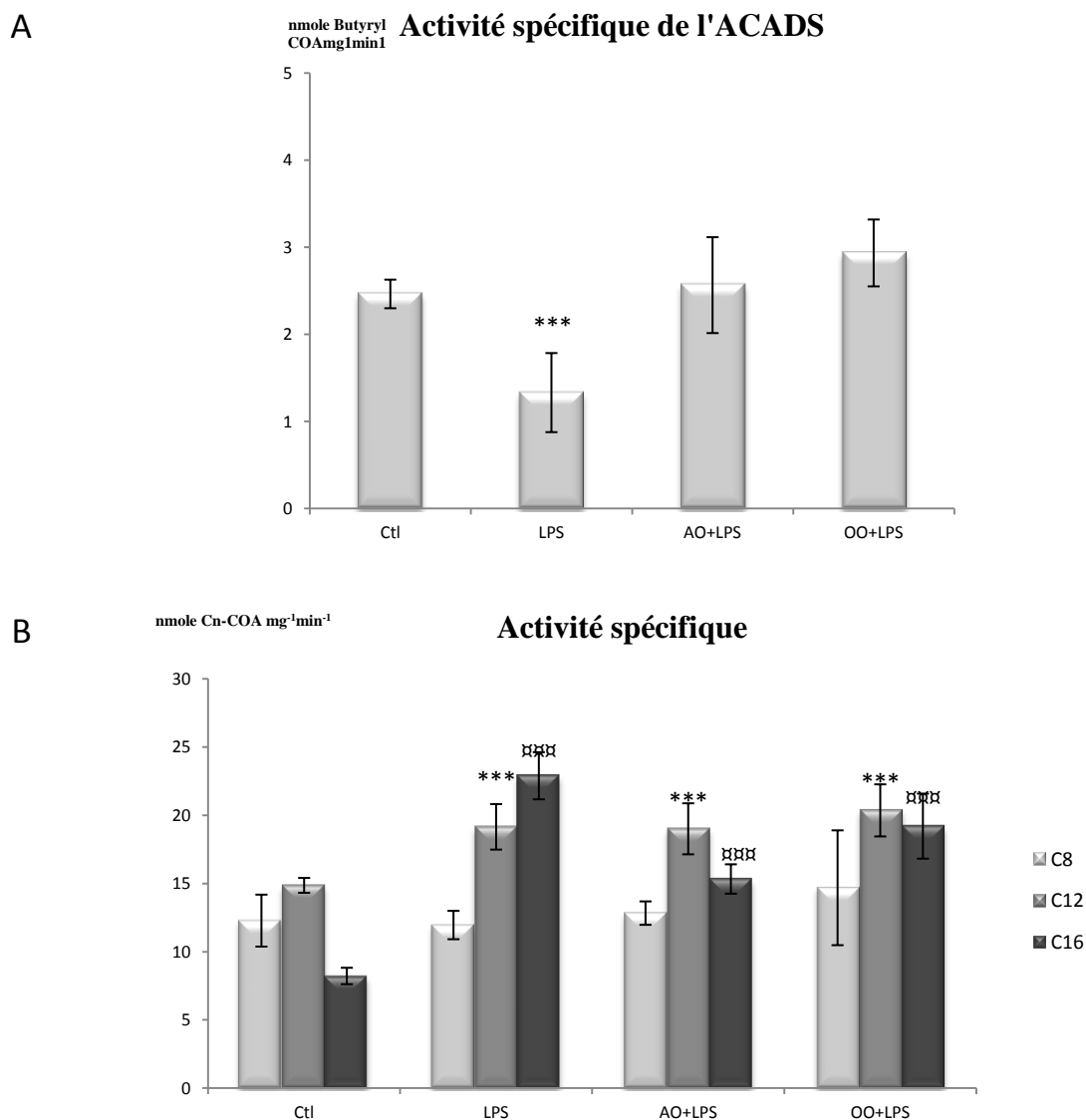
La mesure de l'activité enzymatique des ACADs a été réalisée par spectrophotométrie à 600 nm en utilisant quatre dérivés ester-CoAs d'acide gras de différentes longueurs de chaîne :

Butyryl-CoA (C4) pour l'ACADS, Octanoyl-CoA (C8), Lauroyl-CoA (C12), Palmitoyl-CoA (C16).

Les mesures de l'activité enzymatique ont montré (Figure 45) :

- Un effet négatif du LPS par une diminution de 40% de l'activité enzymatique de l'ACADS au niveau de tissu hépatique des souris, cet effet est contré par l'huile d'Argan et l'huile d'Olive.
- Une augmentation significative des activités spécifiques pour Lauroyl-CoA (C12), Palmitoyl-CoA (C16) avec les différents traitements.
- Une absence d'effet des différents traitements sur l'activité spécifique pour Octanoyl-CoA (C8).





*Figure 45 : Activité enzymatique de l'ACADS (A) et activité spécifique des substrats C8, C12, C16 (B) au niveau de tissu de foie des souris avec le traitement par le lipopolysaccharide, l'huile d'Argan et le lipopolysaccharide ou par l'huile d'Olive et le lipopolysaccharide.*

La mesure de l'activité enzymatique des ACADS dans le foie des souris a été réalisée par la méthode spectrophotométrique en utilisant quatre dérivés ester-CoAs d'acide gras de différentes longueurs de chaîne : Butyryl-CoA (C4) pour mesurer l'activité de l'ACADS, Octanoyl-CoA (C8), Lauroyl-CoA (C12) et Palmitoyl-CoA (C16). Les histogrammes représentent la moyenne  $\pm$  SEM de 5 souris par traitement. \*\*\* $P < 0,001$ , \*\*\*\*  $P < 0,001$  représentent les probabilités de significativité statistique après comparaison par le test Student.

L'ensemble de nos résultats sur l'effet préventif de l'huile d'Argan contre le LPS peut être résumé comme suit :

Les résultats de la qPCR ont montré :

- Un effet négatif du LPS sur le taux d'expression relatif des ARNm du PPAR $\alpha$ , du PGC-1 $\alpha$  et les enzymes de la  $\beta$ -oxydation peroxysomale ACOX1 et mitochondriale ACADS. De plus, le traitement par LPS a montré une induction du taux d'expression relatif des ARNm de la catalase. Ainsi qu'une absence d'effet sur le taux des ARNms ACADM et ACADVL.
- Un effet préventif de l'huile d'Argan et de l'huile d'Olive contre l'effet négatif du LPS sur le taux d'expression relatif des ARNm du PPAR $\alpha$ , du PGC-1 $\alpha$  et les ARNms codant les enzymes de la  $\beta$ -oxydation respectivement l'ACOX1 peroxysomale et l'ACADS mitochondriale.

Les résultats de western blot ont montré :

- Absence d'effet du LPS sur l'expression protéique du PPAR $\alpha$ , du PGC-1 $\alpha$ , de l'ACOX1.
- Une induction de l'expression protéique du PPAR $\alpha$  avec les cotraitements par l'huile d'Argan et LPS et par l'huile d'Olive et LPS.
- Une diminution non significative de l'expression relative protéique de L-PBE et de l'ACADM avec le traitement par LPS.
- Une diminution non significative de l'expression protéique de L-PBE et de l'ACADM avec les cotraitements par l'huile d'Argan et LPS et par l'huile d'Olive et LPS.

Les résultats de la mesure de l'activité enzymatique ont montré :

- Un effet négatif du LPS sur l'activité enzymatique de l'ACOX1 et de l'ACADS.
- Un effet préventif de l'huile d'Argan et de l'huile d'Olive contre l'effet négatif du LPS sur les activités enzymatiques de l'ACOX1 et de l'ACADS.
- Une augmentation significative de l'activité enzymatique de la catalase et les activités spécifiques pour Lauroyl-CoA (C12), Palmitoyl-CoA (C16) avec les différents traitements.

Les résultats de la qPCR, du western blot et de la mesure de l'activité enzymatique ont montré que l'huile d'Argan a un potentiel préventif contre l'effet négatif du LPS sur le métabolisme des acides gras aussi bien au niveau de la transcription qu'au niveau de la  $\beta$ -oxydation mitochondriale et peroxysomale.

Autant que ligands du facteur de transcription HNF4 $\alpha$  (Chamouton et Latruffe, 2012), les acides gras jouent un rôle important dans la régulation du métabolisme du glucose au niveau hépatique (Jump, 2011). Le glucose est produit principalement au niveau du foie notamment par la voie de la néoglucogenèse (Puigserver et Spiegelman, 2003). Cette voie est contrôlée par le coactivateur PGC-1 $\alpha$ , qui est en coopération avec le facteur de transcription HNF4 $\alpha$  régule l'expression des enzymes clés de la néoglucogenèse telles que la phosphoénolpyruvate carboxykinase (PEPCK), le fructose-1,6-bisphosphatase, et le glucose-6-phosphatase (Yoon et al., 2001).

Cependant, une étude récente a montré que l'inflammation provoquée par le LPS induit une diminution de la néoglucogenèse par une inhibition de la transcription de PEPCK dans le tissu hépatique des souris (Feingold et al., 2012).

Pour caractériser l'effet préventif de l'huile d'Argan dans la néoglucogenèse, nous avons évalué au niveau transcriptionnel les variations du facteur de transcription HNF4 $\alpha$  et les enzymes clés de la néoglucogenèse, avec le traitement par le LPS seul et le cotraitement par l'huile d'Argan et le LPS ou l'huile d'Olive et le LPS, dans le tissu hépatique des souris.

## 2. La néoglucogenèse

### 2.1 Expression des ARNm codants pour HNF4 $\alpha$

L'évaluation du taux d'expression relatif des ARNm de facteur de transcription HNF4 $\alpha$  par qPCR (Figure 46) a montré, une diminution significative en cotraitant par l'huile d'Olive et LPS et une absence d'effet avec les autres traitements.

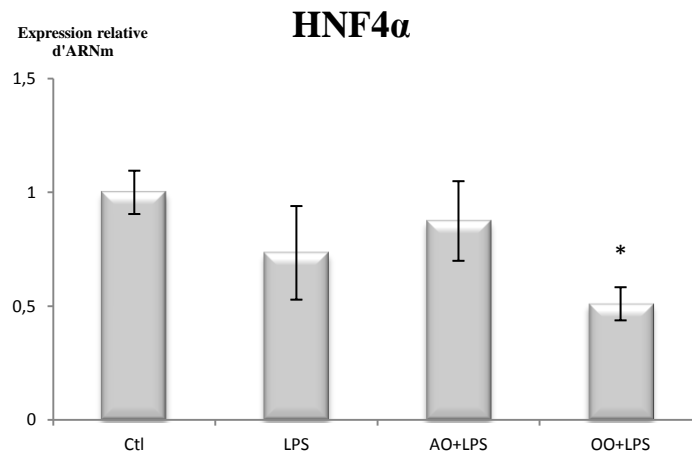


Figure 46 : Niveaux relatifs d'expression des ARNm de l'HNF4 $\alpha$ , dans le foie des souris avec le traitement par le lipopolysaccharide, l'huile d'Argan et le lipopolysaccharide ou par l'huile d'Olive et le lipopolysaccharide.

Les ARNm ont été extraits à partir du foie puis analysés par RT-qPCR en utilisant des amorces spécifiques pour l'HNF-4 $\alpha$ . Les valeurs de Ct obtenues pour chaque gène après qPCR ont été normalisées par rapport au gène de référence 36B4, ensuite ces valeurs normalisées ont été rapportées à celle du contrôle pour obtenir le taux d'expression relatif pour chaque gène. La valeur représente la moyenne  $\pm$  SEM de 5 souris par traitement. \*P<0,05 représentent les probabilités de significativité statistique après comparaison par le test Student.

## 2.2 Expression relative protéique de HNF4 $\alpha$

Les résultats de western blot de l'expression relative protéique de HNF4 $\alpha$  (Figure 47) ont montré une augmentation avec le traitement par le LPS au niveau hépatique, et revient au contrôle en cotraitant par l'huile d'Argan et LPS et par l'huile d'Olive et LPS.

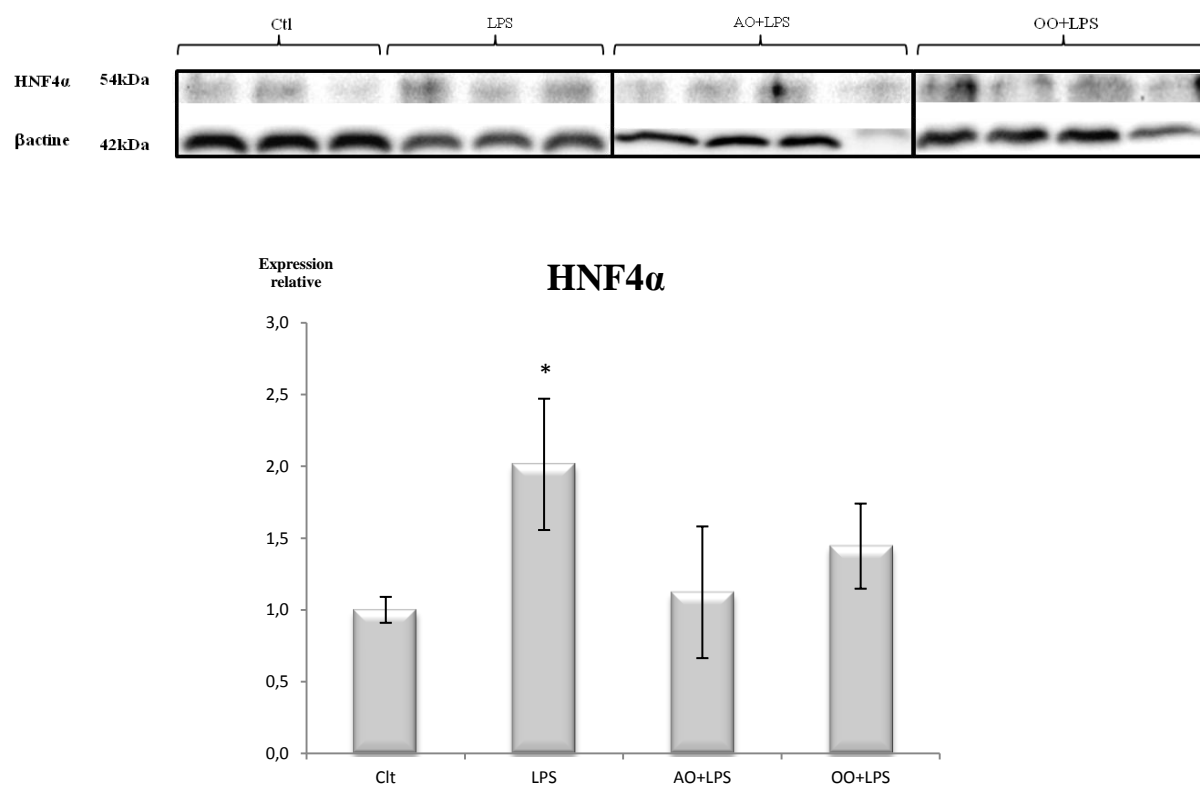


Figure 47 : Expression relative protéique de l'HNF4α dans le foie des souris avec le traitement par le lipopolysaccharide, l'huile d'Argan et le lipopolysaccharide ou par l'huile d'Olive et le lipopolysaccharide.

Les extraits des foies des souris ont été séparés par électrophorèse en gel de polyacrylamide en présence de SDS puis transférés sur une membrane de PVDF et immunodétectés avec l'anticorps anti-HNF4α. La membrane a été ensuite strippée par une solution acide et exposée à l'anticorps anti-β-actine. La détection et la capture de chimiluminescence sont faites par un appareil ChemiDoc MP Imaging System (Bio Rad). L'histogramme représente l'analyse de la densité relative des bandes par rapport à celle de la β-actine faite par le logiciel Image Lab (Bio Rad). L'image représente deux membranes d'une même expérience dans les mêmes conditions et au même temps. Chaque histogramme représente la moyenne ± SEM pour deux souris par traitement. \*P<0,05 représentent les probabilités de significativité statistique après comparaison par le test Student.

### 2.3 Expression des ARNm codants pour PEPCK, G6PH et Glut4

Les résultats de la qPCR (Figure 48) ont montré, un effet négatif de LPS sur le taux d'expression relatif des ARNm des enzymes clés de la néoglucogenèse, PEPCK et G6PH, et de transporteur membranaire de glucose Glut4, par une diminution de 80%. Cet effet est contré par l'huile d'Argan et l'huile d'Olive pour la PEPCK et la G6PH où le taux d'expression relatif des ARNm revient au niveau du contrôle. Une prévention moins importante pour le taux d'expression relatif des ARNm de Glut4 a été observée en traitant par l'huile d'Argan ainsi qu'une absence de prévention par l'huile d'Olive.

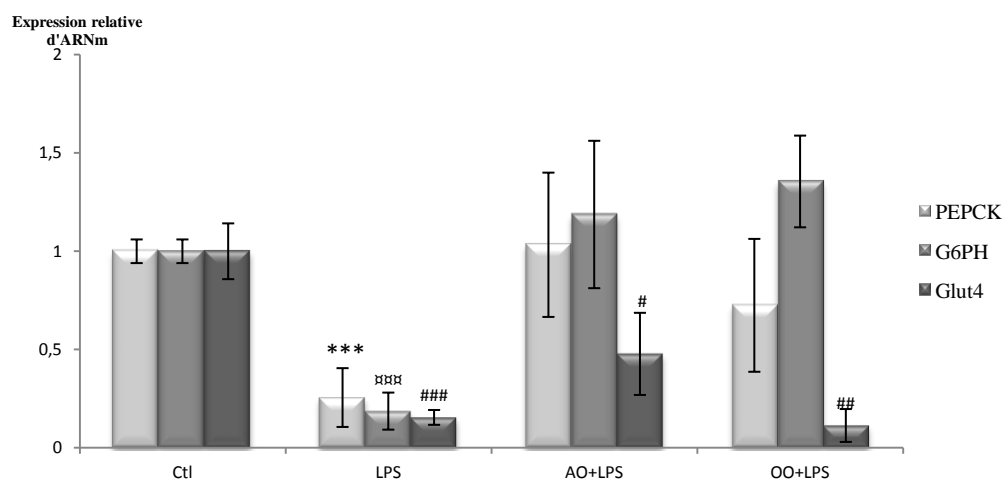


Figure 48 : Niveaux relatifs d'expression des ARNm de PEPCK, G6PH et Glut4, dans le foie des souris avec le traitement par le lipopolysaccharide, l'huile d'Argan et le lipopolysaccharide ou par l'huile d'Olive et le lipopolysaccharide.

Les ARNm ont été extraits à partir du foie puis analysés par RT-qPCR en utilisant des amorces spécifiques pour PEPCK, G6PH et Glut4. Les valeurs de Ct obtenues pour chaque gène après qPCR ont été normalisées par rapport au gène de référence 36B4, ensuite ces valeurs normalisées ont été rapportées à celle du contrôle pour obtenir le taux d'expression relatif pour chaque gène. La valeur représente la moyenne  $\pm$  SEM de 5 souris par traitement. \*\*\* $P < 0,001$  ; ### $P < 0,001$  ; ### $P < 0,001$  ## $P < 0,01$  # $P < 0,05$  représentent les probabilités de significativité statistique après comparaison par le test Student.

L'ensemble de nos résultats, sur l'effet préventif de l'huile d'Argan contre les perturbations métaboliques provoquées par le traitement aux LPS, montre ici que les LPS perturbe également la néoglucogenèse hépatique chez la souris. En effet, même si les LPS induisent l'expression d'HNF4 $\alpha$  au niveau protéique, nous observons plutôt une forte diminution des ARNm de ses gènes cibles à savoir PEPCK, G6PH et Glut4. Cette diminution refléterait une diminution de la néoglucogenèse hépatique sous l'effet du LPS. Le niveau d'expression d'HNF4 $\alpha$  retourne à la normale en présence de l'huile d'Argan ou de l'huile d'olive. Cependant, si les niveaux d'expression des ARNms codant la PEPCK et la G6PH reviennent quasiment à la normale, celui des ARNm codant Glut4 est rétabli partiellement par l'huile d'Argan et absolument pas du tout par l'huile d'olive. Ces résultats montrent que le LPS réduit la synthèse et le transport du glucose au niveau hépatique et que l'huile d'Argan est capable de restaurer cette synthèse et partiellement le transport. Alors que l'huile d'olive permettrait uniquement la restauration de la synthèse du glucose sans rétablir le transport du glucose par le Glut4.

Les résultats du chapitre dernier ont montré l'effet positif de l'huile d'Argan sur l'activation du PPAR $\alpha$ . De plus, les résultats de la première partie de ce chapitre ont montré l'effet préventif de l'huile d'Argan contre l'effet négatif du LPS sur le taux d'expression relatif d'ARNm du PPAR $\alpha$ . Cependant les études montrent que le facteur de transcription PPAR $\alpha$  inhibe la voie de signalisation du facteur nucléaire NF- $\kappa$ b par l'induction du facteur inhibiteur I $\kappa$ B $\alpha$ , ce qui diminue l'expression des gènes de diverses cytokines pro-inflammatoires (Kono et al., 2009). Par conséquent il est susceptible d'élucider un effet anti-inflammatoire de l'huile d'Argan.

### 3. L'inflammation

L'inflammation est une réponse de l'organisme à une infection ou une blessure. Ces réponses inflammatoires sont contrôlées pour éviter des dommages excessifs à l'organisme.

Les lipopolysaccharides sont des inducteurs exogènes de l'inflammation. Ce sont des composants de la paroi cellulaire des bactéries gram-négatives, qui peuvent activer la voie de signalisation du facteur nucléaire NF- $\kappa$ b et la sécrétion des cytokines telles que le facteur de nécrose tumorale  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) et l'interleukine 6 (IL-6) (Calder, 2006).

Cependant, Des études récentes ont montré que les acides gras à courte chaîne modulent la production des médiateurs inflammatoires, notamment le butyrate, qui supprime la production des cytokines pro-inflammatoires TNF- $\alpha$  et IL-6 stimulée par les LPS. De plus, le butyrate augmente le taux de cytokine anti-inflammatoire IL-10 (Vinolo et al., 2011). Toutefois, ce dernier effet n'a pas été rapporté dans d'autres études. Par exemple, Cox et al. ont constaté une atténuation, plutôt qu'une augmentation, de la production de l'IL-10 par les monocytes traités avec les acides gras à courte chaîne (Cox et al., 2009).

Pour évaluer l'effet anti-inflammatoire de l'huile d'Argan dans le tissu hépatique des souris, nous avons estimé les taux d'expression relatifs des ARNm des biomarqueurs pro et anti-inflammatoire, avec le traitement par le LPS seul et le cotraitement par l'huile d'Argan et le LPS ou l'huile d'Olive et le LPS.

### 3.1 Expression des ARNm codants pour des cytokines pro-inflammatoires : IL6 et TNF $\alpha$

L'évaluation du taux d'expression relatif des ARNm des cytokines pro-inflammatoires par qPCR (Figure 49) a montré, que l'huile d'Argan seule ou l'huile d'Olive seule diminue l'expression relative de l'IL6 et de TNF $\alpha$  de 70% au niveau de foie de souris.

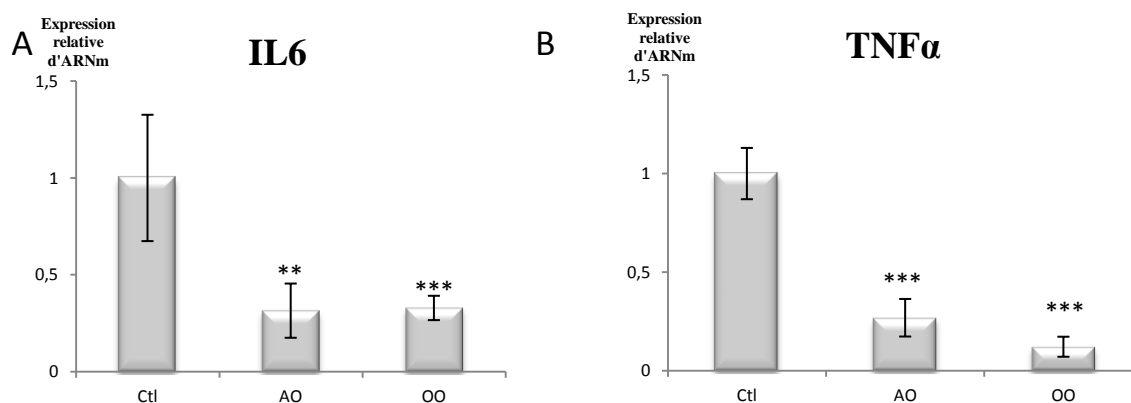


Figure 49 : Effet de l'huile d'Argan ou de l'huile d'Olive sur l'expression relative protéique de l'IL6 (A) et la TNF $\alpha$  (B) dans le foie des souris.

Les ARNm ont été extraits à partir du foie puis analysés par RT-qPCR en utilisant des amorces spécifiques pour IL6 et TNF $\alpha$ . Les valeurs de Ct obtenues pour chaque gène après qPCR ont été normalisées par rapport au gène de référence 36B4, ensuite ces valeurs normalisées ont été rapportées à celle du contrôle pour obtenir le taux d'expression relatif pour chaque gène. Chaque histogramme représente la moyenne  $\pm$  SEM de 5 souris par traitement. \*\* P<0,01, \*\*\*P<0,001représentent les probabilités de significativité statistique après comparaison par le test Student.

L'évaluation du taux d'expression relatif des ARNm de l'IL6 et de la TNF $\alpha$  (Figure 50) a montré que le traitement par LPS induit de 2 fois les ARNm du TNF $\alpha$  et de 17 fois ceux de l'IL6. Cependant, l'ajout de l'huile d'Argan ou de l'huile d'Olive aux LPS révèle un potentiel anti-inflammatoire par le rétablissement de niveau des ARNm, qui diminue pour l'IL6 de 60% par rapport LPS seule en cotraitant par AO+LPS et revient au niveau de contrôle par OO+LPS. Alors que le taux d'expression relatif des ARNm de TNF $\alpha$  diminue pour avoir un niveau d'expression plus bas que celui du contrôle.



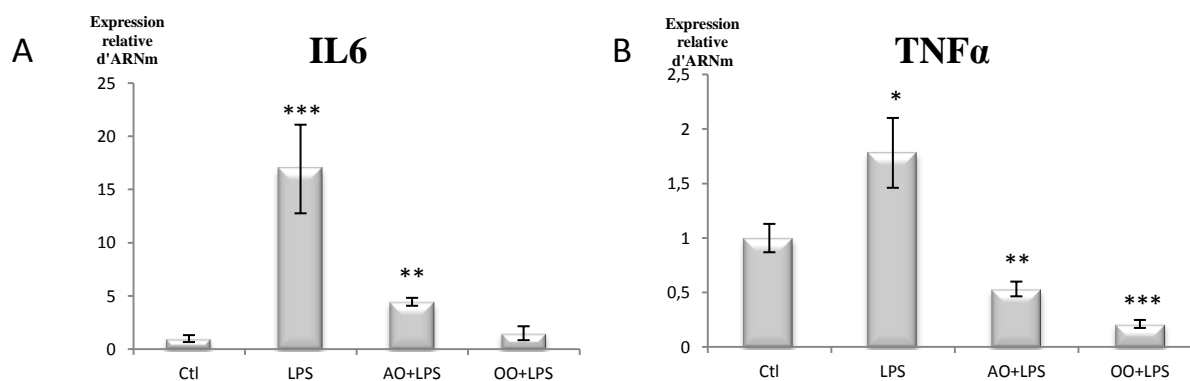


Figure 50 : Niveaux relatifs d'expression des ARNm de l'IL6 (A) et de la TNF $\alpha$  (B) dans le foie des souris avec le traitement par le lipopolysaccharide, l'huile d'Argan et le lipopolysaccharide ou par l'huile d'Olive et le lipopolysaccharide.

Les ARNm ont été extraits à partir du foie puis analysés par RT-qPCR en utilisant des amorces spécifiques pour IL6 et TNF $\alpha$ . Les valeurs de Ct obtenues pour chaque gène après qPCR ont été normalisées par rapport au gène de référence 36B4, ensuite ces valeurs normalisées ont été rapportées à celle du contrôle pour obtenir le taux d'expression relatif pour chaque gène. Chaque histogramme représente la moyenne  $\pm$  SEM de 5 souris par traitement. \*\*\*P<0,001 ; \*\* P<0,01 ; \* P<0,05 représentent les probabilités de significativité statistique après comparaison par le test Student.

### 3.2 Expression des ARNm codants pour les cytokines anti-inflammatoires : IL4 et IL10

Le traitement par l'huile d'Argan (Figure 51) a augmenté le taux d'expression des ARNm de l'IL4 de 7 fois contrairement au taux d'expression des ARNm de l'IL10 qui est diminué de 3 fois. De plus, le traitement par l'huile d'Olive induit une augmentation faible du taux d'expression des ARNm de l'IL4 par rapport à celle de l'huile d'Argan et n'a pas d'influence sur le taux d'expression relatif des ARNm de l'IL10.

Les résultats de la qPCR (Figure 52) ont montré, que le traitement par LPS induit une augmentation du taux d'expression des ARNm d'IL10 de 12 fois et une diminution des ARNm IL4 de 5 fois. De plus, une augmentation a été observée du taux d'expression relatif des ARNm de l'IL4 et de l'IL10 en cotraitant par l'huile d'Argan et le LPS par rapport au traitement par LPS seul. Tandis que, le cotraitement par l'huile d'Olive et le LPS a ramené l'expression des ARNm de l'IL10 au niveau de contrôle et le taux d'expression des ARNm d'IL4 est resté au même niveau que celui du traitement par LPS seul.

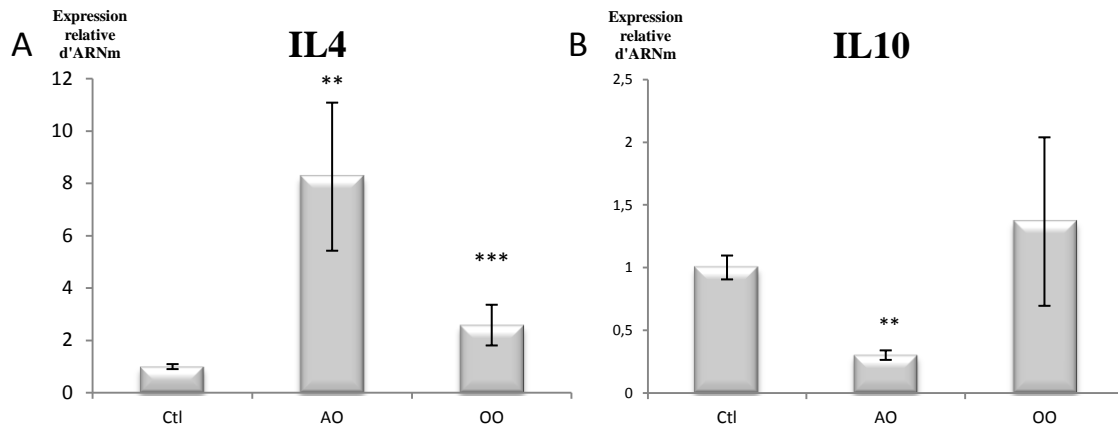


Figure 51 : Effet de l'huile d'Argan ou de l'huile d'Olive sur l'expression relative protéique de l'IL4 (A) et de l'IL10 (B) dans le foie des souris.

Les ARNm ont été extraits à partir du foie puis analysés par RT-qPCR en utilisant des amorces spécifiques pour l'IL4 et l'IL10. Les valeurs de Ct obtenues pour chaque gène après qPCR ont été normalisées par rapport au gène de référence 36B4, ensuite ces valeurs normalisées ont été rapportées à celle du contrôle pour obtenir le taux d'expression relatif pour chaque gène. Chaque histogramme représente la moyenne ± SEM de 5 souris par traitement. \*\* P<0,01,\*\*\*P<0,001représentent les probabilités de significativité statistique après comparaison par le test Student.

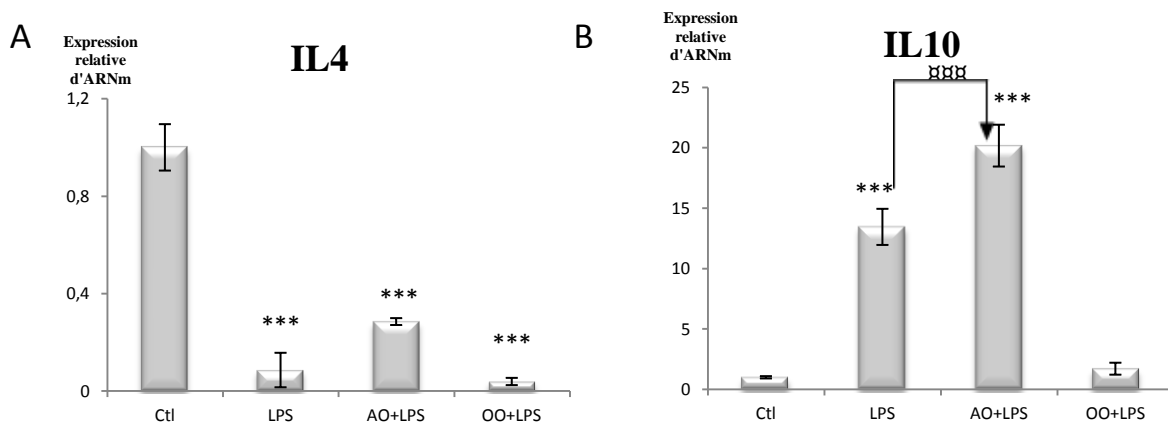


Figure 52 : Niveaux relatifs d'expressions des ARNm de l'IL4 (A) et de l'IL10 (B) dans le foie des souris avec le traitement par le lipopolysaccharide, l'huile d'Argan et le lipopolysaccharide ou par l'huile d'Olive et le lipopolysaccharide.

Les ARNm ont été extraits à partir du foie puis analysés par RT-qPCR en utilisant des amorces spécifiques pour l'IL4 et l'IL10. Les valeurs de Ct obtenues pour chaque gène après qPCR ont été normalisées par rapport au gène de référence 36B4, ensuite ces valeurs normalisées ont été rapportées à celle du contrôle pour obtenir le taux d'expression relatif pour chaque gène. La valeur représente la moyenne ± SEM de 5 souris par traitement. \*\*\*P<0,001 ; ¶¶¶P<0,001 représentent les probabilités de significativité statistique après comparaison par le test Student.

Les résultats de la qPCR (Figure 52) ont montrés un potentiel anti-inflammatoire de l'huile d'Argan élucidé par l'induction de cytokines anti-inflammatoires IL10 et la prévention contre l'augmentation des taux d'expression relatif des ARNm des cytokines pro-inflammatoires induites par les lipopolysaccharides.

#### 4. Conclusion

Les résultats de cette partie a démontré l'effet préventif de l'huile d'Argan contre les effets négatifs provoqués par les lipopolysaccharides, ce potentiel est montré par (Tableau 9, Tableau 10 et Tableau 11) :

*Tableau 9: Résumé des effets des différents traitements sur le taux d'expression relatifs des ARNm des gènes de métabolisme lipidique*

Les voies	Les gènes	LPS	AO+LPS	OO+LPS
Transcription	PPAR $\alpha$	--	~	~
	PGC-1 $\alpha$	---	~	--
$\beta$ -oxydation	ACOX1	~	~	~
	ACADS	--	~	~
	ACADM	~	~	-
	ACADVL	~	~	~
Néoglucogénèse	G6PH	---	~	~
	PEPCK	---	~	~
	Glut4	---	-	--

« - » diminution du taux d'expression relatif des ARNm

« - - » grande diminution du taux d'expression relatif des ARNm

« - - - » très grande diminution du taux d'expression relatif des ARNm

« ~ » niveau du contrôle du taux d'expression relatif des ARNm

- La prévention de l'huile d'Argan contre l'effet négatif de LPS sur le taux d'expression relatif des ARNm du facteur de transcription PPAR $\alpha$ , et du coactivateur PGC-1 $\alpha$
- La prévention de l'huile d'Argan contre l'effet négatif de LPS sur le taux d'expression relatif des ARNm des enzymes clés de la  $\beta$ -oxydation au niveau peroxysomale ACOX1 et au niveau mitochondriale ACADS.
- La prévention de l'huile d'Argan contre l'effet négatif de LPS sur l'activité enzymatique des enzymes clés de la  $\beta$ -oxydation au niveau peroxysomale ACOX1 et au niveau mitochondriale ACADS.

- La prévention de l'huile d'Argan contre l'effet négatif de LPS sur le taux d'expression relatif des ARNm des enzymes clés de la néoglucogénèse PEPCK et G6PH.
- L'effet anti-inflammatoire de l'huile d'Argan par la diminution du taux d'expression relatif des ARNm des biomarqueurs pro-inflammatoire IL6 et TNF $\alpha$ .
- L'effet anti-inflammatoire de l'huile d'Argan par l'augmentation du taux d'expression relatif des ARNm des biomarqueurs pro-inflammatoire IL-4 et IL-10.

Tableau 10: Résumé des effets des différents traitements sur l'activité enzymatique des enzymes clés de la voie de la  $\beta$ -oxydation

La voie	Enzymes	LPS	AO+LPS	OO+LPS
$\beta$ -oxydation	ACOX1	--	~	~
	Catalase	++	+~	++
	ACADS	--	++	~
	C8	~	~	~
	C12	+++	+++	+++
	C16	+++	+	++

« + » augmentation de l'activité enzymatique

« ++ » grande augmentation de l'activité enzymatique

« +++ » très grande augmentation de l'activité enzymatique

« -- » grande diminution de l'activité enzymatique

« +~ » augmentation non significative de l'activité enzymatique

« ~ » niveaux du contrôle de l'activité enzymatique

Tableau 11: Résumé des effets des différents traitements sur le taux d'expression relatifs des ARNm des gènes de l'inflammation

La voie	Les gènes	AO	OO	LPS	AO+LPS	OO+LPS
Inflammation	TNF $\alpha$	---	---	+	--	---
	IL6	--	---	+++	+	~
	IL10	--	~	++	+++	~
	IL4	+++	+	---	--	---

« + » augmentation du taux d'expression relatif des ARNm

« ++ » grande augmentation du taux d'expression relatif des ARNm

« +++ » très grande augmentation du taux d'expression relatif des ARNm

« -- » grande diminution du taux d'expression relatif des ARNm

« --- » très grande diminution du taux d'expression relatif des ARNm

« ~ » niveaux du contrôle du taux d'expression relatif des ARNm

En conclusion, nos résultats montrent que le traitement par le LPS, a un effet négatif sur le facteur de transcription PPAR $\alpha$  et son coactivateur PGC-1 $\alpha$ . Ce qui provoque une diminution des gènes codant des enzymes clés de la  $\beta$ -oxydation au niveau peroxysomale ACOX1 et au niveau mitochondriale ACADS ainsi qu'une répression des gènes clés de la néoglucogenèse PEPCCK et G6PH et du transport de glucose au niveau hépatique Glut4. De plus, il induit une augmentation des marqueurs pro-inflammatoires IL6 et TNF $\alpha$ . Cependant, l'ajout de l'huile d'Argan au LPS a montré une prévention, plus marquante par rapport à celle de l'huile d'Olive, contre l'effet négatif du LPS aux niveaux du métabolisme des acides gras et au niveau de la voie de la néoglucogenèse. Ainsi qu'un potentiel anti-inflammatoire élucidé par l'induction de cytokines anti-inflammatoires IL10 et la répression des cytokines pro-inflammatoires stimulées par les lipopolysaccharides.

D'après ces résultats, nous avons montré pour la première fois que l'huile d'Argan a un effet préventif contre les perturbations du métabolisme lipidique par les endotoxines ainsi qu'un potentiel anti-inflammatoire.

# DISCUSSION

## I. Propriétés de l'huile d'Argan d'origines artisanale et commerciale

D'après les études de Khallouki et al., la caractérisation de la fraction insaponifiable de l'huile d'Argan a révélé la présence de quatre polyphénols, l'acide vanillique, l'acide syringique, l'acide férulique et le tyrosol. Avec une prédominance de l'acide férulique qui représente plus que 94% de la fraction des polyphénols avec une teneur 3263 $\mu$ g/Kg de l'huile d'Argan (Khallouki et al., 2003).

Dans notre travail nous avons utilisé deux huiles d'Argan préparées avec deux procédés d'extraction différents. La première huile d'Argan est obtenue par la méthode artisanale traditionnelle caractérisée par la torréfaction de l'amande oléagineuse. La deuxième huile d'Argan est commerciale obtenue par la méthode de la presse mécanique.

Dans un premier temps nous avons caractérisé l'acide férulique commercial par l'évaluation de la fluorescence par le spectrofluorimètre. Nous avons réalisé un spectre d'excitation qui a révélé la présence de deux pics d'excitation le premier à une longueur d'onde 275 nm, et le deuxième à 337 nm qui correspondent tous les deux à l'acide férulique (Lichtenthaler et Schweiger, 1998; Meyer et al., 2003). Après avoir défini la longueur d'onde d'excitation de l'acide férulique, nous avons réalisé un spectre d'émission avec une excitation à une longueur d'onde de 337 nm. Le spectre d'émission a montré un maximum d'émission à 402 nm.

Après la détermination des longueurs d'ondes d'excitation et d'émission de l'acide férulique, nous avons analysé nos échantillons d'huile d'Argan d'origines commerciale et artisanale. Les spectres d'excitation pour les solutions de l'huile d'Argan (solubilisées dans l'éthanol) ont révélé la présence du pic d'excitation de l'acide férulique à 339 nm et à 334 nm respectivement pour l'huile d'Argan commerciale et l'huile d'Argan artisanale. De plus, les spectres d'émission pour les solutions de l'huile d'Argan ont révélé la présence du pic d'émission de l'acide férulique à 402 nm et à 410 nm respectivement pour l'huile d'Argan commerciale et l'huile d'Argan artisanale. En effet, les résultats du spectrofluorimètre ont montré naturellement la présence de l'acide férulique dans la fraction polyphénols de nos huiles d'Argan commerciale et artisanale.

Ensuite, après deux mois de conservation de ces huiles d'Argan artisanale et commerciale à -80°C, nous avons évalué de nouveau la fluorescence de l'acide férulique dans nos huiles en réalisant les spectres d'excitation et d'émission. Les résultats ont montré la disparition des pics d'excitation et d'émission pour la solution de l'huile d'Argan commerciale.

Tandis que les spectres de la fluorescence d'excitation et de la fluorescence d'émission de la solution de l'huile d'Argan artisanale ont montré la conservation des pics correspondant à l'acide férulique avec une longueur d'onde d'excitation à 337 nm et une longueur d'onde d'émission à 415 nm. La disparition des pics d'excitation et d'émission de la solution de l'huile d'Argan commerciale pourrait être expliquée par l'oxydation de l'acide férulique au moment de la conservation et la manipulation de l'huile. Cependant, la conservation et la stabilité des propriétés antioxydante de l'huile d'Argan artisanale pourrait être expliquée par le processus d'extraction traditionnelle caractérisé par la méthode de torréfaction des amandes, par ce qu'il a été montré que la température et la durée de la torréfaction jouent un rôle important dans la conservation et la stabilité des propriétés antioxydante de l'huile (Harhar et al., 2011; Matthäus et al., 2010).

Pour confirmer l'hypothèse de l'oxydation de l'acide férulique de la solution de l'huile d'Argan commerciale, nous avons évalué la fluorescence d'excitation et d'émission de l'acide férulique commerciale en ajoutant une solution de peroxyde d'hydrogène. Les résultats obtenus par spectrofluorimètre, ont montré la diminution du pic de la fluorescence d'excitation et le pic de la fluorescence d'émission pour l'acide férulique avec la solution de peroxyde d'hydrogène par rapport à l'acide férulique seul.

Après avoir montré que la disparition des pics de la fluorescence de l'excitation et de la fluorescence de l'émission de l'huile d'Argan commerciale due à l'oxydation de l'acide férulique, nous avons quantifié l'acide férulique dans l'huile d'Argan artisanale. Nous avons préparé une gamme étalon de l'acide férulique commerciale et nous avons mesuré la fluorescence relative par spectrofluorimétrie. Les résultats ont montré que l'huile d'Argan artisanale contient une concentration 120 fois plus grande que la concentration mentionnée dans la littérature. Cette différence par rapport aux travaux de Khallouki et al, est peut être due à l'origine des fruits, au processus de l'extraction (la température et la durée de la torréfaction, la quantité d'eau ajoutée au cours du processus d'extraction) (Marfil R et al., 2011), aux conditions de stockage et à la méthode de quantification.

En conclusion, la caractérisation des propriétés des huiles d'Argan artisanale et commerciale a montré que les deux huiles contiennent l'acide férulique dans leurs fractions insaponifiables. De plus, l'acide férulique contenu dans l'huile d'Argan artisanale est plus résistant à l'oxydation par rapport à l'huile d'Argan commerciale. Ainsi que, notre huile d'Argan artisanale est très riche en acide férulique par rapport aux données de la littérature.



En effet, notre étude a montré que la composition de la fraction insaponifiable de l'huile d'Argan est influencée par plusieurs paramètres, notamment l'origine des fruits, la méthode d'extraction, les conditions de stockage et les moyens de la quantification.

De plus, vu les effets bénéfiques sur la santé humaine de la partie insaponifiable de l'huile d'Argan et la demande mondiale à cette huile. Nous avons pu mettre en évidence un moyen de contrôle de la qualité antioxydante de l'huile d'Argan par l'authentification et l'évaluation de l'acide férulique par spectrofluorimètre.

## II. Effet de l'huile d'Argan sur le métabolisme lipidique et glucidique

L'huile d'Argan est une huile naturelle qui a une composition particulière divisée en deux fractions. La fraction insaponifiable représente 1% de l'huile d'Argan, composée par les polyphénols, les stérols et les tocophérols (Khallouki et al., 2003). Et la fraction saponifiable triglycéridique qui représente 99% de l'huile d'argan. L'analyse des acides gras de la fraction triglycéridique montre que l'huile d'argan est riche en acide oléique et en acide linoléique, représentant tous les deux près de 80%, ayant la particularité d'être présents en proportions équilibrées dans l'huile d'argan par rapport aux autres huiles naturelles (Cherki et al., 2005).

Les acides gras sont des molécules biologiques qui jouent un rôle important pour la croissance et le développement de l'organisme. Notamment, la régulation de la signalisation moléculaire (Jump et al., 2005).

En effet, l'altération des niveaux des acides gras provoque certains troubles (maladies cardiovasculaires, l'hyperlipidémie, l'obésité, résistance à l'insuline) dans la santé humaine. Il est donc important pour l'organisme de contrôler les niveaux des acides gras dans l'organisme (Forman et al., 1997). Ce contrôle se fait principalement dans le foie (Jump et al., 2005) par le récepteur nucléaire PPAR $\alpha$ . Cet isotype de PPARs est prédominant dans le foie des rongeurs et joue un rôle central dans la régulation de la transcription des gènes codant pour les enzymes hépatiques peroxysomales et mitochondriales impliquées dans l'oxydation des acides gras (Cherkaoui-Malki et al., 2001; Ren et al., 1997).

En outre, l'activation ligand-dépendante du PPAR $\alpha$  induit un recrutement du coactivateur PGC-1 $\alpha$  et stimule la transcription des gènes cibles codant pour des enzymes impliquées dans les deux voies de la  $\beta$ -oxydation, des acides gras, mitochondriale et peroxysomale (Gulick et al., 1994; Reddy et Hashimoto, 2001).

Dans notre étude, nous avons traité des souris par l'huile d'Argan ou l'huile d'Olive pendant 25 jours pour évaluer les effets, de ces huiles naturelles, sur le métabolisme énergétique au niveau mitochondriale et peroxysomale dans le foie des souris.

L'évaluation des effets de ces traitements a été réalisée à trois niveaux :

- Au niveau post-transcriptionnelle par l'évaluation des taux des ARNm de PPAR $\alpha$  et de ses gènes cibles
- Au niveau post-traductionnelle par l'évaluation de l'expression protéique de PPAR $\alpha$  et des protéines codées par ses gènes cibles

- Au niveau de l'activité enzymatique des enzymes codées par les gènes cibles de PPAR $\alpha$

Dans un premier temps nous avons évalué les variations du facteur de transcription PPAR $\alpha$  et son coactivateur PGC-1 $\alpha$  ainsi que les gènes de la voie de la  $\beta$ -oxydation, des acides gras, mitochondriale et peroxysomale. Notamment, les gènes codant pour l'Acyl-CoA oxydase (ACOX1), l'enzyme bifonctionnelle (L-PBE) et l'Acyl-CoA déshydrogénase des moyennes et longues chaînes (ACADM, ACADL) qui sont des cibles directes de PPAR $\alpha$  (Meng et al., 2009; Pyper et al., 2010). De plus nous avons évalué l'effet antioxydant de l'huile d'Argan par la mesure de l'activité enzymatique de la catalase (enzyme dégradant le peroxyde d'hydrogène formé par les réactions oxydases peroxysomale).

Le traitement des souris par l'huile d'Argan ou l'huile d'Olive induit une augmentation du taux des ARNm de PPAR $\alpha$  au niveau hépatique. Cette induction est probablement due à l'activation de PPAR $\alpha$  par les acides gras présents dans l'huile d'Argan ou dans l'huile d'Olive tels que l'acide palmitique, stéarique, oléique et linoléique. En effet, les traitements par l'huile d'Argan ou l'huile d'Olive pourraient provoqués une augmentation du niveau de triglycéride composés en acides gras saturés, mono et poly-insaturés (Benzaria et al., 2006). En plus, ces triglycérides sont dégradés par des lipoprotéines lipases pour donner des acides gras non estérifiés qui vont, autant que ligands, générer une activation du PPAR $\alpha$  (Ziouzenkova et al., 2003). Cette activation de la transcription du récepteur nucléaire PPAR $\alpha$  dans le foie des souris est répercutée sur l'expression protéique de PPAR $\alpha$  par une augmentation, mais qui n'est pas significative à cause des variations interindividuelles.

Tandis que, le traitement par l'huile d'Argan a provoqué une diminution étonnante du taux d'expression relatif des ARNm du coactivateur PGC-1 $\alpha$ . Cette diminution n'est pas retrouvée au niveau de son expression protéique qui ne varie pas avec les traitements à huile d'Argan ou à l'huile d'Olive par rapport au contrôle.

En effet, la variation entre les résultats de l'évaluation post-transcriptionnelle par qPCR et post-traductionnelle par western-blot pourrait être expliquée par des régulations post-transcriptionnelle liée à des ARN interférants (shRNA ou miRNA) (Peyrou et al., 2012). Ajouter à cela, que l'augmentation mesurée des ARNm PPAR $\alpha$  pourrait être due aussi bien à une activation de la transcription du gène et/ou à une diminution de la dégradation de son ARNm. La qPCR permet seulement de mesurer la résultante de ces deux phénomènes.

Cependant, les activités de PPAR $\alpha$  et/ou de PGC-1 $\alpha$  ne peuvent être mesurées qu'au travers de la mesure de l'activation de gènes cibles appartenant à différentes voies métaboliques. La régulation PPAR $\alpha$ -dépendante de ces voies n'implique pas forcément l'augmentation de l'expression de PPAR $\alpha$  et/ou de PGC-1 $\alpha$ .

En outre, les résultats de cette partie ont révélé l'absence d'influence de traitement par l'huile d'Argan sur la signalisation métabolique au niveau post-traductionnel illustré par la stabilité de l'expression protéique du facteur de transcription PPAR $\alpha$  et du coactivateur PGC-1 $\alpha$ .

Nous avons donc étudié les variations de gènes cibles de PPAR $\alpha$ , qui sont impliqués dans les deux voies de la  $\beta$ -oxydation des acides gras au niveau peroxysomale et mitochondriale. Nous avons trouvé que, le traitement par l'huile d'Argan chez la souris aboutit à une augmentation du taux d'expression des ARNm codant les enzymes clés de la  $\beta$ -oxydation, des acides gras, mitochondriale l'ACADS et l'ACADM, et peroxysomale l'ACOX1 dans le foie. Cette induction montre que la diminution du taux d'ARNm PGC1 $\alpha$  n'a pas eu de répercussion sur la transcription des enzymes clés de la  $\beta$ -oxydation mitochondriale et peroxysomale qui sont des gènes cibles de PPAR $\alpha$ . En effet, l'induction des ARNm de ses enzymes pourrait être le résultat de l'activation du facteur de transcription PPAR $\alpha$  par les acides gras présents dans l'huile d'Argan comme ligands spécifiques de PPAR $\alpha$  (Meng et al., 2009; Pyper et al., 2010). Cependant, ces variations ne sont pas retrouvées au niveau de l'expression protéique de L-PBE et de l'ACADM sauf une augmentation non significative de l'expression de l'ACOX1.

D'après les résultats précédents, nous avons remarqué qu'il y a une différence entre les variations au niveau post-transcriptionnel et au niveau post-traductionnel. Cette différence entre les résultats de la qPCR et du western-blot, nous a poussé à mesurer l'activité enzymatique des enzymes de la  $\beta$ -oxydation peroxysomale et mitochondriale pour confirmer ou infirmer les résultats précédents et pour avoir une vue globale des effets du traitement par l'huile d'Argan sur le métabolisme lipidique. Nous avons donc utilisé plusieurs substrats à différentes longueurs de chaîne d'acyl-CoA. Le traitement par l'huile d'Argan augmente la  $\beta$ -oxydation mitochondriale illustrée par l'augmentation de l'activité vis-à-vis du butyryl-CoA, du lauroyl-CoA et du palmitoyl-CoA, mais pas vis-à-vis de l'octanoyl-CoA. Des résultats similaires sont obtenus avec le traitement à l'huile d'olive. Cette augmentation de l'activité spécifique vis-à-vis du butyryl-CoA (C4) reflète une stimulation de l'activité enzymatique de l'ACADS du fait que le C4 représente le substrat préférentiel de l'ACADS.

Ainsi que les résultats de la qPCR ont montré une augmentation de l'expression du gène codant pour l'enzyme ACADS ce qui indique un accord entre les résultats au niveau post-transcriptionnel et au niveau de l'activité enzymatique. De plus, L'octanoyl-CoA (C8) et le lauroyl-CoA (C12) peuvent être les substrats à la fois de l'ACADM et de l'ACADL (Bartlett et Eaton, 2004). Cependant, l'activité ACADL est plus importante dans la  $\beta$ -oxydation des AG insaturés et 2-méthyl-branchés plutôt que saturés (Lea et al., 2000; Wanders et al., 1998). Ajouter à cela, le niveau d'expression hépatique des ARNm de l'ACADM et plus important que celui de l'ACADL (Ouali et al., 2000) et nous avons montré que le traitement par l'huile d'Argan ou l'huile d'Olive induit une augmentation de l'expression des ARNm de l'ACADM au niveau hépatique des souris, ce qui augmente la susceptibilité que la stimulation de l'activité spécifique vis-à-vis du lauroyl-CoA reflète une augmentation de l'activité enzymatique de l'ACADM plutôt que de l'ACADL. Enfin, Le lauroyl-CoA ainsi que le palmitoyl-CoA peuvent être également les substrats de la ACADL et de la ACADVL (Bartlett et Eaton, 2004) et donc l'augmentation de l'activité enzymatique vis-à-vis ces deux substrats indique une stimulation de l'activité de l'ACADL et l'ACADVL malgré la stabilité de l'expression des ARNm de l'ACADVL suite au traitement par l'huile d'Argan ou l'huile d'Olive, ce qui pourrait être expliqué par une régulation post-traductionnelle.

L'apport des acides gras par le traitement est capable de moduler le métabolisme lipidique au niveau hépatique (Ferramosca et al., 2008). Il a été montré que le traitement des souris par l'huile d'Olive induit une accumulation des lipides au niveau du foie, en particulier sous forme de triglycéride. Cette accumulation est due d'une part, à une stimulation de l'activité des enzymes de lipogénèse (Portillo et al., 2001; Takeuchi et al., 2001). Et d'autre part, à une inhibition du carnitine palmitoyl-transférase I (CPT-I) (Ferramosca et al., 2008) et le carnitine/acylcarnitine translocase (CACT) (Priore et al., 2012) qui sont des enzymes clés du contrôle de l'oxydation des acides gras mitochondriale en catalysant le transport des acides gras du cytosol vers l'intérieur de la mitochondrie ce qui indique une diminution de l'oxydation des acides gras. Toutefois, il est généralement connu que les acides gras polyinsaturés sont des régulateurs négatifs de la lipogénèse hépatique, alors que les acides gras saturés et monoinsaturés ont peu ou aucun effet sur la synthèse des acides gras (Clarke, 2004; Jump et al., 2005). Ainsi que, d'autres études ont montré une absence d'effet de l'huile d'Olive sur l'activité des enzymes de lipogénèse (Ferramosca et al., 2008). Ajouter à cela, une étude a montré que chez les rats atteints de la maladie non alcoolique du foie gras, l'apport de l'huile d'Olive diminue le niveau des triglycérides dans le foie (Assy et al., 2009).

La variation entre les résultats obtenus par les différentes études est due aux conditions expérimentales, notamment l'espèce animale, l'origine et la composition de l'huile utilisée ainsi que la quantité administrée et la durée de traitement (Ferramosca et al., 2008).

Suite à ces données, dans notre travail, le traitement par l'huile d'Argan ou l'huile d'Olive a provoqué une accumulation des triglycérides au niveau hépatique des souris. Ces triglycérides sont riches en acides palmitique, stéarique, oléique et linoléique suite à la composition de nos huiles naturelles. Cette accumulation a provoqué une induction de l'activité enzymatique seulement au niveau mitochondriale. Ce qui pourrait être expliqué par le fait que la mitochondrie prennent en charge la dégradation de la majeure partie des acides gras à courte (<C8), moyenne (C8-C12) et à longue (C12-C20) chaînes dérivés de l'alimentation (Wanders, 2004) et que la longueur des chaînes des acides gras accumulés (de 16 à 18 carbones) est comprise dans ce spectre.

Alors qu'au niveau peroxysomale le traitement par l'huile d'Argan a augmenté l'activité enzymatique de la catalase dans le foie des souris, ce qui pourrait s'expliquer par l'effet antioxydant de l'huile d'Argan ou de l'huile d'olive. Du fait qu'elles sont riches en polyphénols et en tocophérols ayant des propriétés antioxydantes (Drissi et al., 2004; Nakbi et al., 2010). De plus, cette augmentation spécifique de l'activité catalase malgré la stabilité de l'activité de l'ACOX1, pourrait s'expliquer par la production de la molécule d' $H_2O_2$  par d'autres enzymes oxydase peroxysomale ce qui induit une augmentation de l'activité de la catalase pour la dégradée (Schrader et Fahimi, 2006).

En résumé, dans notre travail nous avons montré pour la première fois que l'administration de l'huile d'Argan chez les souris a un effet bénéfique sur le métabolisme des acides gras en activant leur dégradation mitochondriale ainsi que sur l'activité antioxydante au niveau hépatique.

Les acides gras jouent un rôle important dans la régulation de la néoglucogenèse. Suite à leur oxydation par la voie de la  $\beta$ -oxydation mitochondriale dans le foie, les acides gras fournissent les cofacteurs nécessaires pour les étapes clés de la néoglucogenèse ATP, NADH, acétyl-CoA conduisant à une production de glucose par le foie (Boden, 2003; Girard, 2003) qui représente le principal producteur de glucose notamment par la voie de la néoglucogenèse (Puigserver et Spiegelman, 2003). Cette voie est régulée par le PGC-1 $\alpha$ , qui est en coopération avec le facteur de transcription HNF4 $\alpha$ , régule l'expression des enzymes clés de la néoglucogenèse telles que la phosphoénolpyruvate carboxykinase (PEPCK) et le

glucose-6-phosphatase (G6PH) (Yoon et al., 2001). De plus, l'absorption du glucose dans les cellules implique une protéine de transport du glucose appelé Glut4, dont le passage des sucres à travers les membranes plasmiques se fait à travers leur pore aqueux (Steinbusch et al., 2011).

Pour caractériser les effets de l'huile d'Argan sur la voie de la néoglucogenèse nous avons évalué les variations du facteur de transcription HNF4 $\alpha$  et ses gènes cibles codant pour les enzymes clés de la néoglucogenèse telles que le PEPCK et le G6PH, ainsi que du transporteur de glucose Glut4.

Nos résultats montrent que le traitement par l'huile d'Argan n'a pas d'influence sur le taux d'expression relatif des ARNm d'HNF4 $\alpha$ . Tandis que, l'analyse de l'image de western-blot a révélé une augmentation non significative de l'expression protéique d'HNF4 $\alpha$  avec les différents traitements.

Les résultats présentés dans ce travail ont montré que le traitement par l'huile d'Argan diminue le taux d'expression relatif d'ARNm de PGC-1 $\alpha$  mais sans modifier l'expression protéique de ce coactivateur. De plus, l'huile d'Argan n'affecte pas non plus le taux d'expression d'ARNm HNF4 $\alpha$ . Toutefois, le traitement par l'huile d'Argan augmente significativement les taux d'expression d'ARNm de PEPCK et G6PH et non pas celui des ARNm Glut4. Ce qui indique une activation de la voie de la néoglucogenèse hépatique sans affecter le transport du glucose par le Glut4.

Chez la souris, nos travaux montrent au niveau hépatique que le traitement par l'huile d'Argan active la dégradation mitochondriale des acides gras ainsi que la voie de la néoglucogenèse. Cette coordination bénéfique de la néoglucogenèse et de l'oxydation des acides gras ressemble à l'état de jeûne et qui ferait intervenir PGC-1 $\alpha$  (Yoon et al., 2001). Cette activation de la voie de la néoglucogenèse pourrait être due à une activation du coactivateur PGC-1 $\alpha$  par une régulation post-traductionnelle puisque l'expression de la protéine PGC-1 $\alpha$  ne varie pas, malgré une diminution de ses ARNm PGC-1 $\alpha$  par le traitement à l'huile d'Argan. Cette coordination métabolique par PGC-1 $\alpha$  de l'oxydation des acides gras et de la néoglucogenèse a un sens métabolique puisque l'augmentation de l'oxydation des acides gras permet à la mitochondrie de produire de l'ATP nécessaire à la synthèse du glucose par la voie de la néoglucogenèse (Lin et al., 2005). L'induction des gènes impliqués dans la  $\beta$ -oxydation mitochondriale (ACADM, ACADL et CPT1) est le résultat de la coopération entre PGC-1 $\alpha$  et PPAR $\alpha$ , alors que l'induction des gènes de la voie de la gluconéogenèse implique



l'interaction de PGC-1 $\alpha$  avec HNF4  $\alpha$  et FOXO1 (Puigserver et al., 2003; Schreiber et al., 2004). Dans le foie, la phosphorylation de PGC-1 $\alpha$  par p38 MAPKinase abouti à son activation et l'induction de la néoglucogénèse. Les acides gras libres sont capables d'activer la voie de signalisation p38 MAPKinase (Cao et al., 2005).

En plus de la phosphorylation, l'ubiquitinylation, la méthylation, l'acétylation (Fernandez-Marcos et Auwerx, 2011). Par conséquent, le PGC-1 $\alpha$  stimule la transcription des enzymes PEPCCK et G6PH, en coopération avec les facteurs de transcription Foxo1 (Puigserver et Spiegelman, 2003) et HNF-4 $\alpha$  (Yoon et al., 2001). De plus, il stimule la capacité des hépatocytes à sécréter du glucose en présence des précurseurs de la néoglucogénèse (Puigserver et Spiegelman, 2003) et des cofacteurs ATP, NADH et acétyl-CoA (fournit par l'oxydation des acides gras) nécessaires aux étapes clés de la néoglucogénèse (Boden, 2003; Girard, 2003).

De plus, nous avons remarqué que le traitement par l'huile d'Argan a presque les mêmes effets avec le traitement par l'huile d'Olive sur le métabolisme des acides gras et la voie de la néoglucogénèse.

En conclusion, ce travail a montré pour la première fois que le traitement par l'huile d'Argan a un effet bénéfique sur le métabolisme des acides gras ainsi que sur la voie de la néoglucogénèse. De plus, nous avons mis en évidence pour la première fois chez la souris un effet antioxydant de l'huile d'Argan au niveau hépatique.



### III. Effet préventif de l'huile d'Argan contre la perturbation du métabolisme lipidique par les endotoxines (lipopolysaccharides).

Plusieurs études épidémiologiques et expérimentales ont montré les effets bénéfiques au niveau cardiovasculaire de l'huile d'Argan respectivement chez l'homme et chez les modèles animaux. En effet, chez l'homme des enquêtes épidémiologiques menées au Maroc sur des sujets consommateurs de l'huile d'argan montrent une diminution du risque de développer une hypertension artérielle de l'ordre de 50% (Berrougui et al., 2004). Ceci est accompagné, d'une part, d'une baisse significative des taux de triglycérides et de LDL chez les sujets consommateurs d'huile d'Argan (Drissi et al., 2004). D'autre part, la consommation d'huile d'Argan induit une augmentation des taux plasmatiques de HDL et de la vitamine E (Derouiche et al., 2005b). Ces résultats peuvent être directement liés à la composition de l'huile d'Argan en antioxydants, en particulier les tocophérols et les polyphénols. Nous avons montré dans ce travail que cette huile augmentait l'activité catalase peroxysomale et elle contenait une proportion importante de l'acide férulique et, dont l'activité antioxydante pourrait avoir des effets métaboliques en augmentant le métabolisme énergétique et en réduisant la lipogenèse (Murase et al., 2011). Les effets antioxydants de l'huile d'Argan sont également montrés par la diminution du stress oxydant au niveau artériel chez le rat hypertendu (Berrougui et al., 2004), ou encore la diminution par l'ester de l'acide férulique dans les cultures de neurones primaires de la cytotoxicité, des espèces réactives de l'oxygène, de la peroxydation des lipides induits par le peptide (1-42) de l'amyloïde  $\beta$ , responsable de la maladie d'Alzheimer (Sultana et al., 2005).

Il est donc évident que la composition de l'huile d'argan aussi bien en lipides, avec un équilibre entre acide gras mono et polyinsaturés, en stérols ainsi qu'en antioxydants tels que les polyphénols et les tocophérols (Khallouki et al., 2003) lui confère des propriétés qui expliqueraient ses effets préventifs contre les maladies cardiovasculaires (Benajiba et al., 2002) (Drissi et al., 2004; Nakbi et al., 2010).

Cette composition particulière, donne à l'huile d'Argan la susceptibilité d'avoir un potentiel préventif et anti-inflammatoire mais qui reste à démontrer sur le plan moléculaire.

Le rôle de l'inflammation dans de nombreuses pathologies d'origine métabolique a été bien démontré aussi bien dans l'athérosclérose que dans le diabète du type 2 (Wahli et Michalik, 2012). L'inflammation induirait une altération du métabolisme lipidique, notamment dans le foie, où elle provoque la diminution de la  $\beta$ -oxydation des acides gras

(Khovidhunkit et al., 2004). Les gènes impliqués dans les voies de  $\beta$ -oxydation mitochondriale et peroxysomales des acides gras sont sous le contrôle du récepteur nucléaire PPAR $\alpha$  (Wahli et Michalik, 2012). La perturbation de l'activité de PPAR $\alpha$  a une incidence directe sur le métabolisme des acides gras. En effet, il a été montré que l'activation de l'inflammation par l'administration de lipopolysaccharides bactériens (Calder, 2006) diminue l'expression de PPAR $\alpha$  et de son coactivateur PGC-1 $\alpha$  dans le foie, les reins et le cœur des souris (Feingold et al., 2004; Feingold et al., 2008).

Dans notre étude, pour élucider l'effet préventif, de l'huile d'Argan, nous avons évalué au niveau hépatique les variations du facteur de transcription PPAR $\alpha$  et son coactivateur PGC-1 $\alpha$  ainsi que leurs gènes cibles au niveau de la voie de la  $\beta$ -oxydation des acides gras mitochondriale et peroxysomale. Cette évaluation a été réalisée chez des souris traitées ou non par l'huile d'Argan ou par l'huile d'Olive pendant 25 jours et 16 heures avant la fin de traitement, les souris ont reçu une injection intra-péritonéale de Lipopolysaccharides.

Nos résultats ont montré un effet négatif du traitement aux LPS sur les expressions des deux gènes, PPAR $\alpha$  et PGC-1 $\alpha$ , dans le foie de souris. Cette diminution pourrait s'expliquer par l'implication des cellules de Kupffer dans l'inhibition du PPAR $\alpha$ . En effet, des études récentes ont montré que dans des conditions inflammatoires telles que la stéatose hépatique ou le traitement par le LPS, les cellules de Kupffer montrent une surexpression du facteur NF- $\kappa$ B. Cette activation de NF- $\kappa$ B induit la sécrétion de cytokines proinflammatoires comme l'IL-1 $\beta$  qui inhibe au niveau des hépatocytes l'activité de PPAR $\alpha$  et de son coactivateur PGC-1 $\alpha$  vis-à-vis de leurs gènes cibles (Kim et al., 2007; Stienstra et al., 2010; Wahli et Michalik, 2012). Concernant nos travaux, le prétraitement par l'huile d'Argan ou par l'huile d'olive prévient l'effet négatif du LPS et le retour du taux d'expression de PPAR $\alpha$  au même niveau que celui des contrôles. Ce prétraitement prévient également l'effet négatif du LPS sur l'expression de PGC-1 $\alpha$  mais de manière plus prononcée pour l'huile d'Argan que pour l'huile d'Olive. Cette prévention pourrait être attribuée à une activation du PPAR $\alpha$  par les acides gras, comme ligands spécifiques, contenus dans la fraction triglycéridique de ces huiles naturelles tels que les acides oléique et linoléique (Desvergne et Wahli, 1999; Khallouki et al., 2003). Cependant, ces variations au niveau transcriptionnel après traitement par le LPS ne sont pas répercutées au niveau de l'expression protéique de PPAR $\alpha$  et de PGC-1 $\alpha$ . Par contre, en présence du LPS, le prétraitement par l'huile d'Argan ou par l'huile d'olive induit l'expression de PPAR $\alpha$  au niveau protéique. Ces résultats indiquent que le prétraitement par l'huile d'Argan annule l'effet du LPS au niveau post-transcriptionnel qui se traduit par un

retour à la normale des taux d'ARNm PPAR $\alpha$  et PGC-1 $\alpha$  et qu'au niveau post-traductionnel l'effet du prétraitement est plus visible avec une augmentation de l'expression des protéines PPAR $\alpha$  et PGC-1 $\alpha$ . Ces effets, pourraient être expliqués par la présence d'antioxydants dans cette huile. Cette analyse des résultats est confirmée par les effets similaires du prétraitement par l'huile d'olive. Ces variations entre les résultats de la qPCR et du western blot pourraient s'expliquer aussi par une différence de régulation de l'expression de PPAR $\alpha$  et de PGC-1 $\alpha$  aux niveaux post-transcriptionnel et post-traductionnel.

Les gènes codants l'ACOX1 et la L-PBE, deux enzymes de la  $\beta$ -oxydation peroxysomales, sont des cibles de PPAR $\alpha$  et donc le niveau de leur expressions est un indicateur de l'activation de la voie de  $\beta$ -oxydation peroxysomales par PPAR $\alpha$ . Malgré donc les variations du PPAR $\alpha$  et PGC-1 $\alpha$ , nous avons montré que les différents traitements n'ont pas d'effets sur l'enzyme clés de la  $\beta$ -oxydation peroxysomale ACOX1 au niveau post-transcriptionnel et post-traductionnel. Feingold et al. avaient montré également que l'atténuation de l'expression de PPAR $\alpha$  par le LPS n'avait pas d'effet sur l'expression de l'ACOX1 (Feingold et al., 2009). Cependant, le LPS a un effet négatif sur l'activité enzymatique de l'ACOX1 dans le foie des souris, signifiant une inhibition de la  $\beta$ -oxydation peroxysomale. Le prétraitement par l'huile d'Argan ou de l'huile d'Olive annule l'effet négatif du LPS sur l'activité de l'ACOX1. Ce qui montre un effet préventif de l'huile d'Argan et de l'huile d'Olive au niveau enzymatique. Par ailleurs, le traitement par le LPS induit l'activité de la catalase. Cette induction est absente avec le prétraitement par l'huile d'Argan, mais présente avec le prétraitement par l'huile d'olive. Ceci montre la participation de l'huile d'Argan dans la modulation des activités antioxydantes peroxysomales grâce probablement aux propriétés antioxydantes de ses polyphénols et de ses tocophérols.

Au niveau de la  $\beta$ -oxydation mitochondriale des acides gras, le LPS semble avoir une action spécifique en diminuant l'expression des ARNm et l'activité de l'ACADS, une déshydrogénase des acides gras à courte chaîne. Par contre, le LPS ne semble pas avoir d'effet sur l'expression des ARNm et l'activité des autres déshydrogénase de la voie  $\beta$ -oxydation mitochondriale à moyenne chaîne (ACADM) et à très longue chaîne (ACADVL). Le prétraitement par l'huile d'Argan ou par l'huile d'olive prévient l'effet négatif du LPS sur l'ACADS. Aussi bien l'huile d'Argan que l'huile d'olive augmente chacune les activités des trois déshydrogénase mitochondriales. Au niveau de l'expression protéique nous avons remarqué que les différents traitements n'ont pas d'effet sur l'expression de l'ACADM.

Cependant, au niveau de l'activité enzymatique nous avons trouvé que le traitement en LPS induit une augmentation de l'activité enzymatique spécifique du lauroyl-CoA qui est un substrat de l'ACADM et de l'ACADL et du palmitoyl-CoA qui est un substrat de l'ACADL et de l'ACADVL (Bartlett et Eaton, 2004). Le prétraitement par l'huile d'Argan ou par l'huile d'olive ne modifie pas cette augmentation par le LPS. L'augmentation de l'activité enzymatique spécifique du lauroyl-CoA et celle du palmitoyl-CoA serait due à une régulation post-traductionnelle alors que l'inhibition de l'activité de l'ACADS serait le résultat de l'effet négatif du LPS sur cette enzyme aussi bien au niveau post-transcriptionnel qu'au niveau de l'activité enzymatique. En effet, les études publiées concernant l'effet du LPS sur la  $\beta$ -oxydation mitochondriale montrent un effet négatif sur l'expression d'ARNm de l'ACADM (Feingold et al., 2009; Feingold et al., 2008) alors que dans notre étude nous avons montré une absence d'influence du LPS sur l'ACADM au niveau d'expression du gène et de la protéine ainsi qu'une induction de l'activité enzymatique. Cette différence entre les résultats publiés et nos résultats est due probablement d'une part, à la différence de tissu étudié et d'autre part, à la dose et à la durée du traitement au LPS. En conséquence, l'augmentation des activités enzymatiques spécifiques pour le C12 et le C16 accompagnée d'une diminution de l'activité enzymatique de l'ACADS conduirait à une accumulation des acides gras à chaîne courte C4 et C6 et une diminution de la formation de l'acétyl CoA. La diminution de la disponibilité en acétyl-CoA comme substrat énergétique pour le cycle de Krebs serait responsable d'une atténuation de la synthèse d'ATP et du cofacteur NADH et par conséquent d'une diminution du niveau énergétique cellulaire. Cependant, le prétraitement par l'ajout de l'huile d'Argan ou de l'huile d'Olive avant le LPS a montré un effet préventif de ces huiles naturelles. Cette prévention élucidée par le retour de l'activité au niveau du contrôle, est expliquée par la stimulation de l'activité enzymatique de l'ACADS par l'huile d'Argan ou l'huile d'Olive (d'après les résultats du dernier chapitre).

En résumé, nous avons montré pour la première fois que l'huile d'Argan a un effet préventif contre la perturbation du métabolisme lipidique par le LPS aussi bien au niveau de la  $\beta$ -oxydation peroxysomale qu'au niveau de la  $\beta$ -oxydation mitochondriale. Cette prévention est illustrée au niveau transcriptionnel par la prévention contre l'effet négatif du LPS sur le PPAR $\alpha$ , PGC-1 $\alpha$  ainsi qu'au niveau de l'activité enzymatique de la l'ACOX1 et de l'ACADS. De plus, nous avons montré que la prévention par l'huile d'Argan au niveau peroxysomal est plus forte que celle de l'huile d'Olive ce qui pourrait être expliqué par la

composition particulière de l'huile d'Argan en acide gras ainsi que sa richesse en acide férulique et en tocophérols par rapport à l'huile d'Olive.

La régulation du métabolisme des acides gras est étroitement liée à la régulation du métabolisme de glucose au niveau hépatique (Jump, 2011). En effet, le PGC-1 $\alpha$  joue un rôle important dans la régulation de ces deux voies. En coopération avec le PPAR $\alpha$ , le PGC-1 $\alpha$  intervient dans la régulation des enzymes clés de la  $\beta$ -oxydation mitochondriale des acides gras (Vega et al., 2000). Alors qu'en coopération avec le HNF4 $\alpha$ , il intervient dans la régulation des enzymes clés de la néoglucogénèse telles que le phosphoénolpyruvate carboxykinase (PEPCK), le fructose-1,6-bisphosphatase, et le glucose-6-phosphatase (Yoon et al., 2001). De plus, l'oxydation des acides gras au niveau hépatique fournit des cofacteurs (ATP, NADH, acétyl-CoA) nécessaires aux étapes clés de la néoglucogénèse (Boden, 2003; Girard, 2003).

Nos résultats ont montré que les différents traitements n'ont pas d'effet sur le taux d'expression d'ARNm de HNF4 $\alpha$ . En revanche, les résultats du western ont montré une augmentation de l'expression protéique de l'HNF4 $\alpha$  en traitant par le LPS. Cette augmentation est contrée par les prétraitements par l'huile d'Argan ou par l'huile d'olive. Le traitement par le LPS a montré un effet négatif par une diminution de 80% du taux d'expression des ARNm de PPECK, de G6PH et de Glut4. Cet effet est contré par l'huile d'Argan ou par l'huile d'Olive, qui ont montré une action préventive pour la voie de la néoglucogénèse. Cependant, cette prévention est concernée plus les expressions de PPECK, de G6PH et très peu le Glut4. Ceci pourrait aboutir à un rétablissement partiel du niveau du transport de glucose par le prétraitement par l'huile d'Argan uniquement.

L'effet du traitement par le LPS sur le PPECK et le G6PH au niveau hépatique des souris, est le résultat de l'effet négatif du LPS sur l'activité enzymatique de l'ACADS, qui provoque la diminution du taux des cofacteurs ATP, NADH et acétyl-CoA nécessaires aux étapes clés de la néoglucogénèse. De plus, le traitement par le LPS permet une induction des cytokines TNF $\alpha$  et IL1 qui sont responsables de l'atténuation de l'expression de gène de la PPECK au niveau hépatique (Feingold et al., 2012). Cependant, l'ajout de l'huile d'Argan ou de l'huile d'Olive provoque une induction de l'oxydation des acides gras au niveau mitochondriale ce qui fournit les cofacteurs nécessaires pour les réactions de la voie de la néoglucogénèse.

En résumé, nous avons montré que l'huile d'Argan a un potentiel préventif contre l'effet négatif du LPS sur la voie de la néoglucogénèse. Cet effet est illustré par le rétablissement des

niveaux de l'expression des gènes codant pour les enzymes clés de la néoglucogenèse suite au prétraitement par de l'huile d'Argan.

Par ailleurs, les cytokines sont des molécules produites au cours de l'inflammation, ils jouent un rôle dans la perturbation du métabolisme des acides gras et de la voie de la néoglucogenèse.

Pour élucider l'effet anti-inflammatoire de l'huile d'Argan dans le tissu hépatique des souris, nous avons évalué les taux d'expression relatifs des ARNm des biomarqueurs pro et anti-inflammatoire, avec le traitement par le LPS seul, l'huile d'Argan ou l'huile d'Olive, et le prétraitement par l'huile d'Argan ou par l'huile d'Olive.

Nos résultats ont montré une forte diminution des taux d'expression des cytokines pro-inflammatoires TNF- $\alpha$  et IL-6 avec le traitement par L'huile d'Argan ou l'huile d'Olive seule. Ainsi qu'une induction avec le traitement par LPS de 2 fois pour TNF $\alpha$  et de 17 fois pour l'IL6. Cependant, le prétraitement par l'huile d'Argan ou par l'huile d'olive a révélé un potentiel anti-inflammatoire de ces huiles. En effet, le prétraitement par l'huile d'Argan diminue de 60% l'induction des ARNm IL6 par le LPS. Alors que le prétraitement par l'huile d'olive diminue de 100% l'induction des ARNm IL6 par le LPS. Les deux huiles utilisées chacune en prétraitement préviennent l'induction du TNF $\alpha$  par le LPS.

En effet, l'induction des cytokines pro-inflammatoires TNF- $\alpha$  et IL-6 par le LPS se fait par l'activation de la voie de signalisation du facteur nucléaire NF- $\kappa$ B (Kono et al., 2009). En revanche, le traitement ou l'ajout de l'huile d'Argan ou l'huile d'Olive active le facteur de transcription PPAR $\alpha$  qui inhibe la voie de signalisation du facteur nucléaire NF- $\kappa$ B par l'induction du facteur I $\kappa$ B $\alpha$ , un inhibiteur de NF- $\kappa$ B, qui diminue l'expression des gènes des cytokines pro-inflammatoires (Kono et al., 2009). Ce potentiel anti-inflammatoire serait dû à la composition de l'huile d'Argan ou l'huile d'Olive, d'une part, en acides gras qui sont des ligands du PPAR $\alpha$ , et d'autre part, à la fraction des polyphénols qui ont des propriétés antioxydantes (Miles et al., 2005), notamment l'acide férulique. Ce dernier peut inhiber la voie de signalisation du facteur nucléaire NF- $\kappa$ B (Chao et al., 2010). De plus, nous avons remarqué que le prétraitement par par l'huile d'Argan ou par l'huile d'olive stimule l'activité enzymatique des enzymes spécifique du Lauroyl-CoA (C12), et du Palmitoyl-CoA (C16) de la  $\beta$ -oxydation mitochondriale et prévient la diminution de l'activité ACADS. car la diminution de l'activité ACADS aboutirait à une accumulation des acides gras à chaîne



courte (C4-C6) qui ont un potentiel anti-inflammatoire par la suppression de la production des cytokines pro-inflammatoires TNF- $\alpha$  et IL-6 stimulée par les LPS (Vinolo et al., 2011).

L'évaluation des biomarqueurs anti-inflammatoire a montré une augmentation de 7 fois de l'IL4 et une diminution de 3 fois de l'IL10 en traitant par l'huile d'Argan. Contrairement au traitement en huile d'Olive qui induit une augmentation faible de l'IL4 et une absence d'influence sur l'IL10. Les variations obtenues entre l'effet de l'huile d'Argan sur IL10 et sur IL4, sont expliquées par le fait que ces deux interleukines ont deux voies de signalisation différentes (Donnelly et al., 1999; Seki et al., 2002). De plus, le traitement par le LPS a montré une augmentation de l'IL10 qui serait une réponse cellulaire anti-inflammatoire et qui pourrait être due à une action des acides gras à chaîne courte accumulés suite à l'inhibition de l'activité enzymatique de l'ACADS par le LPS (Vinolo et al., 2011). Le prétraitement par l'huile d'Argan amplifie l'augmentation de l'IL-10 par le LPS qui est plus forte que celle de traitement par le LPS seul. Ceci confirme le potentiel anti-inflammatoire de l'huile d'Argan du fait que l'augmentation de l'expression de l'IL-10 inhibe la production de cytokine pro-inflammatoire TNF- $\alpha$  par activation de la voie du facteur de transcription STAT3 (Chan et al., 2012). En outre, le traitement par le LPS seul a montré une diminution de l'expression de cytokine anti-inflammatoire IL-4 alors que le prétraitement par l'huile d'Argan montre une prévention partielle contre l'effet négatif du LPS.

En résumé, le traitement par le LPS provoque un état inflammatoire au niveau hépatique des souris par la stimulation des biomarqueur pro-inflammatoire TNF- $\alpha$  et IL-6 et l'atténuation de biomarqueur anti-inflammatoire IL-4. Alors que, l'huile d'Argan a montré un effet anti-inflammatoire illustré par l'atténuation de l'effet du LPS sur l'expression des biomarqueurs pro-inflammatoire TNF- $\alpha$  et IL-6 et par l'activation des biomarqueurs anti-inflammatoire IL-10 et IL-4. De plus, les résultats de nos travaux ont montré que le potentiel de l'huile d'Argan dans la stimulation des biomarqueurs anti-inflammatoire est plus fort que celui de l'huile d'Olive.

En conclusion, nous avons montré pour la première fois que l'huile d'Argan a un effet d'une part, préventif contre la perturbation du métabolisme des acides gras et de la voie de la néoglucogenèse par le LPS. Et d'autre part, un effet anti-inflammatoire contre l'inflammation provoquée par le LPS. De plus, nous avons montré que l'huile d'Argan présente un effet préventif et anti-inflammatoire plus fort que celui de l'huile d'Olive.

Ces effets de cette huile d'Argan qui a une composition particulière riche en acide gras mono et poly-insaturés et en molécules avec des propriétés antioxydantes, lui confère un potentiel préventif dans les maladies cardiovasculaires (Cherki et al., 2006; Z. Charrouf et al., 2007), le diabète (Ould Mohamedou et al., 2011; Samane et al., 2006) ainsi qu'un effet sur la maladie liée aux perturbations du métabolisme lipidique dans les maladies neurodégénératives peroxysomales comme la pseudo-adrénoleucodystrophie néonatale (El Kebbaj et al., 2012).



# **CONCLUSIONS GENERALES**

L'huile d'Argan a une composition riche en acides gras mono et polyinsaturés et en antioxydants tels que les polyphénols et les tocophérols. Cette composition particulière lui confère, pour la santé chez l'homme, des propriétés bénéfiques se traduisant par effets antioxydants et préventifs contre les maladies cardiovasculaires. Cependant, les mécanismes moléculaires de ses effets restent non élucidés.

Dans notre étude nous avons comme objectif de mettre en évidence les bases moléculaires de l'effet de l'huile d'Argan sur le métabolisme lipidique au niveau mitochondriale et peroxysomale. Dans ce contexte nous avons caractérisé les effets bénéfiques de l'huile d'Argan sur le métabolisme énergétique et élucidé le potentiel préventif et anti-inflammatoire de cette huile naturelle.

En premier temps nous avons caractérisé les propriétés de la composition de l'huile d'Argan d'origines artisanale et commerciale et nous avons montré :

- La présence de l'acide férulique dans la composition de la fraction phénolique de l'huile d'Argan aussi bien d'origine artisanale que d'origine commerciale.
- L'acide férulique est bien conservé dans l'huile d'Argan artisanale, par contre, il est oxydé dans l'huile d'Argan commerciale.
- L'huile d'Argan artisanale est très riche en acide férulique avec une proportion de 120 fois plus que celle mentionnée dans la littérature.

Après avoir caractérisés ces huiles d'Argan artisanale et commerciale nous avons évalué l'effet de l'huile d'Argan et du LPS *in vitro* sur l'abondance des peroxysomes dans un modèle des fibroblastes d'un patient atteint de la Pseudo-adrénoleucodystrophie néonatale et nous avons montré que :

- Le traitement des fibroblastes P-NALD par l'huile d'argan induit la prolifération des peroxysomes indépendamment de l'activation à la fois du récepteur nucléaire PPAR $\alpha$  et son coactivateur PGC-1 $\alpha$ .
- Le traitement des fibroblastes P-NALD par le LPS a induit une augmentation de l'inflammation élucidée par l'induction de l'IL-6.
- Le traitement des fibroblastes P-NALD par le LPS induit la prolifération des peroxysomes accompagnée d'une activation de la transcription du récepteur nucléaire PPAR $\alpha$  et son coactivateur PGC-1 $\alpha$ .

Parallèlement aux travaux sur les fibroblastes, nous avons réalisé une étude *in vivo* sur des souris en traitant par l'huile d'Argan pour évaluer ses effets sur le métabolisme lipidique au niveau hépatique et nous avons montré que :

- Le traitement par l'huile d'Argan induit une régulation positive au niveau transcriptionnel de PPAR $\alpha$  et ses gènes cibles codant pour des protéines peroxysomales (ACOX1) ou mitochondriales (ACADM, ACADS). Au niveau des activités enzymatiques, cette régulation positive est confirmée uniquement pour la  $\beta$ -oxydation mitochondriale des acides gras et elle est plus marquée pour l'huile d'Argan que pour l'huile d'olive.
- Le traitement par l'huile d'Argan induit une régulation positive au niveau transcriptionnel des enzymes clés de la néoglucogenèse PEPCCK et G6PH.
- L'huile d'Argan a un effet antioxydant illustré par une induction de l'activité enzymatique de la catalase.

Par ailleurs, nous avons évalué le potentiel préventif et anti-inflammatoire de l'huile d'Argan contre la perturbation du métabolisme lipidique et l'inflammation provoquées par le LPS et nous avons montré que :

- La prévention de l'huile d'Argan au niveau transcriptionnel contre l'effet négatif de LPS sur le facteur de transcription PPAR $\alpha$  et le coactivateur PGC-1 $\alpha$  ainsi que leurs gènes cibles codant pour les enzymes clés de la  $\beta$ -oxydation au niveau peroxysomale ACOX1 et au niveau mitochondriale ACADS.
- La prévention de l'huile d'Argan au niveau transcriptionnel contre l'effet négatif de LPS sur les enzymes clés de la néoglucogenèse PEPCCK et G6PH.
- La prévention de l'huile d'Argan au niveau post-traductionnelle contre l'effet négatif de LPS sur l'activité enzymatique des enzymes clés de la  $\beta$ -oxydation au niveau peroxysomale ACOX1 et au niveau mitochondriale ACADS.
- L'effet anti-inflammatoire de l'huile d'Argan au niveau transcriptionnel par la diminution des biomarqueurs pro-inflammatoires IL6 et TNF $\alpha$ .
- L'effet anti-inflammatoire de l'huile d'Argan au niveau transcriptionnel par l'augmentation des biomarqueurs pro-inflammatoire IL-4 et IL-10.

L'ensemble des résultats de cette étude a montré pour la première fois au niveau moléculaire que l'huile d'Argan a un effet bénéfique sur le métabolisme lipidique ainsi qu'un potentiel préventif et anti-inflammatoire au niveau hépatique des souris.

# **PERSPECTIVES**

Dans notre étude nous avons montré que la conservation de l'acide férulique dans l'huile d'Argan varie en fonction du procédé d'extraction et de l'origine du fruit. En effet, dans la fraction phénolique de l'huile d'Argan artisanale, la proportion de l'acide férulique est plus importante par rapport à ce celle mentionnée dans la littérature. Il serait donc intéressant de faire une évaluation de la proportion et de la conservation de l'acide férulique des huiles d'Argan obtenues à partir des fruits d'autres origines géographique et avec d'autres méthodes d'extraction.

De plus, nous avons montré que l'huile d'Argan a un effet sur la prolifération des peroxyosomes chez les fibroblastes P-NALD. Il est donc important d'évaluer son effet sur la régulation de la biogenèse et des voies du métabolisme de la mitochondrie.

Par ailleurs, nous avons montré que l'huile d'Argan a un effet bénéfique sur le métabolisme lipidique ainsi qu'un potentiel préventif et anti-inflammatoire au niveau hépatique chez la souris. Ce qui nous pousse à poursuivre notre étude au niveau des tissus présentant une forte activité de métabolisme lipidique notamment le cœur les reins et le tissu adipeux. Chez l'homme, nous pourrions également étudier les effets de l'huile d'Argan sur des modèles cellulaires hépatiques telles que les HepG2 pour comparer avec nos résultats chez la souris et sur la lignée de macrophages humain THP1 pour étudier le potentiel anti-inflammatoire.

Cependant, les effets bénéfiques de l'huile d'Argan ainsi que son potentiel préventif et anti-inflammatoire sont dus à sa composition particulière riche en acides gras mono et polyinsaturés et en antioxydants tels que les polyphénols et les tocophérols. Il serait donc intéressant d'étudier les effets de ces composants sur le métabolisme lipidique pour caractériser dans la composition de cette huile naturelle les substances qui lui confèrent ces propriétés particulières.

Finalement, l'huile d'Argan représente un trésor des propriétés potentielles qui restent à élucider.

# **REFERENCES**

# **BIBLIOGRAPHIQUES**

- Adlouni, A. (2010). L'huile d'argan, de la nutrition à la santé. *Phytothérapie* 8, 89-97.
- Alaoui, K., Lagorce, J.F., Cherrah, Y., Hassar, M., Amarouch, H., and Roquebert, J. (1998). [Analgesic and anti-inflammatory activity of saponins of *Argania spinosa*]. *Ann Pharm Fr* 56, 220-228.
- Araujo, P., Zeng, Y., Du, Z.Y., Nguyen, T.T., Froyland, L., and Grung, B. (2010). Discrimination of n-3 rich oils by gas chromatography. *Lipids* 45, 1147-1158.
- Assy, N., Nassar, F., Nasser, G., and Grosovski, M. (2009). Olive oil consumption and non-alcoholic fatty liver disease. *World Journal of Gastroenterology* 15, 1809-1815.
- Ayorinde, F.O., Garvin, K., and Saeed, K. (2000). Determination of the fatty acid composition of saponified vegetable oils using matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom* 14, 608-615.
- Azeez, M.A., and Morakinyo, J.A. (2011). Genetic diversity of fatty acids in sesame and its relatives in Nigeria. *European Journal of Lipid Science and Technology* 113, 238-244.
- Bagattin, A., Hugendubler, L., and Mueller, E. (2010). Transcriptional coactivator PGC-1 $\alpha$  promotes peroxisomal remodeling and biogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107, 20376-20381.
- Bartlett, K., and Eaton, S. (2004). Mitochondrial beta-oxidation. *Eur J Biochem* 271, 462-469.
- Bellahcen, S., Mekhfi, H., Ziyat, A., Legssyer, A., Hakkou, A., Aziz, M., and Bnouham, M. (2012). Prevention of chemically induced diabetes mellitus in experimental animals by virgin argan oil. *Phytother Res* 26, 180-185.
- Benajiba, N., Morel, S., De Leiris, J., Boucher, F., Charrouf, Z., Mokhtar, N., and Aguenou, H. (2002). [The effect of argan oil on heart function during ischemia and reperfusion]. *Thérapie* 57, 246-252.
- Bennani, H., Drissi, A., Giton, F., Kheuang, L., Fiet, J., and Adlouni, A. (2007). Antiproliferative effect of polyphenols and sterols of virgin argan oil on human prostate cancer cell lines. *Cancer Detect Prev* 31, 64-69.
- Benzaria, A., Meskini, N., Dubois, M., Croset, M., Nemoz, G., Lagarde, M., and Prigent, A.F. (2006). Effect of dietary argan oil on fatty acid composition, proliferation, and phospholipase D activity of rat thymocytes. *Nutrition* 22, 628-637.
- Berrada, Y., Settaf, A., Baddouri, K., Cherrah, A., and Hassar, M. (2000). [Experimental evidence of an antihypertensive and hypocholesterolemic effect of oil of argan, *Argania sideroxylon*]. *Thérapie* 55, 375-378.
- Berrougui, H., Alvarez de Sotomayor, M., Perez-Guerrero, C., Ettaib, A., Hmamouchi, M., Marhuenda, E., and Herrera, M.D. (2004). Argan (*Argania spinosa*) oil lowers blood pressure and improves endothelial dysfunction in spontaneously hypertensive rats. *Br J Nutr* 92, 921-929.
- Berrougui, H., Ettaib, A., Herrera Gonzalez, M.D., Alvarez de Sotomayor, M., Bennani-Kabchi, N., and Hmamouchi, M. (2003). Hypolipidemic and hypocholesterolemic effect of argan oil (*Argania spinosa* L.) in Meriones shawi rats. *J Ethnopharmacol* 89, 15-18.
- Boden, G. (2003). Effects of free fatty acids on gluconeogenesis and glycogenolysis. *Life Sci* 72, 977-988.
- Bout, A., Teunissen, Y., Hashimoto, T., Benne, R., and Tager, J.M. (1988). Nucleotide sequence of human peroxisomal 3-oxoacyl-CoA thiolase. *Nucleic Acids Res* 16, 10369.



- Boveris, A., Oshino, N., and Chance, B. (1972). The cellular production of hydrogen peroxide. *Biochem J* 128, 617-630.
- Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry* 72, 248-254.
- Brash, A.R. (1999). Lipoxygenases: occurrence, functions, catalysis, and acquisition of substrate. *J Biol Chem* 274, 23679-23682.
- Brocard, C., Es-Souni, M., Ramirez, L.C., Latruffe, N., and Bournot, P. (1993). Stimulation of peroxisomal palmitoyl-CoA oxidase activity by ciprofibrate in hepatic cell lines: comparative studies in Fao, MH1C1 and HepG2 cells. *Biology of the cell / under the auspices of the European Cell Biology Organization* 77, 37-41.
- Brown, L.A., and Baker, A. (2003). Peroxisome biogenesis and the role of protein import. *J Cell Mol Med* 7, 388-400.
- Brown, M.S., and Goldstein, J.L. (1997). The SREBP pathway: regulation of cholesterol metabolism by proteolysis of a membrane-bound transcription factor. *Cell* 89, 331-340.
- Browning, J.D., and Horton, J.D. (2004). Molecular mediators of hepatic steatosis and liver injury. *J Clin Invest* 114, 147-152.
- Cabrera-Vique, C., Marfil, R., Gimenez, R., and Martinez-Augustin, O. (2012). Bioactive compounds and nutritional significance of virgin argan oil--an edible oil with potential as a functional food. *Nutr Rev* 70, 266-279.
- Calder, P.C. (2006). n-3 polyunsaturated fatty acids, inflammation, and inflammatory diseases. *Am J Clin Nutr* 83, 1505S-1519S.
- Camussi, G., Albano, E., Tetta, C., and Bussolino, F. (1991). The molecular action of tumor necrosis factor-alpha. *Eur J Biochem* 202, 3-14.
- Cao, W., Collins, Q.F., Becker, T.C., Robidoux, J., Lupo, E.G., Jr., Xiong, Y., Daniel, K.W., Floering, L., and Collins, S. (2005). p38 Mitogen-activated protein kinase plays a stimulatory role in hepatic gluconeogenesis. *J Biol Chem* 280, 42731-42737.
- Chakravarthy, M.V., Lodhi, I.J., Yin, L., Malapaka, R.R., Xu, H.E., Turk, J., and Semenkovich, C.F. (2009). Identification of a physiologically relevant endogenous ligand for PPARalpha in liver. *Cell* 138, 476-488.
- Chamouton, J., and Latruffe, N. (2012). PPARalpha/HNF4alpha interplay on diversified responsive elements. Relevance in the regulation of liver peroxisomal fatty acid catabolism. *Curr Drug Metab*.
- Chan, C.S., Ming-Lum, A., Golds, G.B., Lee, S.J., Anderson, R.J., and Mui, A.L. (2012). Interleukin-10 inhibits LPS induced TNFalpha translation through a SHIP1-dependent pathway. *J Biol Chem* 287, 38020-38027.
- Chao, W.W., Hong, Y.H., Chen, M.L., and Lin, B.F. (2010). Inhibitory effects of Angelica sinensis ethyl acetate extract and major compounds on NF-kappaB trans-activation activity and LPS-induced inflammation. *J Ethnopharmacol* 129, 244-249.
- Charrouf, Z., and Guillaume, D. (1999). Ethnoeconomical, ethnomedical, and phytochemical study of *Argania spinosa* (L.) Skeels. *J Ethnopharmacol* 67, 7-14.
- Charrouf, Z., and Guillaume, D. (2008). Argan oil: Occurrence, composition and impact on human health. *European Journal of Lipid Science and Technology* 110, 632-636.

- Charrouf, Z., and Guillaume, D. (2010). Should the amazigh diet (regular and moderate argan-oil consumption) have a beneficial impact on human health? *Crit Rev Food Sci Nutr* 50, 473-477.
- Cherkaoui-Malki, M., Meyer, K., Cao, W.Q., Latruffe, N., Yeldandi, A.V., Rao, M.S., Bradfield, C.A., and Reddy, J.K. (2001). Identification of novel peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PPARalpha) target genes in mouse liver using cDNA microarray analysis. *Gene Expression* 9, 291-304.
- Cherki, M., Berrougui, H., Drissi, A., Adlouni, A., and Khalil, A. (2006). Argan oil: which benefits on cardiovascular diseases? *Pharmacol Res* 54, 1-5.
- Cherki, M., Derouiche, A., Drissi, A., El Messal, M., Bamou, Y., Idrissi-Ouadghiri, A., Khalil, A., and Adlouni, A. (2005). Consumption of argan oil may have an antiatherogenic effect by improving paraoxonase activities and antioxidant status: Intervention study in healthy men. *Nutr Metab Cardiovas* 15, 352-360.
- Chinetti, G., Gbaguidi, F.G., Griglio, S., Mallat, Z., Antonucci, M., Poulain, P., Chapman, J., Fruchart, J.C., Tedgui, A., Najib-Fruchart, J., *et al.* (2000). CLA-1/SR-BI is expressed in atherosclerotic lesion macrophages and regulated by activators of peroxisome proliferator-activated receptors. *Circulation* 101, 2411-2417.
- Clarke, S.D. (2004). The multi-dimensional regulation of gene expression by fatty acids: polyunsaturated fats as nutrient sensors. *Current opinion in lipidology* 15, 13-18.
- Clostre, F. (2001). [Mitochondria: recent pathophysiological discoveries and new therapeutic perspectives]. *Ann Pharm Fr* 59, 3-21.
- Cooper, T.G., and Beevers, H. (1969). Beta oxidation in glyoxysomes from castor bean endosperm. *J Biol Chem* 244, 3514-3520.
- Cox, M.A., Jackson, J., Stanton, M., Rojas-Triana, A., Bober, L., Lavery, M., Yang, X., Zhu, F., Liu, J., Wang, S., *et al.* (2009). Short-chain fatty acids act as antiinflammatory mediators by regulating prostaglandin E(2) and cytokines. *World J Gastroenterol* 15, 5549-5557.
- Crisafulli, C., and Cuzzocrea, S. (2009). The role of endogenous and exogenous ligands for the peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PPAR-alpha) in the regulation of inflammation in macrophages. *Shock* 32, 62-73.
- Daitoku, H., Yamagata, K., Matsuzaki, H., Hatta, M., and Fukamizu, A. (2003). Regulation of PGC-1 promoter activity by protein kinase B and the forkhead transcription factor FKHR. *Diabetes* 52, 642-649.
- De Duve, C., and Baudhuin, P. (1966). Peroxisomes (microbodies and related particles). *Physiol Rev* 46, 323-357.
- Derouiche, A., Cherki, M., Drissi, A., Bamou, Y., El Messal, M., Idrissi-Oudghiri, A., Lecerf, J.M., and Adlouni, A. (2005a). Nutritional intervention study with argan oil in man: effects on lipids and apolipoproteins. *Ann Nutr Metab* 49, 196-201.
- Derouiche, A., Cherki, M., Drissi, A., Bamou, Y., El Messal, M., Idrissi-Oudghiri, A., Lecerf, J.M., and Adlouni, A. (2005b). Nutritional intervention study with argan oil in man: effects on lipids and apolipoproteins. *Annals of nutrition & metabolism* 49, 196-201.
- Desvergne, B., Michalik, L., and Wahli, W. (2006). Transcriptional regulation of metabolism. *Physiol Rev* 86, 465-514.
- Desvergne, B., and Wahli, W. (1999). Peroxisome proliferator-activated receptors: nuclear control of metabolism. *Endocr Rev* 20, 649-688.

- Diczfalusy, U. (1994). Beta-oxidation of eicosanoids. *Prog Lipid Res* 33, 403-428.
- DiRenzo, J., Soderstrom, M., Kurokawa, R., Ogliaastro, M.H., Ricote, M., Ingrey, S., Horlein, A., Rosenfeld, M.G., and Glass, C.K. (1997). Peroxisome proliferator-activated receptors and retinoic acid receptors differentially control the interactions of retinoid X receptor heterodimers with ligands, coactivators, and corepressors. *Mol Cell Biol* 17, 2166-2176.
- Donnelly, R.P., Dickensheets, H., and Finbloom, D.S. (1999). The interleukin-10 signal transduction pathway and regulation of gene expression in mononuclear phagocytes. *J Interferon Cytokine Res* 19, 563-573.
- Dowell, P., Ishmael, J.E., Avram, D., Peterson, V.J., Nevriy, D.J., and Leid, M. (1999). Identification of nuclear receptor corepressor as a peroxisome proliferator-activated receptor alpha interacting protein. *J Biol Chem* 274, 15901-15907.
- Dreyer, C., Krey, G., Keller, H., Givel, F., Helftenbein, G., and Wahli, W. (1992). Control of the peroxisomal beta-oxidation pathway by a novel family of nuclear hormone receptors. *Cell* 68, 879-887.
- Drissi, A., Bennani, H., Giton, F., Charrouf, Z., Fiet, J., and Adlouni, A. (2006). Tocopherols and saponins derived from *Argania spinosa* exert, an antiproliferative effect on human prostate cancer. *Cancer Invest* 24, 588-592.
- Drissi, A., Girona, J., Cherki, M., Godas, G., Derouiche, A., El Messal, M., Saile, R., Kettani, A., Sola, R., Masana, L., *et al.* (2004). Evidence of hypolipemiant and antioxidant properties of argan oil derived from the argan tree (*Argania spinosa*). *Clin Nutr* 23, 1159-1166.
- Eckert, J.H., and Erdmann, R. (2003). Peroxisome biogenesis. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 147, 75-121.
- El Mousadik, A., and Petit, R.J. (1996). Chloroplast DNA phylogeography of the argan tree of Morocco. *Mol Ecol* 5, 547-555.
- Erkkila, A.T., Matthan, N.R., Herrington, D.M., and Lichtenstein, A.H. (2006). Higher plasma docosahexaenoic acid is associated with reduced progression of coronary atherosclerosis in women with CAD. *J Lipid Res* 47, 2814-2819.
- Ernster, L., and Schatz, G. (1981). Mitochondria: a historical review. *J Cell Biol* 91, 227s-255s.
- Fang, Y., Morrell, J.C., Jones, J.M., and Gould, S.J. (2004). PEX3 functions as a PEX19 docking factor in the import of class I peroxisomal membrane proteins. *J Cell Biol* 164, 863-875.
- Feige, J.N., Gelman, L., Michalik, L., Desvergne, B., and Wahli, W. (2006). From molecular action to physiological outputs: peroxisome proliferator-activated receptors are nuclear receptors at the crossroads of key cellular functions. *Prog Lipid Res* 45, 120-159.
- Feingold, K., Kim, M.S., Shigenaga, J., Moser, A., and Grunfeld, C. (2004). Altered expression of nuclear hormone receptors and coactivators in mouse heart during the acute-phase response. *Am J Physiol* 286, E201-207.
- Feingold, K.R., Moser, A., Patzek, S.M., Shigenaga, J.K., and Grunfeld, C. (2009). Infection decreases fatty acid oxidation and nuclear hormone receptors in the diaphragm. *J Lipid Res* 50, 2055-2063.
- Feingold, K.R., Moser, A., Shigenaga, J.K., and Grunfeld, C. (2012). Inflammation inhibits the expression of phosphoenolpyruvate carboxykinase in liver and adipose tissue. *Innate Immun* 18, 231-240.

- Feingold, K.R., Wang, Y., Moser, A., Shigenaga, J.K., and Grunfeld, C. (2008). LPS decreases fatty acid oxidation and nuclear hormone receptors in the kidney. *J Lipid Res* 49, 2179-2187.
- Ferdinandusse, S., Barker, S., Lachlan, K., Duran, M., Waterham, H.R., Wanders, R.J., and Hammans, S. (2010). Adult peroxisomal acyl-coenzyme A oxidase deficiency with cerebellar and brainstem atrophy. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 81, 310-312.
- Ferdinandusse, S., Denis, S., Hogenhout, E.M., Koster, J., van Roermund, C.W., L, I.J., Moser, A.B., Wanders, R.J., and Waterham, H.R. (2007). Clinical, biochemical, and mutational spectrum of peroxisomal acyl-coenzyme A oxidase deficiency. *Hum Mutat* 28, 904-912.
- Fernandez-Marcos, P.J., and Auwerx, J. (2011). Regulation of PGC-1alpha, a nodal regulator of mitochondrial biogenesis. *Am J Clin Nutr* 93, 884S-890.
- Ferramosca, A., Savy, V., and Zara, V. (2008). Olive oil increases the hepatic triacylglycerol content in mice by a distinct influence on the synthesis and oxidation of fatty acids. *Biosci, Biotechnol, Biochem* 72, 62-69.
- Fiers, W. (1991). Tumor necrosis factor. Characterization at the molecular, cellular and in vivo level. *FEBS Lett* 285, 199-212.
- Filip, S., Hribar, J., and Vidrih, R. (2011). Influence of natural antioxidants on the formation of trans-fatty-acid isomers during heat treatment of sunflower oil. *European Journal of Lipid Science and Technology* 113, 224-230.
- Fito, M., Guxens, M., Corella, D., Saez, G., Estruch, R., de la Torre, R., Frances, F., Cabezas, C., Lopez-Sabater Mdel, C., Marrugat, J., *et al.* (2007). Effect of a traditional Mediterranean diet on lipoprotein oxidation: a randomized controlled trial. *Arch Intern Med* 167, 1195-1203.
- Forman, B.M., Chen, J., and Evans, R.M. (1997). Hypolipidemic drugs, polyunsaturated fatty acids, and eicosanoids are ligands for peroxisome proliferator-activated receptors alpha and delta. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 4312-4317.
- Fujiki, Y., Matsuzono, Y., Matsuzaki, T., and Fransen, M. (2006). Import of peroxisomal membrane proteins: the interplay of Pex3p- and Pex19p-mediated interactions. *Biochim Biophys Acta* 1763, 1639-1646.
- Gabalton, T. (2010). Peroxisome diversity and evolution. *Philos Trans R Soc Lond, Ser B: Biol Sci* 365, 765-773.
- Gharby, S., Harhar, H., Guillaume, D., Haddad, A., and Charrouf, Z. (2012). The origin of virgin argan oil's high oxidative stability unraveled. *Nat Prod Commun* 7, 621-624.
- Girard, J. (2003). [Contribution of free fatty acids to impairment of insulin secretion and action: mechanism of beta-cell lipotoxicity]. *Med Sci (Paris)* 19, 827-833.
- Girzalsky, W., Saffian, D., and Erdmann, R. (2010). Peroxisomal protein translocation. *Biochim Biophys Acta* 1803, 724-731.
- Glass, C.K., and Rosenfeld, M.G. (2000). The coregulator exchange in transcriptional functions of nuclear receptors. *Genes Dev* 14, 121-141.
- Gonzalez, G. (1997). Ibn al-Baytār et ses apports à la botanique et à la pharmacologie dans le Kitāb al-Ġāmī. *Médiévales*, 23-39.
- González .A., A.S., de la Guardia.M. (2010). Adulteration detection of argan oil by inductively coupled plasma optical emission spectrometry. *Food Chemistry*, 878-886.

- Guillaume, D., and Charrouf, Z. (2011). Argan oil. Monograph. *Altern Med Rev* 16, 275-279.
- Gulick, T., Cresci, S., Caira, T., Moore, D.D., and Kelly, D.P. (1994). The peroxisome proliferator-activated receptor regulates mitochondrial fatty acid oxidative enzyme gene expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 11012-11016.
- Harhar, H., Gharby, S., Kartah, B., El Monfalouti, H., Guillaume, D., and Charrouf, Z. (2011). Influence of argan kernel roasting-time on virgin argan oil composition and oxidative stability. *Plant Foods Hum Nutr* 66, 163-168.
- Hashimoto, T. (1999). Peroxisomal beta-oxidation enzymes. *Neurochem Res* 24, 551-563.
- Hebbachi, A.M., Knight, B.L., Wiggins, D., Patel, D.D., and Gibbons, G.F. (2008). Peroxisome proliferator-activated receptor alpha deficiency abolishes the response of lipogenic gene expression to re-feeding: restoration of the normal response by activation of liver X receptor alpha. *J Biol Chem* 283, 4866-4876.
- Herzig, S., Long, F., Jhala, U.S., Hedrick, S., Quinn, R., Bauer, A., Rudolph, D., Schutz, G., Yoon, C., Puigserver, P., *et al.* (2001). CREB regulates hepatic gluconeogenesis through the coactivator PGC-1. *Nature* 413, 179-183.
- Hilali, M., Charrouf, Z., Soulhi Ael, A., Hachimi, L., and Guillaume, D. (2005). Influence of origin and extraction method on argan oil physico-chemical characteristics and composition. *J Agric Food Chem* 53, 2081-2087.
- Hoepfner, D., Schildknegt, D., Braakman, I., Philippsen, P., and Tabak, H.F. (2005). Contribution of the endoplasmic reticulum to peroxisome formation. *Cell* 122, 85-95.
- Hostetler, H.A., Petrescu, A.D., Kier, A.B., and Schroeder, F. (2005). Peroxisome proliferator-activated receptor alpha interacts with high affinity and is conformationally responsive to endogenous ligands. *J Biol Chem* 280, 18667-18682.
- Hotchkiss, R.S., and Karl, I.E. (2003). The pathophysiology and treatment of sepsis. *New Engl J Med* 348, 138-150.
- Huss, J.M., Kopp, R.P., and Kelly, D.P. (2002). Peroxisome proliferator-activated receptor coactivator-1alpha (PGC-1alpha) coactivates the cardiac-enriched nuclear receptors estrogen-related receptor-alpha and -gamma. Identification of novel leucine-rich interaction motif within PGC-1alpha. *J Biol Chem* 277, 40265-40274.
- Islinger, M., Grille, S., Fahimi, H.D., and Schrader, M. (2012). The peroxisome: an update on mysteries. *Histochem Cell Biol* 137, 547-574.
- Issemann, I., and Green, S. (1990). Activation of a member of the steroid hormone receptor superfamily by peroxisome proliferators. *Nature* 347, 645-650.
- Jezek, P., and Hlavata, L. (2005). Mitochondria in homeostasis of reactive oxygen species in cell, tissues, and organism. *Int J Biochem Cell Biol* 37, 2478-2503.
- Jones, D.C., Ding, X., and Daynes, R.A. (2002). Nuclear receptor peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PPARalpha) is expressed in resting murine lymphocytes. The PPARalpha in T and B lymphocytes is both transactivation and transrepression competent. *J Biol Chem* 277, 6838-6845.
- Julius, U. (2003). Influence of plasma free fatty acids on lipoprotein synthesis and diabetic dyslipidemia. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 111, 246-250.
- Jump, D.B. (2011). Fatty acid regulation of hepatic lipid metabolism. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 14, 115-120.



- Jump, D.B., Botolin, D., Wang, Y., Xu, J., Christian, B., and Demeure, O. (2005). Fatty acid regulation of hepatic gene transcription. *J Nutr* 135, 2503-2506.
- Karoui, I.J., Wannan, W.A., and Marzouk, B. (2010). Refined corn oil aromatization by Citrus aurantium peel essential oil. *Ind Crop Prod* 32, 202-207.
- Khallouki, F., Younos, C., Soulimani, R., Oster, T., Charrouf, Z., Spiegelhalder, B., Bartsch, H., and Owen, R.W. (2003). Consumption of argan oil (Morocco) with its unique profile of fatty acids, tocopherols, squalene, sterols and phenolic compounds should confer valuable cancer chemopreventive effects. *Eur J Cancer Prev* 12, 67-75.
- Khovidhunkit, W., Kim, M.S., Memon, R.A., Shigenaga, J.K., Moser, A.H., Feingold, K.R., and Grunfeld, C. (2004). Effects of infection and inflammation on lipid and lipoprotein metabolism: mechanisms and consequences to the host. *J Lipid Res* 45, 1169-1196.
- Kidani, Y., and Bensinger, S.J. (2012). Liver X receptor and peroxisome proliferator-activated receptor as integrators of lipid homeostasis and immunity. *Immunol Rev* 249, 72-83.
- Kiel, J.A., Veenhuis, M., and van der Klei, I.J. (2006). PEX genes in fungal genomes: common, rare or redundant. *Traffic* 7, 1291-1303.
- Kim, M.S., Sweeney, T.R., Shigenaga, J.K., Chui, L.G., Moser, A., Grunfeld, C., and Feingold, K.R. (2007). Tumor necrosis factor and interleukin 1 decrease RXRalpha, PPARalpha, PPARgamma, LXRAalpha, and the coactivators SRC-1, PGC-1alpha, and PGC-1beta in liver cells. *Metabolism: clinical and experimental* 56, 267-279.
- Kliwer, S.A., Umesono, K., Noonan, D.J., Heyman, R.A., and Evans, R.M. (1992). Convergence of 9-cis retinoic acid and peroxisome proliferator signalling pathways through heterodimer formation of their receptors. *Nature* 358, 771-774.
- Kono, K., Kamijo, Y., Hora, K., Takahashi, K., Higuchi, M., Kiyosawa, K., Shigematsu, H., Gonzalez, F.J., and Aoyama, T. (2009). PPAR{alpha} attenuates the proinflammatory response in activated mesangial cells. *Am J Physiol* 296, F328-336.
- Kurian, M.A., Ryan, S., Besley, G.T., Wanders, R.J., and King, M.D. (2004). Straight-chain acyl-CoA oxidase deficiency presenting with dysmorphia, neurodevelopmental autistic-type regression and a selective pattern of leukodystrophy. *J Inherited Metab Dis* 27, 105-108.
- Lapointe, A., Couillard, C., and Lemieux, S. (2006). Effects of dietary factors on oxidation of low-density lipoprotein particles. *J Nutr Biochem* 17, 645-658.
- Larrouy, D., Vidal, H., Andreelli, F., Laville, M., and Langin, D. (1999). Cloning and mRNA tissue distribution of human PPARgamma coactivator-1. *Int J Obes Relat Metab Disord* 23, 1327-1332.
- Lazarow, P.B. (2003). Peroxisome biogenesis: advances and conundrums. *Curr Opin Cell Biol* 15, 489-497.
- Lazarow, P.B., and De Duve, C. (1976). A fatty acyl-CoA oxidizing system in rat liver peroxisomes; enhancement by clofibrate, a hypolipidemic drug. *Proc Natl Acad Sci U S A* 73, 2043-2046.
- Lazarow, P.B., and Fujiki, Y. (1985). Biogenesis of peroxisomes. *Annu Rev Cell Biol* 1, 489-530.
- Lea, W., Abbas, A.S., Sprecher, H., Vockley, J., and Schulz, H. (2000). Long-chain acyl-CoA dehydrogenase is a key enzyme in the mitochondrial beta-oxidation of unsaturated fatty acids. *Biochim Biophys Acta* 1485, 121-128.

- Lefebvre, P., Chinetti, G., Fruchart, J.C., and Staels, B. (2006). Sorting out the roles of PPAR alpha in energy metabolism and vascular homeostasis. *J Clin Invest* 116, 571-580.
- Lichtenthaler, H.K., and Schweiger, J. (1998). Cell wall bound ferulic acid, the major substance of the blue-green fluorescence emission of plants. *J Plant Physiol* 152, 272-282.
- Lin, J., Handschin, C., and Spiegelman, B.M. (2005). Metabolic control through the PGC-1 family of transcription coactivators. *Cell Metab* 1, 361-370.
- Lock, E.A., Mitchell, A.M., and Elcombe, C.R. (1989). Biochemical mechanisms of induction of hepatic peroxisome proliferation. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 29, 145-163.
- Louet, J.F., Hayhurst, G., Gonzalez, F.J., Girard, J., and Decaux, J.F. (2002). The coactivator PGC-1 is involved in the regulation of the liver carnitine palmitoyltransferase I gene expression by cAMP in combination with HNF4 alpha and cAMP-response element-binding protein (CREB). *J Biol Chem* 277, 37991-38000.
- Maguire, L.S., O'Sullivan, S.M., Galvin, K., O'Connor, T.P., and O'Brien, N.M. (2004). Fatty acid profile, tocopherol, squalene and phytosterol content of walnuts, almonds, peanuts, hazelnuts and the macadamia nut. *Int J Food Sci Nutr* 55, 171-178.
- Marcus, S.L., Miyata, K.S., Zhang, B., Subramani, S., Rachubinski, R.A., and Capone, J.P. (1993). Diverse peroxisome proliferator-activated receptors bind to the peroxisome proliferator-responsive elements of the rat hydratase/dehydrogenase and fatty acyl-CoA oxidase genes but differentially induce expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 5723-5727.
- Marfil R, Giménez R, Martínez O, Bouzas P.R, Rufián-Henares J.A, Mesías M, and C, C.-V. (2011). Determination of polyphenols, tocopherols, and antioxidant capacity in virgin argan oil (*Argania spinosa*, Skeels). *European Journal of Lipid Science and Technology* 113, 886-893.
- Marfil, R., Cabrera-Vique, C., Gimenez, R., Bouzas, P.R., Martinez, O., and Sanchez, J.A. (2008). Metal content and physicochemical parameters used as quality criteria in virgin argan oil: influence of the extraction method. *J Agric Food Chem* 56, 7279-7284.
- Martin, G., Schoonjans, K., Lefebvre, A.M., Staels, B., and Auwerx, J. (1997). Coordinate regulation of the expression of the fatty acid transport protein and acyl-CoA synthetase genes by PPARalpha and PPARgamma activators. *J Biol Chem* 272, 28210-28217.
- Matthäus, B., Guillaume, D., Gharby, S., Haddad, A., Harhar, H., and Charrouf, Z. (2010). Effect of processing on the quality of edible argan oil. *Food Chemistry* 120, 426-432.
- Matthäus, B., and Spener, F. (2008). What we know and what we should know about virgin oils a general introduction. *European Journal of Lipid Science and Technology* 110, 597-601.
- McNew, J.A., and Goodman, J.M. (1994). An oligomeric protein is imported into peroxisomes in vivo. *J Cell Biol* 127, 1245-1257.
- Meng, R.S., Pei, Z.H., Yin, R., Zhang, C.X., Chen, B.L., Zhang, Y., Liu, D., Xu, A.L., and Dong, Y.G. (2009). Adenosine monophosphate-activated protein kinase inhibits cardiac hypertrophy through reactivating peroxisome proliferator-activated receptor-alpha signaling pathway. *Eur J Pharmacol* 620, 63-70.
- Meyer, S., Cartelat, A., Moya, I., and Cerovic, Z.G. (2003). UV-induced blue-green and far-red fluorescence along wheat leaves: a potential signature of leaf ageing. *J Exp Bot* 54, 757-769.
- Michael, L.F., Wu, Z., Cheatham, R.B., Puigserver, P., Adelmant, G., Lehman, J.J., Kelly, D.P., and Spiegelman, B.M. (2001). Restoration of insulin-sensitive glucose transporter

- (GLUT4) gene expression in muscle cells by the transcriptional coactivator PGC-1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 3820-3825.
- Miles, E.A., Zoubouli, P., and Calder, P.C. (2005). Differential anti-inflammatory effects of phenolic compounds from extra virgin olive oil identified in human whole blood cultures. *Nutrition* 21, 389-394.
- Miyazawa, S., Hayashi, H., Hijikata, M., Ishii, N., Furuta, S., Kagamiyama, H., Osumi, T., and Hashimoto, T. (1987). Complete nucleotide sequence of cDNA and predicted amino acid sequence of rat acyl-CoA oxidase. *J Biol Chem* 262, 8131-8137.
- Moldovan, L., and Moldovan, N.I. (2004). Oxygen free radicals and redox biology of organelles. *Histochem Cell Biol* 122, 395-412.
- Monfalouti, H.E., Guillaume, D., Denhez, C., and Charrouf, Z. (2010). Therapeutic potential of argan oil: a review. *J Pharm Pharmacol* 62, 1669-1675.
- Mootha, V.K., Handschin, C., Arlow, D., Xie, X., St Pierre, J., Sihag, S., Yang, W., Altshuler, D., Puigserver, P., Patterson, N., *et al.* (2004). Erralpha and Gabpa/b specify PGC-1alpha-dependent oxidative phosphorylation gene expression that is altered in diabetic muscle. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 6570-6575.
- Morton, J., Voss, G (1986). The argan tree (*Argania sideroxylon*, Sapotaceae), a desert source of edible oil. *Economic Botany* 41, 221-233.
- Msanda, F.A.E.A., J.P. Peltier (2005). Biodiversité et biogéographie de l'arganeraie marocaine. *Cahiers Agricultures* 14.
- Murase, T., Misawa, K., Minegishi, Y., Aoki, M., Ominami, H., Suzuki, Y., Shibuya, Y., and Hase, T. (2011). Coffee polyphenols suppress diet-induced body fat accumulation by downregulating SREBP-1c and related molecules in C57BL/6J mice. *American journal of physiology Endocrinology and metabolism* 300, E122-133.
- Nakbi, A., Tayeb, W., Grissa, A., Issaoui, M., Dabbou, S., Chargui, I., Ellouz, M., Miled, A., and Hammami, M. (2010). Effects of olive oil and its fractions on oxidative stress and the liver's fatty acid composition in 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid-treated rats. *Nutr Metab* 7, 80.
- Ng, V.Y., Huang, Y., Reddy, L.M., Falck, J.R., Lin, E.T., and Kroetz, D.L. (2007). Cytochrome P450 eicosanoids are activators of peroxisome proliferator-activated receptor alpha. *Drug Metab Disposition* 35, 1126-1134.
- Ni, X., Quisenberry, S.S., Heng-Moss, T., Markwell, J., Sarath, G., Klucas, R., and Baxendale, F. (2001). Oxidative responses of resistant and susceptible cereal leaves to symptomatic and nonsymptomatic cereal aphid (Hemiptera: Aphididae) feeding. *Journal of economic entomology* 94, 743-751.
- Novikoff.A.B., S.Y. (1964). The endoplasmic reticulum in the golgi zone and ist relations to microbodies, golgiapparatus and autophagic vacuoles in rat liver cells. *Mikros Oxford*, 187–206.
- Nuclear Receptors Nomenclature, C. (1999). A unified nomenclature system for the nuclear receptor superfamily. *Cell* 97, 161-163.
- Oberkofler, H., Schraml, E., Krempler, F., and Patsch, W. (2003). Potentiation of liver X receptor transcriptional activity by peroxisome-proliferator-activated receptor gamma co-activator 1 alpha. *Biochem J* 371, 89-96.



- Ollivier, D., Artaud, J., Pinatel, C., Durbec, J.P., and Guerere, M. (2003). Triacylglycerol and fatty acid compositions of French virgin olive oils. Characterization by chemometrics. *J Agric Food Chem* *51*, 5723-5731.
- Onate, S.A., Tsai, S.Y., Tsai, M.J., and O'Malley, B.W. (1995). Sequence and characterization of a coactivator for the steroid hormone receptor superfamily. *Science* *270*, 1354-1357.
- Osumi, T. (1993). Structure and expression of the genes encoding peroxisomal beta-oxidation enzymes. *Biochimie* *75*, 243-250.
- Ouali, F., Djouadi, F., Merlet-Benichou, C., Riveau, B., and Bastin, J. (2000). Regulation of fatty acid transport protein and mitochondrial and peroxisomal beta-oxidation gene expression by fatty acids in developing rats. *Pediatr Res* *48*, 691-696.
- Ould Mohamedou, M.M., Zouirech, K., El Messal, M., El Kebbjaj, M.S., Chraibi, A., and Adlouni, A. (2011). Argan Oil Exerts an Antiatherogenic Effect by Improving Lipids and Susceptibility of LDL to Oxidation in Type 2 Diabetes Patients. *Int J Endocrinol* *2011*, 747835.
- Pellegrini, N., Serafini, M., Colombi, B., Del Rio, D., Salvatore, S., Bianchi, M., and Brighenti, F. (2003). Total antioxidant capacity of plant foods, beverages and oils consumed in Italy assessed by three different in vitro assays. *J Nutr* *133*, 2812-2819.
- Peyrou, M., Ramadori, P., Bourgoïn, L., and Foti, M. (2012). PPARs in Liver Diseases and Cancer: Epigenetic Regulation by MicroRNAs. *PPAR Res* *2012*, 757803.
- Pfaffl, M.W., Horgan, G.W., and Dempfle, L. (2002). Relative expression software tool (REST) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. *Nucleic acids research* *30*, e36.
- Platta, H.W., and Erdmann, R. (2007a). Peroxisomal dynamics. *Trends Cell Biol* *17*, 474-484.
- Platta, H.W., and Erdmann, R. (2007b). The peroxisomal protein import machinery. *FEBS Lett* *581*, 2811-2819.
- Poirier, Y., Antonenkov, V.D., Glumoff, T., and Hiltunen, J.K. (2006). Peroxisomal beta-oxidation--a metabolic pathway with multiple functions. *Biochim Biophys Acta* *1763*, 1413-1426.
- Poll-The, B.T., Roels, F., Ogier, H., Scotto, J., Vamecq, J., Schutgens, R.B., Wanders, R.J., van Roermund, C.W., van Wijland, M.J., Schram, A.W., *et al.* (1988). A new peroxisomal disorder with enlarged peroxisomes and a specific deficiency of acyl-CoA oxidase (pseudoneonatal adrenoleukodystrophy). *Am J Hum Genet* *42*, 422-434.
- Portillo, M.P., Chavarri, M., Duran, D., Rodriguez, V.M., and Macarulla, M.T. (2001). Differential effects of diets that provide different lipid sources on hepatic lipogenic activities in rats under ad libitum or restricted feeding. *Nutrition* *17*, 467-473.
- Postic, C., Dentin, R., and Girard, J. (2004). Role of the liver in the control of carbohydrate and lipid homeostasis. *Diabetes Metab* *30*, 398-408.
- Priore, P., Stanca, E., Gnoni, G.V., and Siculella, L. (2012). Dietary fat types differently modulate the activity and expression of mitochondrial carnitine/acylcarnitine translocase in rat liver. *Biochim Biophys Acta* *1821*, 1341-1349.
- Puigserver, P., Rhee, J., Donovan, J., Walkey, C.J., Yoon, J.C., Oriente, F., Kitamura, Y., Altomonte, J., Dong, H., Accili, D., *et al.* (2003). Insulin-regulated hepatic gluconeogenesis through FOXO1-PGC-1alpha interaction. *Nature* *423*, 550-555.

- Puigserver, P., Rhee, J., Lin, J., Wu, Z., Yoon, J.C., Zhang, C.Y., Krauss, S., Mootha, V.K., Lowell, B.B., and Spiegelman, B.M. (2001). Cytokine stimulation of energy expenditure through p38 MAP kinase activation of PPARgamma coactivator-1. *Mol Cell* 8, 971-982.
- Puigserver, P., and Spiegelman, B.M. (2003). Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator 1 alpha (PGC-1 alpha): transcriptional coactivator and metabolic regulator. *Endocr Rev* 24, 78-90.
- Puigserver, P., Wu, Z., Park, C.W., Graves, R., Wright, M., and Spiegelman, B.M. (1998). A cold-inducible coactivator of nuclear receptors linked to adaptive thermogenesis. *Cell* 92, 829-839.
- Pyper, S.R., Viswakarma, N., Yu, S., and Reddy, J.K. (2010). PPARalpha: energy combustion, hypolipidemia, inflammation and cancer. *Nucl Recept Signal* 8, e002.
- Qin, Y.M., Marttila, M.S., Haapalainen, A.M., Siivari, K.M., Glumoff, T., and Hiltunen, J.K. (1999). Yeast peroxisomal multifunctional enzyme: (3R)-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase domains A and B are required for optimal growth on oleic acid. *J Biol Chem* 274, 28619-28625.
- Qin, Y.M., Poutanen, M.H., Helander, H.M., Kvist, A.P., Siivari, K.M., Schmitz, W., Conzelmann, E., Hellman, U., and Hiltunen, J.K. (1997). Peroxisomal multifunctional enzyme of beta-oxidation metabolizing D-3-hydroxyacyl-CoA esters in rat liver: molecular cloning, expression and characterization. *Biochem J* 321 ( Pt 1), 21-28.
- Reddy, J.K. (2004). Peroxisome proliferators and peroxisome proliferator-activated receptor alpha: biotic and xenobiotic sensing. *American Journal of Pathology* 164, 2305-2321.
- Reddy, J.K., and Hashimoto, T. (2001). Peroxisomal beta-oxidation and peroxisome proliferator-activated receptor alpha: an adaptive metabolic system. *Annu Rev Nutr* 21, 193-230.
- Reddy, J.K., and Rao, M.S. (2006). Lipid metabolism and liver inflammation. II. Fatty liver disease and fatty acid oxidation. *Am J Physiol* 290, G852-858.
- Ren, B., Thelen, A.P., Peters, J.M., Gonzalez, F.J., and Jump, D.B. (1997). Polyunsaturated fatty acid suppression of hepatic fatty acid synthase and S14 gene expression does not require peroxisome proliferator-activated receptor alpha. *J Biol Chem* 272, 26827-26832.
- Rosewich, H., Waterham, H.R., Wanders, R.J., Ferdinandusse, S., Henneke, M., Hunneman, D., and Gartner, J. (2006). Pitfall in metabolic screening in a patient with fatal peroxisomal beta-oxidation defect. *Neuropediatrics* 37, 95-98.
- Rubio, M., Alvarez-Orti, M., Alvarruiz, A., Fernandez, E., and Pardo, J.E. (2009). Characterization of oil obtained from grape seeds collected during berry development. *J Agric Food Chem* 57, 2812-2815.
- Samane, S., Christon, R., Dombrowski, L., Turcotte, S., Charrouf, Z., Lavigne, C., Levy, E., Bachelard, H., Amarouch, H., Marette, A., *et al.* (2009). Fish oil and argan oil intake differently modulate insulin resistance and glucose intolerance in a rat model of dietary-induced obesity. *Metabolism: clinical and experimental* 58, 909-919.
- Samane, S., Noel, J., Charrouf, Z., Amarouch, H., and Haddad, P.S. (2006). Insulin-sensitizing and anti-proliferative effects of *Argania spinosa* seed extracts. *Evid Based Complement Alternat Med* 3, 317-327.
- Sanderson, L.M., Degenhardt, T., Koppen, A., Kalkhoven, E., Desvergne, B., Muller, M., and Kersten, S. (2009). Peroxisome proliferator-activated receptor beta/delta (PPARbeta/delta) but

not PPARalpha serves as a plasma free fatty acid sensor in liver. *Mol Cell Biol* 29, 6257-6267.

Schliebs, W., and Kunau, W.H. (2004). Peroxisome membrane biogenesis: the stage is set. *Curr Biol* 14, R397-399.

Schoonjans, K., Watanabe, M., Suzuki, H., Mahfoudi, A., Krey, G., Wahli, W., Grimaldi, P., Staels, B., Yamamoto, T., and Auwerx, J. (1995). Induction of the acyl-coenzyme A synthetase gene by fibrates and fatty acids is mediated by a peroxisome proliferator response element in the C promoter. *J Biol Chem* 270, 19269-19276.

Schrader, M., and Fahimi, H.D. (2006). Peroxisomes and oxidative stress. *Biochim Biophys Acta* 1763, 1755-1766.

Schrader, M., and Fahimi, H.D. (2008). The peroxisome: still a mysterious organelle. *Histochem Cell Biol* 129, 421-440.

Schrader, M., and Yoon, Y. (2007). Mitochondria and peroxisomes: are the 'big brother' and the 'little sister' closer than assumed? *BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology* 29, 1105-1114.

Schreiber, S.N., Emter, R., Hock, M.B., Knutti, D., Cardenas, J., Podvinec, M., Oakeley, E.J., and Kralli, A. (2004). The estrogen-related receptor alpha (ERRalpha) functions in PPARgamma coactivator 1alpha (PGC-1alpha)-induced mitochondrial biogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 6472-6477.

Schreurs, M., Kuipers, F., and van der Leij, F.R. (2010). Regulatory enzymes of mitochondrial beta-oxidation as targets for treatment of the metabolic syndrome. *Obes Rev* 11, 380-388.

Seedorf, U., Brysch, P., Engel, T., Schrage, K., and Assmann, G. (1994). Sterol carrier protein X is peroxisomal 3-oxoacyl coenzyme A thiolase with intrinsic sterol carrier and lipid transfer activity. *J Biol Chem* 269, 21277-21283.

Seki, Y., Hayashi, K., Matsumoto, A., Seki, N., Tsukada, J., Ransom, J., Naka, T., Kishimoto, T., Yoshimura, A., and Kubo, M. (2002). Expression of the suppressor of cytokine signaling-5 (SOCS5) negatively regulates IL-4-dependent STAT6 activation and Th2 differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 13003-13008.

Soriguer, F., Morcillo, S., Cardona, F., Rojo-Martinez, G., de la Cruz Almaraz, M., Ruiz de Adana Mde, L., Oliveira, G., Tinahones, F., and Esteva, I. (2006). Pro12Ala polymorphism of the PPARG2 gene is associated with type 2 diabetes mellitus and peripheral insulin sensitivity in a population with a high intake of oleic acid. *J Nutr* 136, 2325-2330.

Sozio, M., and Crabb, D.W. (2008). Alcohol and lipid metabolism. *Am J Physiol* 295, E10-16.

Srinivasan, M., Sudheer, A.R., and Menon, V.P. (2007). Ferulic Acid: therapeutic potential through its antioxidant property. *J Clin Biochem Nutr* 40, 92-100.

Steinbusch, L.K., Schwenk, R.W., Ouwens, D.M., Diamant, M., Glatz, J.F., and Luiken, J.J. (2011). Subcellular trafficking of the substrate transporters GLUT4 and CD36 in cardiomyocytes. *Cell Mol Life Sci* 68, 2525-2538.

Stienstra, R., Saudale, F., Duval, C., Keshkar, S., Groener, J.E., van Rooijen, N., Staels, B., Kersten, S., and Muller, M. (2010). Kupffer cells promote hepatic steatosis via interleukin-1beta-dependent suppression of peroxisome proliferator-activated receptor alpha activity. *Hepatology* 51, 511-522.

- Sultana, R., Ravagna, A., Mohmmad-Abdul, H., Calabrese, V., and Butterfield, D.A. (2005). Ferulic acid ethyl ester protects neurons against amyloid beta-peptide(1-42)-induced oxidative stress and neurotoxicity: relationship to antioxidant activity. *Journal of neurochemistry* 92, 749-758.
- Sundaram, J., Kandala, C.V., Holser, R.A., ButtsetWilliam, C.L., and Windham, R. (2010). Determination of in-shell peanut oil and fatty acid composition using near-infrared reflectance spectroscopy. *J Am Oil Chem Soc* 87, 1103-1114.
- Suzuki, A., Yamamoto, M., Jokura, H., Fujii, A., Tokimitsu, I., Hase, T., and Saito, I. (2007). Ferulic acid restores endothelium-dependent vasodilation in aortas of spontaneously hypertensive rats. *Am J Hypertens* 20, 508-513.
- Suzuki, Y., Iai, M., Kamei, A., Tanabe, Y., Chida, S., Yamaguchi, S., Zhang, Z., Takemoto, Y., Shimozawa, N., and Kondo, N. (2002). Peroxisomal acyl CoA oxidase deficiency. *J Pediatr* 140, 128-130.
- Suzuki, Y., Shimozawa, N., Yajima, S., Tomatsu, S., Kondo, N., Nakada, Y., Akaboshi, S., Lai, M., Tanabe, Y., Hashimoto, T., *et al.* (1994). Novel subtype of peroxisomal acyl-CoA oxidase deficiency and bifunctional enzyme deficiency with detectable enzyme protein: identification by means of complementation analysis. *Am J Hum Genet* 54, 36-43.
- Takeuchi, H., Nakamoto, T., Mori, Y., Kawakami, M., Mabuchi, H., Ohishi, Y., Ichikawa, N., Koike, A., and Masuda, K. (2001). Comparative effects of dietary fat types on hepatic enzyme activities related to the synthesis and oxidation of fatty acid and to lipogenesis in rats. *Biosci, Biotechnol, Biochem* 65, 1748-1754.
- Tiraby, C., and Langin, D. (2005). [PGC-1 $\alpha$ , a transcriptional coactivator involved in metabolism]. *Med Sci (Paris)* 21, 49-54.
- Tiraby, C., Tavernier, G., Lefort, C., Larrouy, D., Bouillaud, F., Ricquier, D., and Langin, D. (2003). Acquisition of brown fat cell features by human white adipocytes. *J Biol Chem* 278, 33370-33376.
- Tugwood, J.D., Issemann, I., Anderson, R.G., Bundell, K.R., McPheat, W.L., and Green, S. (1992). The mouse peroxisome proliferator activated receptor recognizes a response element in the 5' flanking sequence of the rat acyl CoA oxidase gene. *EMBO J* 11, 433-439.
- Van Veldhoven, P.P., Vanhove, G., Asselberghs, S., Eyssen, H.J., and Mannaerts, G.P. (1992). Substrate specificities of rat liver peroxisomal acyl-CoA oxidases: palmitoyl-CoA oxidase (inducible acyl-CoA oxidase), pristanoyl-CoA oxidase (non-inducible acyl-CoA oxidase), and trihydroxycoprostanoyl-CoA oxidase. *J Biol Chem* 267, 20065-20074.
- Vanhove, G.F., Van Veldhoven, P.P., Fransen, M., Denis, S., Eyssen, H.J., Wanders, R.J., and Mannaerts, G.P. (1993). The CoA esters of 2-methyl-branched chain fatty acids and of the bile acid intermediates di- and trihydroxycoprostanic acids are oxidized by one single peroxisomal branched chain acyl-CoA oxidase in human liver and kidney. *J Biol Chem* 268, 10335-10344.
- Varanasi, U., Chu, R., Chu, S., Espinosa, R., LeBeau, M.M., and Reddy, J.K. (1994). Isolation of the human peroxisomal acyl-CoA oxidase gene: organization, promoter analysis, and chromosomal localization. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 3107-3111.
- Vassalli, P. (1992). The pathophysiology of tumor necrosis factors. *Annu Rev Immunol* 10, 411-452.

- Vega, R.B., Huss, J.M., and Kelly, D.P. (2000). The coactivator PGC-1 cooperates with peroxisome proliferator-activated receptor alpha in transcriptional control of nuclear genes encoding mitochondrial fatty acid oxidation enzymes. *Mol Cell Biol* 20, 1868-1876.
- Venegas, C., Cabrera-Vique, C., Garcia-Corzo, L., Escames, G., Acuna-Castroviejo, D., and Lopez, L.C. (2011). Determination of coenzyme Q10, coenzyme Q9, and melatonin contents in virgin argan oils: comparison with other edible vegetable oils. *J Agric Food Chem* 59, 12102-12108.
- Vinolo, M.A., Rodrigues, H.G., Nachbar, R.T., and Curi, R. (2011). Regulation of inflammation by short chain fatty acids. *Nutrients* 3, 858-876.
- Wahli, W., and Michalik, L. (2012). PPARs at the crossroads of lipid signaling and inflammation. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM* 23, 351-363.
- Wanders, R.J. (2004). Peroxisomes, lipid metabolism, and peroxisomal disorders. *Mol Genet Metab* 83, 16-27.
- Wanders, R.J., Denis, S., Ruiten, J.P., L, I.J., and Dacremont, G. (1998). 2,6-Dimethylheptanoyl-CoA is a specific substrate for long-chain acyl-CoA dehydrogenase (LCAD): evidence for a major role of LCAD in branched-chain fatty acid oxidation. *Biochim Biophys Acta* 1393, 35-40.
- Wanders, R.J., Ferdinandusse, S., Brites, P., and Kemp, S. (2010). Peroxisomes, lipid metabolism and lipotoxicity. *Biochim Biophys Acta* 1801, 272-280.
- Wanders, R.J., and Waterham, H.R. (2006). Biochemistry of mammalian peroxisomes revisited. *Annu Rev Biochem* 75, 295-332.
- Wanders, R.J., and Waterham, H.R. (2006). Peroxisomal disorders: the single peroxisomal enzyme deficiencies. *Biochimica et biophysica acta* 1763, 1707-1720
- Watkins, P.A., McGuinness, M.C., Raymond, G.V., Hicks, B.A., Sisk, J.M., Moser, A.B., and Moser, H.W. (1995). Distinction between peroxisomal bifunctional enzyme and acyl-CoA oxidase deficiencies. *Ann Neurol* 38, 472-477.
- White, J.H., Fernandes, I., Mader, S., and Yang, X.J. (2004). Corepressor recruitment by agonist-bound nuclear receptors. *Vitam Horm* 68, 123-143.
- Williams, C.M. (2001). Beneficial nutritional properties of olive oil: implications for postprandial lipoproteins and factor VII. *Nutrition, metabolism, and cardiovascular diseases : NMCD* 11, 51-56.
- Wu, Z., Puigserver, P., Andersson, U., Zhang, C., Adelmant, G., Mootha, V., Troy, A., Cinti, S., Lowell, B., Scarpulla, R.C., *et al.* (1999). Mechanisms controlling mitochondrial biogenesis and respiration through the thermogenic coactivator PGC-1. *Cell* 98, 115-124.
- Xu, J., and Li, Q. (2003). Review of the in vivo functions of the p160 steroid receptor coactivator family. *Mol Endocrinol* 17, 1681-1692.
- Yoon, J.C., Puigserver, P., Chen, G., Donovan, J., Wu, Z., Rhee, J., Adelmant, G., Stafford, J., Kahn, C.R., Granner, D.K., *et al.* (2001). Control of hepatic gluconeogenesis through the transcriptional coactivator PGC-1. *Nature* 413, 131-138.
- Yoon, J.C., Xu, G., Deeney, J.T., Yang, S.N., Rhee, J., Puigserver, P., Levens, A.R., Yang, R., Zhang, C.Y., Lowell, B.B., *et al.* (2003). Suppression of beta cell energy metabolism and insulin release by PGC-1alpha. *Dev Cell* 5, 73-83.



- Z. Charrouf, Benomar, M., and Guillaume, D. (2007). Huile d'argan et système cardiovasculaire. *Coeur et vaisseaux*
- Zafrani, E.S. (2004). Non-alcoholic fatty liver disease: an emerging pathological spectrum. *Virchows Arch* 444, 3-12.
- Zhang, B., Marcus, S.L., Sajjadi, F.G., Alvares, K., Reddy, J.K., Subramani, S., Rachubinski, R.A., and Capone, J.P. (1992). Identification of a peroxisome proliferator-responsive element upstream of the gene encoding rat peroxisomal enoyl-CoA hydratase/3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89, 7541-7545.
- Zhang, Y., Castellani, L.W., Sinal, C.J., Gonzalez, F.J., and Edwards, P.A. (2004). Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator 1alpha (PGC-1alpha) regulates triglyceride metabolism by activation of the nuclear receptor FXR. *Genes Dev* 18, 157-169.
- Ziouzenkova, O., Perrey, S., Asatryan, L., Hwang, J., MacNaul, K.L., Moller, D.E., Rader, D.J., Sevanian, A., Zechner, R., Hoefler, G., *et al.* (2003). Lipolysis of triglyceride-rich lipoproteins generates PPAR ligands: evidence for an antiinflammatory role for lipoprotein lipase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100, 2730-2735.
- Zoete, V., Grosdidier, A., and Michielin, O. (2007). Peroxisome proliferator-activated receptor structures: ligand specificity, molecular switch and interactions with regulators. *Biochim Biophys Acta* 1771, 915-925.
- Zougagh, M., Salghi, R., Dhair, S., and Rios, A. (2011). Nanoparticle-based assay for the detection of virgin argan oil adulteration and its rapid quality evaluation. *Anal Bioanal Chem* 399, 2395-2405.

International Organizations Declare Sepsis a Medical Emergency. Issued by an expert panel representing 20 adult and pediatric intensive care societies, October 4th 2010. 2010:Press release. Available from:

<http://www.prnewswire.com/news-releases/international-organizations-declare-sepsis-a-global-medical-emergency-104142073.html>.

[accessed 2012 16th February]