UNIVERSITÉ PARIS 13 – SORBONNE PARIS CITÉ

U.F.R. SANTÉ – MÉDECINE – BIOLOGIE HUMAINE

THÈSE

Pour l'obtention du diplôme de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ PARIS 13

Discipline : Biologie Moléculaire

ÉTUDE BIOCHIMIQUE D'ABHD5

DANS LE SYNDROME DE DORFMAN-CHANARIN

ET EN CONDITION PHYSIOLOGIQUE

Présentée par

Benjamin ROUSSEL

Soutenue publiquement le 7 octobre 2016

Jury

Présidente : Pr. Liliane LAROCHE (Université Paris 13)

Rapporteur : Pr. Marek HAFTEK (Université de Lyon 1)

Rapporteur : Pr. Ludovic MARTIN (Université d'Angers)

Examinateur : Dr. Nathalie JONCA (Université de Toulouse III)

Examinateur : Pr. Marie-Christophe BOISSIER (Université Paris 13)

Directeur : Pr. Frédéric CAUX (Université Paris 13)

Travail réalisé dans le laboratoire Inserm UMR1125, Physiopathologie, cibles et thérapies de la polyarthrite rhumatoïde.

À Anne-Marie, Suzanne, Yves et Jacques

Aux vertueux

« L'intelligence n'est valable que soutenue par le courage. » - Totoyomi Hideyoshi, Shogun

REMERCIEMENTS

Je remercie chaleureusement les membres de mon jury :

Le Pr. Liliane Laroche pour sa gentillesse et sa bienveillance constante à mon égard. Je souhaite également vous remercier pour vos conseils professionnels et votre aide pour que cette thèse se déroule parfaitement.

Le Pr. Ludovic Martin et le Pr. Marek Haftek d'avoir accepté d'être rapporteurs de ce travail. J'en suis honoré et j'espère que ces travaux vous auront passionnés autant que moi.

Le Dr. Nathalie Jonca avec qui j'ai eu l'opportunité de discuter depuis mon Master 2 et qui a toujours été d'une grande sympathie.

Le Pr. Marie-Christophe Boissier, directeur du laboratoire dans lequel j'ai effectué ma thèse, pour son soutien continu afin que je puisse effectuer mon travail et pour m'avoir accepté dans son équipe.

Le Pr. Frédéric Caux. Cette fois-ci, je vais te tutoyer. Merci avant tout de m'avoir appris à travailler rigoureusement, d'avoir pris le temps d'échanger avec moi et écouté mes idées scientifiques. Le travail que l'on a mené tous les 2 a été et est passionnant. Je tiens à te faire part de mon admiration et mon profond respect. J'ai apprécié ta grande qualité qu'est la compassion. J'espère avoir été à la hauteur de tes attentes. Merci de t'être battu pour que cette thèse voie le jour.

Mes pensées vont également à...

Kasia, you are the strongest person I know. You are someone extraordinary and genuine. I admire your courage and determination. I am honored that you saw in me someone who could help you. Dziękuję bardzo, ty jesteś fantastyczna osoba.

Sara Joon, merci pour ta sincérité et ta douceur. Ta naïveté me fera toujours sourire. Tu as été capable d'être une personne toujours pleine de vie et souriante alors que ta vie avec « Chaussure » n'a pas toujours été évidente...

Marjo et Momo, heureusement que vous étiez présents pendant ma thèse. Vous êtes de véritables ami(e)s avec qui j'ai pu discuter et partager de longues discussions. Merci, sincèrement, d'avoir été avec moi.

Laure, pour ton sérieux et tes valeurs dans lesquelles je me retrouve.

Elodie, ma seule collègue dermatologue ! Merci d'avoir enrichi ma culture dermatologique, pour nos nombreux fous rires (sauf tes blagues sur Fabrizio le cochon d'Inde qui étaient de mauvais goût...) et échanges concernant la société et le monde dans lequel on vit.

Zakaria, tu es un gars solide, j'admire ta force de caractère. Merci pour les entrainements clandestins également.

Laetitia, Aurélie, Mélissa et Sabrina vous êtes des filles géniales, et d'une douceur sans limite.

Nadia, bsahtek la thèse ! Je suis heureux d'avoir fait mon Master 2 et ma thèse en même temps que toi.

Luca, mon entraineur de choc et nutritionniste avisé.

Sans oublier tous ceux que j'ai rencontrés dans d'autres laboratoires...

Le Dr. Florence Poirier du laboratoire CSPBAT avec qui j'ai effectué tous mes travaux d'électrophorèse bidimensionnelle et de spectrométrie de masse. Merci pour tes précieux conseils et ton écoute.

Du même laboratoire, je veux remercier le Dr. Anne Denis pour son courage et son calme olympien, Le Pr. Didier Lutomski, le Dr. Karim Senni et le Dr. Sylvie Changotade de m'avoir hébergé dans leur laboratoire, l'aide et soutien constant qu'ils m'ont procuré. Je vous suis profondément reconnaissant.

Je remercie le Pr. Pierre-Olivier Schischmanoff et Corinne du laboratoire de Biochimie de l'hôpital Avicenne de m'avoir aidé à accomplir de multiples séquençages d'ABHD5. J'ai apprécié de travailler avec vous.

Le Dr. Alloui et Samira du laboratoire de Virologie de l'hôpital Avicenne pour les premiers séquençages d'ABHD5 et leur disponibilité.

Le Pr. Martin-Pont et le Pr. Oudar de m'avoir donné l'opportunité de travailler avec eux dans l'enseignement universitaire.

Lamia, amie depuis le Master 2. Je suis content d'avoir passé cette période délicate qu'est la thèse avec toi à mes côtés. Tu es une personne d'une rare douceur.

Nicolas, j'espère qu'on le montera ce label punk/black metal !

Stéphane, pour tes conseils et notre passion commune pour les services postaux.

Anouchka, merci pour ta générosité absolue.

Romain, je suis heureux d'avoir partagé ma fin de thèse avec toi.

Le Dr. Nicolas Joly-Tonetti, compagnon durant les congrès. Tes remarques incisives m'ont toujours fait rire.

Le staff de l'université, notamment Moussa, Jean-Jacques et Christian.

Mes sentiments vont aussi au-delà des murs de l'université...

Papa, Maman, merci de m'avoir enduré, de m'entendre chanter ou hurler (y a-t-il une différence direz-vous...) selon l'humeur. J'espère faire votre fierté.

Mes professeurs de SVT : Madame Limbour et Madame Espejel.

Merci à mes ami(e)s de faire le chemin avec moi : Yohann et Marjolaine, Axel et Elisa, Aymeric, Benjamin, Nicolas, Sammy, Rémi, William, Edris et Fatma, Damien, Moktar, Oussama, Widdy, Adrien, Hugo, Cédric et Grégory.

Toute ma famille pour sa bienveillance.

P. Yves et Parascève, Pierre et Elisabeth pour le soutien inconditionnel que vous m'avez apporté.

Ramon et Clémentine, Gilles, mes enseignants de iaido.

Comment pourrais-je oublier d'honorer la mémoire de mes maîtres à penser, ceux qui m'ont accompagné durant les épreuves : S. Silouane l'Athonite, S. Nectaire d'Egine et Maitre Kong (Confucius pour les intimes) principalement mais je n'oublie pas Jocho Yamamoto, Maitre Xun et Maitre Meng ?

Et les nombreux artistes qui ont fait la B.O. de ma thèse : Cro-Mags, Ceremony, Deafheaven, Hate Forest, Mispyrming, Blut Aus Nord, MGLA, Burzum, Mac Miller, Krisiun, Kendrick Lamar, Enslaved, Belenos, Emperor, Behexen, Blood of Kingu, Salad Groove, et j'en oublie...

REMERCIEMENTS	p.3
ABRÉVIATIONS	p.10
	p.12
A. La peau et ses lipides	p.13
1. <u>Généralités</u>	p.13
2. <u>Structure de l'épiderme</u>	p.13
3. <u>Les lipides épidermiques</u>	p.15
a. Les acides gras	p.16
b. Le cholestérol	p.16
c. Les céramides	p.16
d. Organisation des lipides du Stratum Corneum	p.21
4. Synthèse des céramides épidermiques	p.23
a. Les acides gras des céramides	p.24
b. Les bases sphingoïdes des céramides	p.27
c. Synthèse des céramides	p.27
d. Conversion des céramides	p.28
e. Corps lamellaires	p.28
f. Devenir des céramides dans le Stratum Corneum	p.29
B. <u>Les ichtyoses héréditaires</u>	p.32
1. Les formes non syndromiques	p.32
a. Ichtyose vulgaire	p.32
b. Ichtyose liée à l'X	p.32
c. Ichtyose Harlequin	p.33

d. Ichtyose lamellaire	p.33
e. Ichtyose hystrix de Curth-Macklin	p.35
2. Les formes syndromiques	p.35
a. Syndrome de Netherton	p.35
b. Syndrome de Sjörgen-Larsson	p.36
c. Maladie de Refsum	p.36
d. Maladie d'Austin	p.37
e. Syndrome « Kératite-Ichtyose-Surdité » (KID)	p.37
f. Trichothiodystrophie avec ichtyose	p.38
g. Syndrome de Conradi-Hünermann-Happle et CHILD	p.38
h. Syndrome IFAP	p.39
i. Syndrome CEDNIK	p.39
j. Syndrome NISCH	p.39
k. Maladie de Gaucher	p.40
I. Syndrome neuro-ichtyotique	p.40
m. Syndrome de Dorfman-Chanarin	p.41
C. <u>ABHD5</u>	p.48
1. <u>Généralités</u>	p.48
2. <u>Caractéristiques d'ABHD5</u>	p.48
a. Génétique et biochimie d'ABHD5	p.48
b. Fonctions d'ABHD5	p.49

3. Molécules interagissant ou modulant ABHD5	p.50
a. Protéines du métabolisme lipidique	p.50
b. miRNA	p.54
c. Autres protéines	p.55
OBJECTIFS	p.57
MATÉRIELS ET MÉTHODES	p.59
A. <u>Échantillons humains</u>	p.60
B. <u>Échantillons de souris</u>	p.60
C. <u>Séparation des cellules sanguines</u>	p.61
D. <u>Séparation de la peau par la dispase</u>	p.61
E. <u>Culture de fibroblastes dermiques</u>	p.61
F. Extraction des ARN totaux	p.62
G. <u>RT-PCR</u>	p.62
H. <u>Extraction des bandes d'intérêt en gel d'agarose</u>	p.65
I. <u>Séquençage</u>	p.65
J. Extraction des protéines cellulaires	p.66
K. Extraction des protéines d'un gel d'acrylamide par élution passive	p.67
L. <u>Electrophorèse bidimensionnelle (2D)</u>	p.67
M. <u>Digestion des protéines par la trypsine</u>	p.68
N. Identification des protéines par spectrométrie de masse	p.69
O. Prédictions protéiques bioinformatiques	p.70
P. Western blot	p.70
Q. <u>Digestion par la glycopeptidase F</u>	p.71

R. Immunoprécipitation	p.71
RÉSULTATS	p.73
A.Étude d'ABHD5 en condition pathologique (manuscrit)	p.74
B. Étude d'ABHD5 en condition physiologique	p.112
1. Description d'un nouveau transcrit alternatif d'ABHD5 chez la souris	_p.112
2. Description de quatre nouveaux transcrits alternatifs d'ABHD5 chez l'Homme	_p.115
3. Caractérisation protéique d'ABHD5 et de ses isoformes chez l'Homme	_p.120
a. Révélation d'ABHD5 par western blot à partir d'extraits protéiques totaux_	p.122
b. Identification d'ABHD5 par gels 2D à partir d'extraits protéiques totaux	p.124
c. Identification d'ABHD5 par immunoprécipitation	_p.127
4. Recherche d'une glycosylation et de phosphorylations de la protéine ABHD5	_p.130
a. Recherche de glycosylation d'ABHD5	p.130
b. Recherche de phosphorylations d'ABHD5	_p.132
DISCUSSION	p.134
A. Étude d'ABHD5 en condition pathologique	_p.135
B. Étude d'ABHD5 en condition physiologique	p.148
CONCLUSIONS	_p.153
BIBLIOGRAPHIE	_p.156
TABLEAUX SUPPLÉMENTAIRES	p.170

ABRÉVIATIONS

a.a. : acides aminés

ABHD5 : α/β Hydrolase Domain containing protein 5

- Acyl-CER : acyl-céramides
- ATGL : « Adipose Triglyceride Lipase »
- AG : acide(s) gras
- BS : Base sphingoïde
- CE : enveloppe cornéocytaire
- CER : céramide(s)
- CerS : Céramide Synthase
- CGI-58 : «Comparative Genomic Identification #58»
- ELOVL : «Elongation of very long chain fatty acids» ou élongase
- EST : « Expressed Sequence Tag » ou marqueur de séquence exprimée
- FL : « Full length » ou longueur/forme complète
- $\mathsf{GBA}:\beta\text{-}\mathsf{glucoc}\acute{\mathsf{e}}\acute{\mathsf{r}}\acute{\mathsf{e}}\mathsf{brosidase}$
- Glc-CER : Glucosylcéramide(s)
- kb : kilobases
- kDa : kilodaltons
- LC : AG à longue chaine carbonée
- LOX : lipoxygénase(s)
- pb : paire de bases
- PLIN : Périlipine(s)
- SB : stratum basale
- SC : stratum corneum
- SDC : Syndrome de Dorfman-Chanarin
- SG : stratum granulosum
- SLS : Syndrome de Sjörgen-Larsson
- SM : Sphingomyéline
- SmM : Spectrométrie de masse
- SMyélinase : Sphingo-myélinase
- Spot: tâche (polypeptidique dans un gel d'électrophorèse 2D)
- SS : stratum spinosum
- sn : « Stereospecific numbering » ou numéro stéréospécifique
- TGM1 : Transglutaminase 1
- ULC : AG à ultra longue chaîne carbonée
- VLC : AG à très longue chaîne carbonée
- Y2H : «Yeast two hybrid» ou double-hybride chez la levure

INTRODUCTION

A. La peau et ses lipides

1. Généralités

La peau est un organe à l'interface entre l'individu et le monde extérieur. C'est un des organes les plus larges avec une surface moyenne de 1,5 à 2,0 m². Elle contient également des éléments annexes : glandes, poils et ongles.

La peau fournit un soutien mécanique, limite la perte d'eau de l'individu, protège contre la chaleur et le froid ainsi que contre les expositions aux UV. Elle a une fonction barrière qui est assurée par la couche superficielle, l'épiderme, composée majoritairement de kératinocytes. La couche sous-jacente est le derme, contenant des macromolécules (collagènes, élastine, protéoglycannes) et des fibroblastes. Cette couche a un rôle de structure et assure l'élasticité cutanée. La couche la plus profonde de la peau est l'hypoderme ou graisse sous-cutanée. Les adipocytes blancs sont les cellules majoritaires de cette couche. L'hypoderme permet une isolation thermique et est une source d'énergie qui est stockée sous forme de lipides.

2. Structure de l'épiderme

L'épiderme est la couche la plus superficielle de la peau, composée de kératinocytes en majorité, de mélanocytes (cellules synthétisant la mélanine), de cellules de langerhans (cellules présentatrices d'antigènes) et de cellules de Merkel (cellules neuroendocrines, récepteurs mécaniques de la peau). Ce tissu est divisé en 4 couches, qui correspondent à différents stades de différenciation des kératinocytes (Figure 1).

- La couche basale, ou *stratum basale* (SB) est celle qui est à l'interface avec le derme, donc la plus profonde, au contact de la membrane basale. Elle est composée de kératinocytes basaux cylindriques divisés en 3 populations : ceux des régions interfolliculaires, ceux des glandes sébacées et ceux des follicules pileux. Ils permettent de maintenir l'homéostasie épidermique en proliférant et se différenciant (1). - La couche épineuse, ou stratum spinosum (SS) est composée de kératinocytes polygonaux et est nommée ainsi du fait de la présence des desmosomes qui relient les kératinocytes entre eux et donnent un aspect en « épines » en observation microscopique. La synthèse des lipides importants pour la formation de la couche cornée débute dès cette couche.

- La couche granuleuse, ou *stratum granulosum* (SG), est composée de cellules dont les noyaux se modifient et de multiples granules de keratohyaline apparaissent au niveau cytoplasmique. Le noyau et le cytoplasme de ces cellules vont s'aplatir. Ces granules contiennent de la profilaggrine qui sera protéolysée en filaggrine et constituera l'élément cytoplasmique principal des kératinocytes de la couche cornée. Les kératinocytes de cette couche contiennent également des corps lamellaires qui sont des structures vésiculaires contenant des lamelles empilées. L'enveloppe cornée (CE, membrane protéique entourant les kératinocytes de la couche cornée) commence à se former pour permettre l'organisation d'une structure stable au niveau de la couche cornée.

- La couche cornée, ou *stratum corneum* (SC) est constituée des kératinocytes en phase finale de différenciation, appelés cornéocytes. Ils ne possèdent pas de noyaux, sont riches en kératine et forment avec les lipides intercellulaires une structure comparée à un mur fait de briques (cellules) et de mortier (lipides). La CE est composée majoritairement d'involucrine, de loricrine et de lipides et va interagir avec les lipides intercornéocytaires secrétés au préalable par les kératinocytes de la couche granuleuse afin d'assurer l'imperméabilité de la peau (2)(3).



Figure 1. L'épiderme et ses différentes couches (photo issue de http://www.magec.eu/fr/maladies-prises-encharge/ichtyoses). Coupe histologique de peau humaine normale avec coloration Haematoxyline/Eosine. 1 = Stratum basale, 2 = Stratum spinosum, 3 = Stratum granulosum et 4 = Stratum corneum.

3. Les lipides épidermiques

Les lipides épidermiques assurent l'imperméabilité de la peau et des variations qualitatives ou quantitatives des lipides de l'épiderme sont souvent constatées dans les maladies dermatologiques. Les principaux lipides de l'épiderme sont les acides gras (AG), le cholestérol et les céramides (CER). Il y a d'autres lipides, minoritaires, comme les triglycérides ou des précurseurs du cholesterol et des CER (4). Ils sont présents dans l'espace inter-cornéocytaire, la CE et les corps lamellaires. Les lipides sont accumulés dans les corps lamellaires puis largués dans le SC à la jonction SG – SC. Les lipides forment ainsi avec les cornéocytes du SC un ensemble « briques – mortier » permettant d'assurer la barrière cutanée (5)(6).

a. Les acides gras

Parmi tous les lipides cutanés du SC chez l'Homme, environ 15% sont des AG. Ce sont principalement des AG saturés, libres et à longue chaîne (ces chaînes possèdent en moyenne plus de 20 carbones). Les seuls AG insaturés que l'on retrouve dans la SC sont les acides oléique et linoléique (6% et 2% respectivement de la masse totale en lipides de la SC) (5).

Les AG principalement retrouvés dans l'épiderme sont l'acide palmitique, l'acide stéarique, l'acide béhénique, l'acide lignocérique, l'acide oléique ou encore l'acide linoléique (7).

b. <u>Le cholestérol</u>

Le cholestérol possède un noyau stéroïde polycyclique et un groupe alcool. Le groupe alcool peut réagir avec un AG et former un ester de cholestérol. Le cholestérol est l'un des lipides majoritaires du corps et il représente en moyenne 25% du poids total en lipides du SC. Le cholestérol est synthétisé à partir d'acétate dans les couches profondes de l'épiderme. Une partie de ce lipide est converti en sulfate de cholestérol et reconverti en cholestérol dans le SC. La conversion du cholestérol en sulfate de cholestérol se fait par l'action de sulfotransférases cytosoliques et la conversion du sulfate de cholestérol en cholestérol est réalisée par une stéroïde sulfatase (8)(9). Sa fonction dans l'épiderme est probablement associée à la fluidité et à la flexibilité de la barrière cutanée, en plus de son rôle perméabilisant (10).

c. Les céramides

Ce type de lipides a été décrit pour la première fois en 1970 dans le museau de vache, une description plus complète apparait en 1983 dans l'épiderme de porc (*Sus scrofa*) (11).

Les CER sont les lipides majoritaires du SC, représentant environ 50% du poids total lipidique. Ils sont constitués d'une base de sphingoïde variable et d'AG (majoritairement insaturés) variant par la longueur de leur chaîne, l'ensemble formant 2 chaînes hydrophobes. La liaison entre l'AG et la base sphingoïde se fait par une liaison amide. Quinze catégories différentes sont connues (12) aujourd'hui avec un total de 342 espèces distinctes identifiées dans le SC (13) bien que plus de 1000 existeraient mais restent à caractériser précisément (14).

Ces 15 classes sont nommées en fonction des structures biochimiques de ces molécules (groupes variables des AG, différents types de sphingoïdes, présence de liaisons esters). La première nomenclature des CER date de 1983 avec la description de 6 classes de CER (CER 1 jusque CER 6) découvertes chez le porc (11). En 1993 la nomenclature actuelle est adoptée, utilisant un système de lettres en fonction des caractéristiques biochimiques de CER (15). 8 lettres sont ainsi utilisées et indiquent le type d'AG ou de base sphingoïde (Figure 2):

N : présence d'un acide gras normal

A : présence d'un acide gras α -hydroxylé

O : présence d'un acide gras ω-hydroxylé (souvent associé à une estérification)

E : estérification de l'AG de base avec un nouvel AG (souvent saturé) ou aux protéines de la CE

S : composé d'une base sphingosine

dS : composé d'une base dihydrosphingosine

P : composé d'une base phytosphingosine

H : composé d'une base 6-hydrosphingosine

Une première description extensive des CER présents dans l'épiderme humain a été faite en 2003 (16), 9 classes sont présentes : EOS, EOP, EOH, NS, NP, NH, AS, AP et AH. Les 6 autres classes de CER ont été identifiés ultérieurement : OS, OP, OH, NdS, AdS et EOdS (13)(17)(18). Cependant la classe OP dans le SC n'a pas été détectée dans toutes les études (19).

Une 16^{ème}et une 17^{ème} classe ont été proposées théoriquement : ce sont les CER OdS et CER NT (T se référant à dihydroxy-dihydrosphingosine. T pour « <u>T</u>wo » groupes hydroxylés de la sphingosine) (14). La première n'a pas été retrouvée et la seconde a été détectée en faible quantité dans le SC et à une seule reprise à ce jour.

Les CER qui possèdent un AG supplémentaire associé par une liaison ester à leurs AG ω hydroxylés (EO) forment une sous-classe de CER appelés acyl-céramides (acyl-CER) ou ω -Oacyl-céramides.

Les céramides OS, OP et OH sont considérés comme associés de façon covalente à la CE (17). Ils étaient anciennement nommés CER A et B (respectivement CER OS et CER OH). La liaison aux protéines de la CE « remplace » l'estérification par un acide gras supplémentaire (Tableau 1).

D'autres molécules assimilées à des céramides ont été identifiées dans l'épiderme : les 1-Oacylcéramides. Ce sont des molécules composées d'une base sphingoïde, d'un acide gras (habituellement retrouvé dans la composition classique des CER) et d'un nouvel acide gras estérifié sur le 1^{er} atome d'oxygène de la base sphingoïde.

Ce type de lipide a été détecté à une seule reprise dans l'épiderme humain et constituait 5% des acyl-CER ou 2,3% des CER totaux. Ce lipide ne correspondant pas à la définition du CER composé d'une base sphingoide et d'un acide gras, il ne sera pas ici considéré comme un CER car possédant deux chaines d'acides gras (celle retrouvée habituellement et la nouvelle estérifiée sur l'atome d'oxygène de la base sphingoïde) (20).



Figure 2. Structure des céramides. **a.** Structure générale d'un céramide avec sa base sphingoïde variable et son acide gras variable. **b.** Les 4 différents types d'AG (N, A, O et EO) et les différents types de bases sphingoïdes (dS, S, P et H). **c.** Les 15 classes différentes de céramides. Les anciennes nomenclatures sont entre parenthèses. En jaune, les acyl-CER et en bleu les céramides liés de façon covalente à la CE. Figure inspirée (21) et (12).

Ancienne	Nouvelle	Nombre moyen de C des AG	Catégorie(s) longueur	Distribution en %	Détecté par
nomenclature	nomenclature		chaines AG	dans la SC	MaB_0011
Céramide 1	Céramide EOS	30 - 32 (Ponec, 2003) / 28 -32 (Masukawa, 2008)	ULC	6,48	
Céramide 2	Céramide NS	20 - 28 (Pones, 2003) / 16 - 30 (Masukawa, 2008)	LC - VLC	7,44	Х
Céramide 3	Céramide NP	20 - 28 (Ponec, 2003)/ 23 - 30 (Masukawa, 2008)	LC - VLC	22,1	Х
Céramide 4	Céramide EOH	30 - 32 (Ponec, 2003) / 28 -32 (Masukawa, 2008)	ULC	4,26	
Céramide 5	Céramide AS	24 - 26 (Ponec, 2003)/ 22 - 27 (Masukawa, 2008)	VLC	9,58	Х
Céramide 6	Céramide AP	24 - 26 (Ponec, 2003)/ 20 - 26 (Masukawa, 2008)	VLC	8,78	
Céramide 7	Céramide AH	24 - 26 (Ponec, 2003) / 20 - 30 (Masukawa, 2008)	VLC	10,77	
Céramide 8	Céramide NH	24 - 28 (Pones, 2003) / 23 - 30 (Masukawa, 2008)	VLC	14,51	
Céramide 9	Céramide EOP	30 - 32 (Ponec, 2003)/ 28 -32 (Masukawa, 2008)	ULC	1,14	
Céramide 10	Céramide NdS	16 - 30 (Masukawa, 2008)	LC - VLC - ULC	9,83	Х
Céramide 11	Céramide AdS	16 - 27 (Masukawa, 2008)	LC - VLC - ULC	1,63	Х
Céramide 12	Céramide EOdS	Théoriquement : 30 - 32 (Ponec, 2003) / 28 -32 (Masukawa, 2008)	Théoriquement : ULC	0,4	
Céramide A	Céramide OS	30 - 34 (Hill <i>,</i> 2006)	ULC	0,73	
Inexistante	Céramide OP	30 - 34 (Hill, 2006)	ULC	0,17	
Céramide B	Céramide OH	30 - 34 (Hill <i>,</i> 2006)	ULC	0,43	
Inexistante	Céramide NT	Théoriquement : 24 - 30 (t'Kindt, 2011)	Théoriquement : VLC - ULC	1,73	

Tableau 1. Les 15 espèces de CER. En jaune sont représentés les acyl-CER. En bleu les CER associés de façon covalente à la CE. En gris pâle une nouvelle espèce de CER. Les pourcentages de la distribution proviennent de l'étude de t'Kindt et al., 2011. ULC : « Ultra Long Chain » chaîne carbonée d'AG ultra longue, VLC : « Very Long Chain » chaîne carbonée d'AG très longue et LC : « Long Chain » chaîne carbonée d'AG longue. MaB_0011 : anticorps monoclonal qui reconnaît les céramides notés d'une croix.

d. Organisation des lipides du Stratum Corneum

Plusieurs modèles d'organisation des CER avec les autres lipides cutanés ont été proposés afin d'expliquer la structure du SC. Ces études ont été menées par microscopie électronique, par SAXS (pour « Small Angle X-ray Scatter », soit diffusion des rayons X aux petits angles qui évalue la densité électronique dans des structures multicouches) ou par spectroscopie (Figure 3).

- Le modèle le plus communément admis est celui des lipides en *feuillets lipidiques organisés latéralement*. Ce premier modèle propose une organisation des lipides du SC en feuillets, empilés les uns sur les autres. Chez l'Homme, la distance entre les lipides peut être de 2 sortes : longue (12 nm) ou courte (6 nm). La première est appelée LPP (« Long Periodicity Phase », phase de longue périodicité) tandis que la seconde est SPP (« Short Periodicity Phase », phase de courte périodicité). Ceci décrit l'arrangement possible entre les lipides frontalement (ou en coupe verticale par rapport à la surface cutanée). À cela s'ajoute une organisation latérale correspondant à la distance entre les têtes hydrophiles des lipides du SC.

Il y a 3 types d'arrangements latéraux qui sont démontrés : hexagonaux, orthorhombiques et liquidiens. Le premier est ordonné et dense, tandis que le second est plus espacé mais toujours structuré. La distance entre les groupes hydrophiles sont entre 0.41 et 0.37 nm pour les assemblements orthorhombiques et de 0.41 nm pour ceux hexagonaux. L'organisation latérale orthorhombique est plutôt associée à des lipides rangés en LPP d'un point de vu frontal. L'arrangement liquidien est désordonné et se caractérise par un haut degré de perméabilité et la distance entre les groupes hydrophiles n'est pas clairement définie (7).

Les autres modèles reprennent souvent le modèle *feuillets lipidiques organisé latéralement* en y intégrant des modifications.

- Un deuxième exemple d'organisation est celui en *mosaïque*. Ce sont 2 phases lipidiques qui sont présentes, une cristalline entourée d'une autre liquide.

- Il y a le modèle *sandwich* qui propose qu'un feuillet fait de lipides associés étroitement soit présent entre 2 autres feuillets lipidiques plus lâches. Cette première phase étroite serait composée de CER à AG courts tandis que la phase lâche contiendrait des CER à AG longs.

- Une autre organisation est celle en *gel phase simple*. Les lipides sont considérés comme formant une masse (un gel) unique et cohérente.

- Le cinquième est celui de l'*armature renforcée*. Dans ce modèle, les CER AP ont un rôle central puisqu'ils permettent de renforcer l'adhésion entre les feuillets lipidiques.

- Et le dernier est le modèle *asymétrique*. Ici, ce sont les CER NP qui sont cruciaux ; ils forment avec le cholestérol une bicouche, qui serait majoritaire dans les feuillets lipidiques.

Une variation d'un des composants lipidiques comme observé dans certaines maladies (ichtyose lamellaire, psoriasis, dermatite atopique) provoque une désorganisation de cette structure et une perturbation de la perméabilité cutanée (7)(21).



Figure 3. Modèle simplifié de l'organisation lipidique dans le SC. Les cornéocytes sont les kératinocytes les plus différenciés de l'épiderme. Les lipides sont composés de CER, cholestérol et d'acides gras. Le feuillet lipidique peut être LPP ou SPP selon la distance entre les lipides. L'organisation latérale peut être orthorhombique ou hexagonale. * = Enveloppe cornéocytaire (CE), lieu d'ancrage covalent des CER OS, OP et OH. Figure inspirée de (22) et (7).

4. Synthèse des céramides épidermiques

La synthèse des CER est complexe et les voies métaboliques sont variées, permettant la production d'un nombre élevé d'espèces différentes de CER. Certaines étapes métaboliques ne sont pas encore connues.

La quantité des CER et de leurs précurseurs augmenteavec la différenciation épidermique. Se déroulent en parallèle l'allongement d'AG et la production de la base sphingoïde. Les étapes métaboliques de ces deux voies se produisent dans le cytosol proche du réticulum endoplasmique des kératinocytes du SS.

a. Les acides gras des céramides

Les AG présents dans les CER possèdent de longues chaînes carbonées. Les AG proviennent essentiellement de l'acide palmitique synthétisé par la cellule ou présent dans l'alimentation. Ces lipides sont stockés sous la forme d'acyl-CoA et sont élongués pour intégrer le futur CER. L'élongation se fait par un cycle de 4 étapes successives qui permettent de rajouter 2 carbones à l'acyl-CoA d'origine (1 cycle d'élongation = 2 C supplémentaires à la chaîne de l'acyl-CoA).

Ces étapes sont : la condensation, la réduction, la déshydration et la réduction finale. La condensation nécessite l'intervention d'enzymes appelées les élongases (ELOVL = « ELOngation of Very Long chain fatty acids protein » = Protéine d'élongation des AG à chaînes longues). Celles-ci sont au nombre de 7 et parmi elles, 5 sont actives dans l'épiderme : les ELOVL1, 3, 4, 5 et 6. Elles vont permettre la production de différents types d'AG. Les spécificités de ces ELOVL sont indiquées dans le tableau ci-après (23).

ELOVL	Chaîne C	Saturation
ELOVL1	C22-C26	Saturés et monoinsaturés
ELOVL2	C20-C22	Polyinsaturés
ELOVL4	>C26	Saturés et monoinsaturés
ELOVL5	C18-C20	Polyinsaturés
ELOVL6	C12-C16	Saturés et monoinsaturés

Tableau 2. Tableau des tailles et du degré de saturation des chaînes carbonées produites par l'intermédiaire des différentes ELOVL. Chaîne C = Nombre de carbones dans la chaîne de l'acide gras. Saturés = ne possède pas de liaisons doubles, Polyinsaturés = possède au moins 2 liaisons doubles, Monoinsaturés = possède 1 liaison double.

Après action d'une ELOVL, l'acyl-CoA devient du 3-ketoacyl-CoA, qui sera réduit en 3hydroxyacyl-CoA par la 3-ketoacyl-CoA réductase (gène *KAR/HSD17B12*). Puis a lieu une déshydration produisant du trans-2-enoyl-CoA sous l'action de la 3-hydroxyacyl-CoA déhydratase (gène *HACD1-4*). Enfin survient une réduction finale sous l'action de la trans-2-enoyl-CoA réductase (TECR) produisant un nouvel acyl-CoA avec une chaîne carbonée sur laquelle 2 carbones ont été ajoutés par ce cycle en 4 étapes.

Chacune de ces étapes sont interdépendantes et peuvent être stimulées par d'autres enzymes (CerS) que nous verrons par la suite.

À ces étapes générales se rajoutent des modifications qui créent des AG α -hydroxylés et ω hydroxylés avec un autre acide gras estérifié à ce dernier (24).

Actuellement, 2 enzymes sont connues comme intervenant dans ces modifications.

- La « fatty-acid 2-hydroxylase » (hydroxylase d'acide gras en carbone 2, FA2H) qui permet de créer un AG α -hydroxylé (la lettre A de la nomenclature des CER). Une autre enzyme serait éventuellement impliquée dans ce processus (23).

- Le cytochrome P450 type 4 (CYP4F22) est à l'origine des AG ω -hydroxylés (un des futurs composants des acyl-CER, la lettre O de la nomenclature des CER) (24)(23). L'estérification d'un autre AG sur celui déjà existant se fait par une enzyme encore inconnue, bien que la diacylglycerol-o-acyltransférase 2 (DGAT2) semble être un candidat privilégié (25). L'AG est ajouté sur l'AG d'origine ω -hydroxylé. L'AG estérifié est composé lui-même d'une longue chaîne carbonée et est majoritairement un acide linoléique (25)(23). Plusieurs auteurs ont proposé que l' α/β Hydrolase Domain containing protein 5 (ABHD5) puisse aussi fournir certains AG supplémentaires qui seront fixés sur l'AG ω -hydroxylés. Cela se produirait par l'intermédiaire d'une lipase ATGL-like qui après dégradation d'un triglycéride fournirait un AG (Figure 4) (25)(26)(27). Ces AG ω -hydroxylés-estérifiés seront des composants formant les acyl-CER avec les lettres EO de la nomenclature des CER.



Figure 4. Schéma de synthèse des céramides issu de (25). La protéine ABHD5 (ici appellée CGI-58) est entourée en rouge dans cette voie de biosynthèse des céramides épidermiques. DGAT2 = diacylglycerol acyltransférase 2, ELOVL = elongation of very long chain fatty acids, FAS = fatty acid synthase, GCS = glucosylcéramide synthase, HACD1–4 = 3-hydroxy acyl-CoA désaturase 1–4, KAR = 3-keto acyl-CoA réductase, SAP-C = saposin-C, SMS = sphingomyelin synthase, TER = 2,3 trans enoyl-CoA réductase, TGM1 = transglutaminase 1.

b. Les bases sphingoïdes des céramides

Les bases sphingoïdes proviennent d'une réaction de condensation entre de la L-sérine avec un acyl-CoA. Cette condensation se produit grâce aux sérine palmitoyltransférases (SPT) et forme de la 3-ketodihydrosphingosine (KDS) libérant la Coenzyme A. L'AG utilisé par l'acyl-CoA dépend de la spécificité des SPT. Les KDS peuvent avoir ainsi une chaîne carbonée entre C16 et C20 (23). La KDS sera réduite par la 3-KDS réductase et produira de la dihydrosphingosine.

C'est à partir de la dihydro-sphingosine que ces 2 voies parallèles de production (AG et base sphingoïde) vont se rencontrer et sous l'action des céramide synthases (CerS) vont générer des CER.

c. Synthèse des céramides

En effet, les CerS vont convertir les dihydro-sphingosines en dihydro-CER en utilisant les AG élongués précédemment mentionnés. Au même titre que les ELOVL, les CerS sont substrats-spécifiques par rapport aux acyl-CoA. Chez l'Homme, 6 CerS sont actuellement décrites. Dans la peau, 5 d'entre elles ont été détectées : CerS2, 3, 4, 5 et 6, la CerS3 semblant la plus importante par son large spectre de substrats utilisables. Ces enzymes sont régulées par phosphorylation. Les spécificités de ces CerS sont indiquées dans le tableau ci-après.

CerS	Chaîne C acyl-CoA
CerS2	C22-C24
CerS3	>C18
CerS4	C18-C22
CerS5	C16
CerS6	C16

Tableau 3. Tableau présentant les acyl-CoA utilisées par les CerS en fonction de leurs chaines carbonées. La CerS3 est celle qui utilise un large spectre d'acyl-CoA, fournissant ainsi de multiples AG à chaînes variables pour les CER.

C'est à partir des dihydro-CER que les différentes bases sphingoïdes des CER seront générées. Ainsi, l'action de la dihydrocéramide désaturase 1 (DEGS1) permet la création des CER à base sphingoïde S. La DEGS2 va produire un CER à base sphingoïde P. Les autres CER, avec des bases sphingoïdes différentes, sont produits par des enzymes encore inconnues.

Le nom du CER (avec la nomenclature à 8 lettres) proviendra donc de l'AG (via l'acyl-CoA) utilisé et de la conversion de la base sphingoïde du dihydro-CER (23)(25).

d. Conversion des céramides

Une fois synthétisés, les CER seront convertis en Glucosyl-CER (Glc-CER) et en Sphingomyéline (SM). Cette conversion a lieu au niveau de l'appareil de Golgi des kératinocytes supérieurs du SS et inférieurs du SG. La conversion en Glc-CER se fait sous l'action de la Glc-CER synthase par l'ajout d'un glucose sur le CER. Les acyl-CER sont eux convertis en acyl-GlcCer par l'UDP-glucose Cer glucosyltransferase (UGCG) (23). La conversion en SM se fait par le transfert d'une phosphorylcholine provenant de la phosphatidylcholine. L'ajout de ces 2 différents groupes se fait sur le 1^{er} OH (1-hydroxy) du CER (7).

e. Corps lamellaires

Après avoir été convertis en 2 espèces distinctes (Glc-CER et SM), les précurseurs des CER vont être intégrés dans des vésicules appelées corps lamellaires. Cette étape se déroule dans les kératinocytes supérieurs du SS et inférieurs du SG. Le nombre de ces vacuoles augmente à mesure que les kératinocytes de la SG se différencient.

La genèse de ces organites est encore discutée, mais il semblerait que les corps lamellaires dérivent du réseau trans-golgien (28). Dans le poumon de rat, les corps lamellaires des alvéoles possèdent des marqueurs protéiques des endosomes tardifs (29). Récemment, il a été démontré que la GTPase Rab11a est présente à la surface des corps lamellaires et joue un rôle dans la formation de ces derniers (30). Par ailleurs, lorsqu'il y a une extinction de l'expression de Rab11a, la formation des corps lamellaires est perturbée et certains acyl-CER (EOS et EOP) sont diminués dans les kératinocytes (30). La genèse des corps lamellaires et le transport intracellulaire paraissent impliquer la famille des protéines Rab (31) au même titre que les vacuoles lipidiques (32).

Les corps lamellaires sont des vésicules ovoïdes qui apparaissent pour la première fois dans le SS au niveau du réseau trans-golgien des kératinocytes (33)(8). Ces vésicules vont contenir plusieurs enzymes, des précurseurs lipidiques et des protéines. Les corps lamellaires sont délimités par une bicouche lipidique et mesurent $0,2 \times 0,3 \mu m$ (7).

28

Les enzymes présentes dans les corps lamellaires sont la β -glucocérébrosidase (GBA) et ses activateurs (saposines), qui transformeront les Glc-CER en CER, et la SMyelinase, qui transformera les SM en CER. Certains SM seraient à l'origine des CER AS et NS (34). Sont également présentes des hydrolases, des phospholipases, et des sulfatases qui permettront la conversion de précurseurs lipidiques en AG libres et en cholestérol. Enfin ils contiennent des kallikréines qui interviennent dans la desquamation.

Les précurseurs lipidiques présents sont les Glc-CER et les SM (futurs CER), les phospholipides (futurs AG) et le cholestérol. Un précurseur du cholestérol se situe en dehors des corps lamellaires dans le cytosol, c'est le sulfate de cholestérol (8)(35).

Le passage des précurseurs des CER dans les corps lamellaires est encore mal compris. Cependant, un transporteur, ABCA12 est considéré comme impliqué dans l'entrée des Glc-CER dans les corps lamellaires.

Un autre transporteur de la famille ABC (ABCG1) interviendrait aussi dans l'entrée du cholestérol dans les corps lamellaires (33). L'incorporation des phospholipides et des SM dans les corps lamellaires est inconnue.

Aux pôles apicaux des kératinocytes supérieurs du SG (à l'interface avec le SC), les corps lamellaires vont fusionner avec la membrane plasmique puis libérer ce qu'ils contiennent dans le milieu inter-cornéocytaire.

f. Devenir des céramides dans le Stratum Corneum

Une fois libérés entre les cornéocytes du SC, tous les protagonistes vont intervenir pour mettre en place une barrière épidermique imperméable.

Les Glc-CER et SM vont être reconvertis en CER par l'intermédiaire de la β glucocérébrosidase, de la SMyélinase et des saposines qui stimuleront ces 2 enzymes. Les phospholipides seront transformés en AG par des phospholipases et le sulfate de cholestérol en cholestérol par des sulfatases.

Ces différents lipides vont s'organiser en une structure cohérente et en lien avec l'enveloppe cornéocytaire (CE) qui est à la surface des cornéocytes.

L'adhésion des cornéocytes entre eux est assurée par les cornéodesmosomes qui sont composés de desmogléine 1, desmocolline 1 et de cornéodesmosine. Ces composants seront dégradés par les kallikréines issues des corps lamellaires afin que la desquamation puisse avoir lieu (36).

La CE, épaisse de 15 nm, est composée d'involucrine (élément principal), de loricrine, d'envoplakine, de périplakine et de fragments de proline. La formation de polymères de ces protéines est assurée par la transglutaminase-1 (TGM1) (3). Elle va se substituer à la membrane plasmique des cornéocytes et certains CER y seront insérés. L'accrochage de ces CER se fait sur l'involucrine principalement, mais aussi sur l'envoplakine et la périplakine (23).

Les CER qui vont se lier à la CE sont certains acyl-CER. Pour cela, ces acyl-CER doivent subir une oxydation successivement par 2 enzymes qui sont des lipoxygénases (LOX) : l'ALOX12B et l'ALOXE3. L'oxydation de l'acyl-CER se fait sur l'AG estérifié (typiquement l'acide linoléique) et non sur l'AG « de base » de l'acyl-CER.

Les lipoxygénases permettent de catalyser la transformation d'acyl-CER EOS en CER OS, d'acyl-CER EOP en CER OP et d'acyl-CER EOH en CER OH (l'acyl-CER EOdS en CER OdS n'est pas décrit à ce jour) (26). Cette conversion ne se fait pas pour l'intégralité des acyl-CER, certains restants présents dans l'espace inter-cornéocytaire.

La fixation des céramides sur la CE utilise un résidu glutamate de l'involucrine (37). Cette estérification sur l'involucrine va « remplacer » l'AG anciennement associé à l'acyl-CER. La TGM1 est proposée pour catalyser l'insertion de ces CER voués à se lier de façon covalente à la CE (37). Cependant, il a été montrée dans un travail que si la TGM1 est non fonctionnelle, les CER liés à la CE sont présents normalement, ce qui suggère l'intervention d'une autre enzyme inconnue (38) (Figure 5).

Beaucoup de ces protagonistes impliqués dans le métabolisme des céramides sont au centre de maladies cutanées que l'on appelle les ichtyoses.

30



Figure 5. Schéma simplifié de la voie de synthèse des céramides épidermiques. En rouge, les enzymes impliquées dans cette voie de synthèse. AG = Acides Gras, AGLC = Acide Gras à Chaîne Longue, β-Gluc = β-Glucocérébrosidase, BS = Base Sphingoïde, CerS = Céramide Synthase, chaîne C = chaîne carbonée de l'Acide Gras, DEGS = Dihydro-Cer Désaturase, ELOVL = Elongase des AG, Glc-Céramide = Glucosylcéramide, KDS = 3-ketodihydrosphingosine, LOX = Lipoxygénases (ALOXE3, ALOXE12B), SM = Sphingomyéline, SPT = Sérine palmitoyltransférase.

B. Les ichtyoses héréditaires

Ichtyose, du grec $\chi \theta \upsilon \sigma$ (poisson), en référence à l'aspect en écaille de poisson de la peau des patients, est le nom d'un groupe de maladies dermatologiques le plus souvent d'origine génétique. Les ichtyoses sont caractérisées cliniquement par la présence de nombreuses squames. Les squames diffèrent selon les types d'ichtyoses (plus ou moins épaisses, larges ou sombres). Elles témoignent d'anomalies de la kératinisation et d'une hyperplasie épidermique. Les ichtyoses sont monogéniques et peuvent être associées à une érythrodermie (on parle alors d'érythrodermie ichtyosiforme). Les ichtyoses sont classées selon plusieurs critères (date d'apparition, surface atteinte, mode de transmission génétique et aspect histologique). Elles peuvent être associées à des signes extra-dermatologiques et constituent les formes syndromiques. Elles sont le plus souvent limitées à la peau (formes non syndromiques) (39).

1. Les formes non syndromiques

a. Ichtyose vulgaire

L'ichtyose vulgaire est la forme la moins sévère des ichtyoses. Elle est caractérisée par une xérose, une desquamation, un prurit et une atopie prononcée. Le dos et les jambes sont principalement atteints, le thorax a tendance à être épargné. Une kératose pilaire est souvent associée à l'ichtyose vulgaire. Des mutations autosomiques semi-dominantes du gène de la profilaggrine (*FLG*) sont responsables de cette maladie. La profilaggrine est un précurseur de la filaggrine qui intervient dans la différenciation terminale de l'épiderme. L'incidence de cette maladie est estimée à 1 / 300. Lorsque les 2 allèles du gène FLG sont touchés par une mutation, l'ichtyose est sévère tandis qu'une forme plus légère est observée lorsqu'un seul allèle est touché.

b. Ichtyose liée à l'X

Anciennement appelée « ichtyose noire », l'ichtyose liée au sexe est en rapport avec des mutations, le plus souvent des délétions larges, du gène *STS* qui code pour la Stéroïde Sulfatase). Cette enzyme est responsable de l'hydrolyse des sulfates de cholestérol. En cas de mutation, la différenciation épidermique et la formation des corps lamellaires sont perturbées.

C'est une ichtyose plus sévère que l'ichtyose vulgaire avec des squames brunes ou grisâtres, larges et de forme polygonale. Cette ichtyose s'exprime chez l'homme (forme hétérozygote). Des observations de femme atteinte (forme homozygote) ont été exceptionnellement rapportées dans la littérature. Son incidence est estimée entre 1 / 2000 et 1 / 6000.

c. <u>Ichtyose Harlequin</u>

C'est l'ichtyose génétique la plus sévère avec un mode de transmission autosomique récessif. Les squames sont épaisses et larges, présentes sur tout le corps, et sont associées à un ectropion (éversion des paupières) et un éclabion (éversion des lèvres) prononcés. Le développement de la peau est altéré *in utero* et les nouveaux nés sont appelés bébés collodions en raison d'une peau tendue, brillante et craquelée comme une feuille de collodion. Les mutations associées à cette maladie se situent sur le gène *ABCA12* qui code pour une protéine impliquée dans le transport des lipides présents dans les corps lamellaires. Les mutations provoquant une perte de fonction d'ABCA12 conduisent à une perturbation du transport des corps lamellaires et un trouble de la différentiation épidermique. L'incidence de cette maladie est évaluée à 1 / 1 000 000.

Des anomalies des CER ont été détectées dans l'ichtyose Harlequin. Dans un modèle murin (*abca12^{-/-}*), les CER totaux sont diminués dans la peau des souris, cette réduction est plus marquée (plus de 90% par rapport à la peau normale) pour les esters d'acide linoléique, un composant des acyl-CER. Les précurseurs glycosylés (Glc-CER) des Acyl-Cer EOS étaient quant à eux augmentés dans la peaudes souris *abca12^{-/-}* (d'environ 5 fois par rapport aux souris *abca12^{+/+}*) (40). Cependant, chez l'homme, il a été montré un défaut d'accumulation des glc-CER dans les corps lamellaires des kératinocytes de patients atteints d'ichtyose Harlequin (41).

d. Ichtyose lamellaire

L'ichtyose lamellaire est moins grave que l'ichtyose Harlequin. Les squames couvrent presque toute la surface du corps. Elles sont larges, épaisses et de couleur gris foncé. Les patients atteints d'une ichtyose lamellaire sont souvent nés bébés collodions. Au plan génétique, cette ichtyose est hétérogène. Des mutations de multiples gènes ont été identifiées: Transglutaminase 1 (*TGM1*), *ABCA12*, *CYP4F22*, *NIPAL4* (appelé aussi *ICHTHYIN*), *PNPLA1*, Lipoxygénase 3 (*ALOXE3*), Céramide Synthase 3 (*CERS3*), Lipoxygénase 12B (*ALOX12B*) et la lipase N (*LIPN*).

Une perturbation des enzymes ALOX12B, ALOXE3, NIPAL4 et TGM1 a été rapportée dans différentes ichtyoses par immunofluorescence sur sections de peau de patients. Lorsque le gène *ALOX12B* est muté, il y a une diminution d'intensité de la protéine ALOX12B dans l'épiderme, une légère augmentation de l'ALOXE3 et une augmentation d'intensité de NIPAL4. Quand *ALOXE3* est muté, il y a une augmentation d'intensité d'ALOX12B, une légère augmentation d'intensité d'ALOX12B, une légère augmentation d'intensité d'ALOX2B est un marquage plus intense de NIPAL4. Concernant les mutations de *NIPAL4*, ALOX12B est un peu plus intense dans les SS, SG et SC, l'ALOXE3 est plus intense dans le SC et NIPAL4 est diminuée dans la SG. Enfin, quand la *TGM1* est mutée, il n'y a pas de changement d'ALOXE3 et de NIPAL4 dans l'épiderme mais l'ALOX12B est plus intense dans les SS, SG et SC (42).

L'expression épidermique des CER est modifiée chez les malades avec une ichtyose lamellaire de façon variable. Les CER EOS, NS, NP, EOH, AS et AP ont été décrits comme tous abaissés (43), puis uniquement les CER EOS (44), ensuite les CER NS, NP, EOH et AS comme diminués alors que les espèces EOS et AP sont stables. Malheureusement, ces perturbations des CER ne peuvent être corrélées au profil génétique des patients car ces quantifications sont antérieures à la connaissance des gènes responsables des ichtyoses lamellaires (45). Dans un cas d'ichtyose lamellaire associée à une mutation de la TGM1, les CER liés à la CE étaient normaux (38). Dans des modèles murins d'ichtyose lamellaire par extinction des gènes ALOX12B ou ALOXE3 (ALOX12^{-/-}, ALOXE3^{-/-}), certains acyl-CER étaient anormaux quantitativement (ALOX12B^{-/-}) et les CER OS étaient diminués (ALOX12^{-/-} et ALOXE3^{-/-}) (46)(47).

Ces résultats montrent la variabilité de la quantité des différents lipides dans cette maladie aux origines génétiques nombreuses. Cette disparité pourrait notamment être expliquée par une origine génétique variable, les différents gènes impliqués dans cette maladie peuvent causer des altérations épidermiques différentes les unes des autres.

e. Ichtyose hystrix de Curth-Macklin

L'ichtyose hystrix de Curth-Macklin est une forme d'ichtyose rare dont le mode de transmission est autosomique dominant. Elle est liée à des mutations du gène de la Kératine 1 (*KRT1*). La kératine 1 est un élément important du cytosquelette des kératinocytes des couches SS et SG. L'ichtyose hystrix se manifeste par une ichtyose sévère qui apparait durant la petite enfance (les symptômes cutanées ne sont pas visibles à la naissance). Les squames sont épaisses et brunes et peuvent couvrir toute la surface du corps. Les patients souffrent également d'une kératodermie palmoplantaire qui a tendance à s'aggraver avec l'âge et à se surinfecter.

2. Les formes syndromiques

D'autres ichtyoses existent associées à des atteintes extra-dermatologiques. Ce sont les formes syndromiques des ichtyoses (48).

a. Syndrome de Netherton

Le syndrome de Netherton est une maladie rare avec une incidence de 1 / 200 000. C'est une maladie autosomique récessive associée à des mutations du gène serine peptidase inhibitor, Kazal type 5 (*SPINK5*) qui code pour la protéine Lympho-Epithelial Kazal-Typerelated Inhibitor (LEKTI), un inhibiteur de serine protéase.

Les patients sont atteints à la naissance d'une érythrodermie qui évolue dans l'enfance vers une ichtyose linéaire circonflexe. Il existe une dysplasie pilaire spécifique de ce syndrome (cheveux « bambous », trichorrhexie noueuse) et tous les cheveux sont affectés : ils sont courts, épars et secs. Une urticaire chronique, une rhinite allergique, un asthme, une augmentation des IgE et une hyperéosinophilie sont fréquemment présents dans cette maladie.

Il existe dans l'épiderme des patients atteints du syndrome de Netherton un amincissement du SG et du SC. Des corps lamellaires sont observés entre les kératinocytes. Des gouttelettes lipidiques sont présentes dans les cornéocytes (49).

Les lipides épidermiques des patients sont perturbés dans le SC. Il y a une diminution de longueur des chaînes des AG et une augmentation des AG monosaturés. Les CER à chaînes courtes sont augmentés tandis que ceux à chaînes longues sont diminués.

Les enzymes impliquées dans la synthèse de ces lipides sont modifiées, notamment la β -glucocérébrosidase (GBA) qui présente un défaut de localisation en étant plus diffuse dans l'épiderme (22).

b. Syndrome de Sjörgen-Larsson

C'est une maladie rare provoquée par des mutations de la Fatty Aldehyde DeHydrogenase (FALDH) qui est codée par le gène *ALDH3A2*. La FALDH est une enzyme qui oxyde les aldéhydes à chaînes longues en AG. Cette maladie est caractérisée par une érythrodermie et une ichtyose prurigineuse peu intense à la naissance qui s'aggrave avec l'âge.

Le tableau clinique comporte également une paralysie spastique, un retard mental sévère et une dégénérescence de la rétine. Sa prévalence est estimée à 1 / 250 000.

Histologiquement, il existe une hyperkératose, une papillomatose, une cornification incomplète, un épaississement de l'épiderme, en particulier du SG. Une augmentation du nombre de mitochondries est observée en microscopie électronique ainsi que la présence de vacuoles lipidiques dans le SC.

Les CER épidermiques des patients atteints de SLS sont altérés dans le SC. Une espèce d'acyl-CER associée à la CLE est augmentée, alors que 3 CER à chaînes longues (EOS, AP et AH) sont diminués (50)(44).

c. Maladie de Refsum

C'est une maladie très rare associée à des mutations du gène *PHYH* codant pour la phytanoyl-CoA hydroxylase ou du gène Peroxisomal assembly protein 7 (*PEX7*). Ce syndrome se développe durant l'enfance et l'adolescence de manière progressive. Les symptômes sont une polynévrite, une rétinite pigmentaire et une surdité. Les patients peuvent développer une ichtyose vulgaire tardivement, les squames étant brunes.

Un épaississement du SC (hyperkératose marquée) et une diminution des kératinocytes du SG sont observés en histologie cutanée. Il y a parfois des vacuoles lipidiques dans les cellules du SB.
d. Maladie d'Austin

Cette maladie, aussi appelée « déficience multiple en sulfatases avec ichtyose » est rare. Elle est liée au gène qui code pour la Sulfatase-Modifying Factor-1 (*SUMF1*). Les mutations de ce gène conduisent à une accumulation de sulfatides, stéroïdes sulfates, sphingolipides et glycosaminoglycanes sulfatés. Cela est dû à une perturbation des stéroïdes sulfatases comme pour l'ichtyose liée à l'X ou une anomalie des arysulfatase A et B.

Les patients ont un tableau de leucodystrophie métachromatique, une ichtyose, une hépatosplénomégalie, une surdité, une hypotonie, et des traits faciaux grossiers.

En histologie, il y a un épaississement du SC et parfois une légère augmentation d'épaisseur du SG.

e. Le syndrome « Kératite-Ichtyose-Surdité » (KID)

C'est une maladie rare autosomique dominante. Le syndrome KID est provoqué par des mutations hétérozygotes du gène *GJB2*, qui code pour la connexine-26 (Cx26).

Les patients ont une érythrokératodermie avec des plaques sur le visage, les oreilles, les coudes et les genoux. Cette érythrokératodermie est associée à une kératodermie palmoplantaire diffuse. Ils ont une alopécie progressive, des sourcils et cils épars ou absents et des ongles déformés. Ils ont aussi une kératite et une surdité neuro-sensorielle. Ce syndrome est proche de l'ichtyose hystrix de Curth-Macklin à la différence que dans cette ichtyose, il y a une accumulation de la kératine autour du noyau visible en microscopie électronique.

Histologiquement, dans le syndrome KID, l'épiderme est dentelé, et dans les sites lésionnels, un épaississement du SC est présent. Il n'y a pas d'anomalies caractéristiques décelées en microscopie électronique.

Dans un modèle murin de syndrome KID (souris génétiquement modifiées ayant une mutation hétérozygote Cx26-S17F), les acyl-CER (espèces EOS) sont fortement diminués et ne semblent pas être libérés correctement dans le SC. En revanche, d'autres CER étaient augmentés (espèces NS) (51).

37

f. Trichothiodystrophieavec ichtyose

La trichothiodystrophie avec ichtyose ou PIBIDS (Photosensitivity-Ichthyosis-Brittle hair-Infertility-Development delay-Short stature) est une maladie rare liée à des mutations dans le gène *XPD* (aussi nommé *ERCC2*). Des mutations du gène *XPB* (*ERCC3*) ont aussi été trouvées (52). Ce sont des gènes qui codent pour des hélicases importantes pour la formation d'un complexe impliqué dans la transcription : TFIIH.

Certains patients sont nés bébés collodions. Ils sont de petite taille, ont un retard mental et un visage caractéristique de cette maladie (aspect sénile évoquant une progéria). Ils présentent aussi un hypogonadisme et une photosensibilité. Dermatologiquement, ils ont des cheveux fragiles et une ichtyose érythémateuse avec des squames brunes.

g. Syndrome de Conradi-Hünermann-Happle et CHILD

Liée à l'X, cette maladie dominante est associée à des mutations du gène codant pour une stérol isomérase, l'emopamil-binding protein (EBP) qui est impliquée dans la synthèse du cholestérol. Un autre nom du syndrome est chondrodysplasie ponctuéedominante liée à l'X de type 2 (« X-linked dominant chondrodysplasia punctata-2 », CDPX2). Ce syndrome touche majoritairement les femmes et est létal chez les hommes. Cliniquement, les patients ont une érythrodermie ichtyosiforme avec des zones réservées de peau saine. Il peut y avoir des lésions érythémateuse et squameuses suivent les lignes de Blaschko à la naissance et qui diminuent après quelques mois. Une kératodermie palmo-plantaire et une alopécie peuvent être observées. En dehors de l'aspect dermatologique, des anomalies osseuses (scoliose, asymétrie de longueurs des membres, petite taille) et une cataracte sont présentes. Histologiquement, il existe dans les lésions ichtyosiques un épaississement du SC, une diminution du SG et une cornification incomplète. Le syndrome CHILD (Syndrome d'hémidysplasie congénitale-naevus ichtyosiforme-anomalies des membres) est proche en termes de mécanisme physiopathologique du syndrome de Conradi-Hünermann-Happle. Il est provoqué par des mutations dans le gène NSDHL qui code pour une autre protéine impliquée dans la synthèse du cholestérol. Son diagnostic différentiel inclut la chondrodysplasie ponctuée dominante liée à l'X, le syndrome du naevus sébacé (naevus sébacé segmentaire étendu associé à des anomalies du système nerveux) et les naevus épidermiques verruqueux.

h. Syndrome IFAP

Des mutations du gène de la protéase MBTPS2 (Membrane-Bound Transcription Factor Protease site 2) provoque le syndrome IFAP (Ichthyosis Follicularis with Alopecia and Photophobia). Cette maladie se définit par une ichtyose modérée, avec des lésions cutanées principalement observées aux fesses et aux genoux. Une alopécie complète, une photophobie et une anhidrose sont aussi présentes. Le dosage des immunoglobulines (IgG, IgM, IgA et IgE) est augmenté dans le sang.

Histologiquement, l'épiderme est épaissi au niveau des orifices folliculaires formant des bouchons cornés. Une atrophie des follicules pileux avec une infiltration cellulaire périphérique est parfois constatée. Les glandes sébacées sont également absentes et les glandes sudorales eccrines diminuées.

i. Syndrome CEDNIK

Le syndrome CEDNIK (Cerebral Dysgenesis - Neuropathy-Ichthyosis - palmoplantar Keratoderma) est un syndrome neurocutané provoqué par des mutations du gène *SNAP29*. Ce gène code pour une protéine SNARE qui joue un rôle dans le transport vésiculaire. Cette maladie autosomique récessive est caractérisée par une ichtyose et une kératodermie palmoplantaire, apparaissant quelques mois après la naissance et s'aggravant à l'âge de 2 ans. Les patients développent également des troubles psychomoteurs et une surdité de perception modérée.

L'analyse histologique retrouve une hyperkératose avec un SC très épais. Les glc-CER, précurseurs des CER sont anormalement retenus dans la couche basse du SC en rapport avec une perturbation de la libération des lipides présents dans les corps lamellaires.

j. Syndrome NISCH

Autosomique récessif, le syndrome NISCH (Neonatal Ichthyosis-Sclerosing CHolangitis) a été décrit en 2004 et est associé à des mutations du gène *CLDN1* qui code pour une protéine des jonctions serrées, la claudine 1. Cette protéine joue un rôle dans la barrière cutanée en diminuant la perte hydrique intercellulaire.

Les patients sont atteints d'une érythrodermie à la naissance qui évolue vers une ichtyose vulgaire. Ils ont également une alopécie cicatricielle et des anomalies unguéales et dentaires (dysplasie de l'émail, oligodontie).

Histologiquement, il y a une acanthose, une hyperkératose orthokératosique et des vacuoles des kératinocytes basaux. Des vacuoles sont retrouvées de façon variable dans les éosinophiles, les neutrophiles et les lymphocytes selon les patients.

Ces vacuoles sont de siège intracytoplasmique, de petite taille et négative à la coloration Oil-Red-O qui révèle les lipides neutres (53)(54)(55).

k. Maladie de Gaucher

Des mutations du gène *GBA* codant pour une enzyme impliquée dans la synthèse des CER, la β -glucocérébrosidase, provoquent la maladie de Gaucher. Le mode de transmission est autosomique récessif. Les patients peuvent naître comme bébé collodions. Ils présentent une érythrodermie ichtyosiforme congénitale etune surchage lysosomale pour certains d'entre eux (type 2). Ces malades ont également une hépatosplénomégalie, une thrombopénie, des déformations osseuses et parfois des manifestations neurologiques. Il existe trois types de la maladie de Gaucher. Le type 1 est le plus fréquent et les patients n'ont pas de symptômes neurologiques. Dans le type 2, les malades ont des anomalies dermatologiques et neurologiques et peuvent mourir vers l'âge de 2 ans. Dans le type 3, il a également une atteinte neurologique avec encéphalopathie.

En microscopie électronique, dans la peau des patients atteints de maladie de Gaucher de type 2, il existe une anomalie des corps lamellaires. Parallèlement, on observe une diminution des CER et une augmentation des glc-CER (56).

I. Syndrome neuro-ichtyotique

Ce syndrome récessif rare décrit en 2011 est caractérisé par des mutations hétérozygotes du gène codant l'enzyme élongase-4 (ELOVL4). Ce gène code pour une protéine qui intervient dans le processus d'élongation des AG.

Les patients ont une ataxie spinocérébelleuse ainsi qu'une ichtyose. Histologiquement, il existe au niveau cutané une hyperkératose et une acanthose. Un œdème peut être présent dans le SB, ainsi qu'un infiltrat lymphocytaire dans le derme (57)(58)(59).

m. Syndrome de Dorfman-Chanarin

La première description de cette maladie remonte à 1966 puisque sont alors rapportées dans la littérature deux sœurs ayant des vacuoles lipidiques dans les neutrophiles (anomalie de Jordan) et une ichtyose. C'est en 1974 et 1975 que Dorfman et al. et Chanarin et al. décrivent chacun le tableau clinique complet, caractérisent la surcharge lipidique et montrent le caractère systémique de la maladie. La maladie prend alors le nom de syndrome de Dorfman-Chanarin (SDC).

Le syndrome de Dorfman-Chanarin est une maladie héréditaire à transmission autosomique récessive. Il est caractérisé par une érythrodermie ichtyosiforme congénitale non bulleuse associée à une surcharge systémique de triglycérides neutres. Cette surcharge lipidique a donné un nom alternatif au SDC : NLSDI (« neutral lipid storage disease with ichthyosis » ou maladie de surcharge à lipides neutres avec ichtyose). Celle-ci se caractérise cliniquement par une stéatose hépatique, une cataracte sous-capsulaire postérieure, une surdité de perception et parfois une myopathie. Une élévation des enzymes musculaires et hépatiques est quasi constante, alors que les taux sanguins des triglycérides et du cholestérol sont normaux.

Ce syndrome est caractérisé histologiquement par la présence de vacuoles lipidiques dans tous les tissus. Le diagnostic est évoqué devant la présence quasi pathognomonique de vacuoles lipidiques dans les polynucléaires neutrophiles (anomalie de Jordan) (Figure 6b). Les vacuoles lipidiques sont aussi observées dans les différentes couches de l'épiderme en microscopie électronique (Figure 6c).

Le SDC est à différencier d'une autre maladie de surcharge à lipides, le NLSDM (maladie de surcharge à lipides neutres avec myopathie). Le NLSDM et le SDC sont indissociables en termes de surcharge lipidique avec la même présence de vacuoles lipidiques dans les neutrophiles mais le tableau clinique est un peu différent associant une myopathie, une hépatomégalie et une cardiomyopathie.

41

Contrairement au SDC, ces patients n'ont pas d'atteinte cutanée. Le NLSDM est provoqué par une mutation de la lipase ATGL (Adipose Triglyceride Lipase) (60).

En microscopie optique, il existe dans la peau des patients SDC une acanthose, une hyperkératose orthokératosique (Figure 6a) et parfois des kératinocytes basaux clarifiés.

En microscopie électronique, il existe des vacuoles sans membrane dans les kératinocytes y compris les cornéocytes, dans les fibroblastes, dans les mastocytes (Figure 6c), etc... Chez un patient, l'analyse détaillée en électronique montrait que dans les kératinocytes de la couche granuleuse, les corps lamellaires étaient nombreux, de grande taille et de forme irrégulière, sans avoir leur structure lamellaire habituelle ; des corps lamellaires accumulés pouvaient avoir une structure intermédiaire entre un corps lamellaire et une vacuole lipidique.

Certains corps lamellaires anormaux étaient sécrétés dans l'espace intercellulaire. Dans la couche cornée, étaient présents des vacuoles intracytoplasmiques et des espaces clairs intercellulaires (61). Chez deux autres patients, il existait dans les corps lamellaires des micro-inclusions lipidiques qui étaient sécrétés à l'interface SG-SC. La sécrétion de ces corps lamellaires semblait normale car il n'y avait pas de persistance de ces corps lamellaires dans les cornéocytes. Des espaces clairs intercellulaires remplis de lipides étaient observés dans la couche cornée. Il était proposé par les auteurs que ces dépôts soient liés à l'accumulation de triglycérides qui ne pourraient pas être intégrés dans les lamelles avec séparation des phases lamellaire/non-lamellaire (62)(63). Les protéines de l'enveloppe cornée (CE) étaient décrites comme normales chez 1 patient (61) et les lipides associés à la CE étaient absents chez 3 autres patients en microscopie électronique (62)(64).

Une diminution des céramides a été montrée dans le SC d'un patient par plusieurs méthodes (chromatographie couche mince et imagerie en spectrométrie de masse). Les CER EOS, OH et OS étaient diminués chez ce patient, tandis que les CER NS, NP et AS étaient présents en quantité normale (65)(64).



Peau normale

Frottis sanguins

Syndrome de Dorfman-Chanarin



Microscopie électronique

Figure 6. Histologie du syndrome de Dorfman-Chanarin. **a.** Histologie standard avec coloration H&E d'une biopsie de peau normale et de peau d'un patient atteint de SDC. L'épiderme est délimité par des pointillés. On observe un épaississement épidermique chez le patient atteint de SDC et un SC nettement plus épais. **b.** Frottis sanguin de 2 patients atteints d'un SDC montrant la surcharge en lipides neutres (anomalie de Jordan) sous forme de vacuoles optiquement vides (flèches noires). **c.** Microscopie électronique montrant des vacuoles sans membrane (flèches orange) dans un mastocyte et dans différentes couches de l'épiderme chez un patient atteint de SDC (clichés Pr. C. Prost). Barre = 100 μm

Dans les années 1990, les équipes d'Igal et al. et de Salveyre et al. ont étudié l'accumulation de triglycérides du SDC en utilisant des techniques de biochimie classique (expériences de pulse-chase). Elles ont démontré que les fibroblastes de SDC ne présentaient pas d'anomalie dans l'anabolisme, le catabolisme, ni la β -oxydation des triglycérides mais dans le recyclage des AG à chaînes longues.

C'est en 2001 que l'origine de la maladie est définitivement établie. Une approche de génétique inverse a permis de démontrer que le SDC était associé à des mutations du gène *CGI-58*, renommé ensuite *ABHD5*. Depuis et à ce jour, 36 mutations différentes ont été décrites (Tableau 4).

Le tableau 5 récapitule les gènes mutés dans les différentes ichtyoses, les numéros OMIM de chaque maladie et l'existence d'une anomalie des CER épidermiques.

Mutation génomique	Conséquence protéique	Région altérée du gène ABHD5	Référence(s)
g.43728907_43732862del3955ins26	Absence de protéine	Exon 1	(66)
19G>A	E7K	Exon 1	(67)
46/47delAG	35X	Exon 1	(67)
IVS1+1G>A	S17X	Intron 1	(68), (69), (70), (71)
98G>C	\$33X	Exon 2	(72), (67)
135-2A>G	altération d'épissage	I2/E3	(67)
150C>G	Y50X	Exon 3	(73)
215T>C	I72T	Exon 3	(74)
217T>G	\$73A	Exon 3	(73)
245A>G	H82R	Exon 3	(75)
297C>A	C99X	Exon 3	(76)
343A>G	S115G	Exon 3	(77)
389A>C	Q130P	Exon 3	(78), (67)
413G>A	W138X	Exon 3	(79)
506-3C>G	altération d'épissage	I3/E4	(80)
507-1G>A	altération d'épissage	Intron 3	(81), (72)
InsLine1 Intron 3	altération d'épissage	Intron 3	(82)
550C>T	R184X	Exon 4	(83), (61)
552A>G	R184X	Exon 4	(72)
568C>T	Q190X	Exon 4	(78)
594insC	N209X	Exon 4	(84), (67), (71), (85), (86), (87)
616insGGG+del 31pb	Décalage du cadre de lecture et codon stop	Exon 4	(88)
662-1330_773+46del	G221VfxX9	I4/E5/I5	(68)
673delG	V225Cfs	Exon 5	(72)

700C>T	R234X	Exon 5	(68), (89), (90), (75)
752A>C	P251H	Exon 5	(91)
774-1G>A	altération d'épissage	Intron 5	(67), (92), (93)
773+1delG	altération d'épissage	Intron 5	(94)
778G>A	E260K	Exon 6	(78), (67)
838C>T	R280X	Exon 6	(90)
890T>C	R297X	Exon 6	(72)
898_*320del	1300X	E6/I6/E7	(68)
934C>T	R312X	Exon 6	(95), (88)
960+5G>A	A321VfsX10	Intron 6	(96), (68)
IVS6+6 T>A	altération d'épissage	Intron 6	(97)
1007G>T	Q336X	Exon 7	(98)

 Tableau 4. Tableau des 36 mutations distinctes du gène ABHD5 décrites en 2016 dans le SDC. Les variations de séquence génomique, la localisation dans le gène de ces variations et les conséquences protéiques de ces mutations sont présentées.

Ichtyose	OMIM	Gène(s) impliqué(s)	Troubles des céramides de l'épiderme
Ichtyose vulgaire*	146700	FLG	
Ichtyose liée à l'X*	308100	STS	
Ichtyose Harlequin*	242500	ABCA12	Х
	242300, 601277, 604777,	TGM1, ABCA12, CYP4F22	
Ichtyose lamellaire*	612281, 615024, 606545,	NIPAL4, PNPLA1, ALOXE3,	x
	615023, 242100 et 613943	CERS3, ALOX12B et LIPN	
Ichtyose hystrix Curth-Macklin*	146590	KRT1	
Syndrome de Netherton	256500	LEKTI	Х
Syndrome de Sjörgen-Larsson	270220	FADH	X
Syndrome de Refsum	266500 et 614879	PHYH et PEX7	
Maladie d'Austin	272200	SUMF1	
Syndrome KID	148210	GJB2	
Syndrome IBIDS			
Syndrome Conradi-Hünermann-Happle	202050 ++ 200050		
et CHILD	302960 et 308050	EBP et NSDHL	
Syndrome IFAP	308205	MBTPS2	
Syndrome CEDNIK	609528	SNAP29	Х
Syndrome NISCH	607626	CLDN1	
Maladie de Gaucher (type 2)	230900	GBA	Х
Syndrome de Dorfman-Chanarin	275630	ABHD5	X

Tableau 5. Tableau des différentes ichtyoses génétiques. * = ichtyose non syndromique et I = Ichtyose.

C. <u>ABHD5</u>

1. <u>Généralités</u>

CGI-58 (Comparative Genomic #58), est un gène décrit en 2000 par comparaison génomique entre le ver *Caenorhabditis elegans* et *Homo sapiens* (99). C'est la 58^{ème} séquence à être homologue parmi 150 autres dans une base d'EST chez l'homme. Il a été renommé ABHD5 (α/β Hydrolase Domain containing protein 5) car la protéine codée présente un domaine α/β hydrolase, qui est un repliement d'hélices α et de feuillets β retrouvé chez certaines hydrolases (61). C'est un gène hautement conservé parmi les espèces, retrouvé chez la plante *Arabidopsis thaliana* ou encore la souris *Mus musculus*, avec une homologie de séquence protéique de ABHD5 d'autant plus élevée que les espèces sont proches de l'homme.

ABHD5 est une protéine minoritaire cytosolique, présente dans les mitochondries et à la surface des vacuoles lipidiques, organites qui stockent des lipides cellulaires. Elle interagit avec des protéines présentes à la surface de ces vacuoles, les protéines PAT pour : Périlipine, ADRP et TIP-47, cet aspect sera développé ci-dessous (100)(101).

2. Caractéristiques d'ABHD5

a. Génétique et biochimie d'ABHD5

Chez l'Homme, *ABHD5* est un gène de 28kb composé de 7 exons et localisé sur le bras court du chromosome 3 en position 21 (3p21). Il est transcrit en un ARNm de 1362 pb avec une partie codante de 1047 pb. Des formes alternatives du transcrit d'ABHD5 ont été décrites dans d'autres espèces : une plus longue chez *Arabidopsis thaliana* (102), deux plus courtes chez *Mus musculus* (épissage alternatif des exons 2 et 3) (103) et *Sus scrofa* (porc, épissage alternatif de l'exon 3) (104).

L'ARNm d'ABHD5 de l'Homme code pour une protéine ubiquitaire de 349 a.a. avec un poids théorique de 39095 Da. Elle a été identifiée par western blot et migre à 45 kDa. Cette protéine possède 2 a.a. de la triade catalytique habituelle des lipases mais un a.a. différent pour le troisième (GXDXG au lieu de GXSXG, où X est n'importe quel a.a.) possédant une asparagine à la place de la sérine (67). Le pseudo-domaine α/β hydrolase est situé entre les a.a. 104 et 345 (105). Cependant, il a été démontré expérimentalement que la protéine ABHD5 ne possède pas d'activité enzymatique similaire aux lipases, niaux hydrolases (78). Un motif correspondant à une activité acyltransférase (HX₄D) est situé entre les a.a. 327 et 332 (106).

Aucune phosphorylation de la protéine ABHD5 n'est démontrée à ce jour chez l'homme. Cependant, chez la souris, une phosphorylation de la sérine en position 239 est possible sous l'action de la protéine kinase A (PKA) (107).

b. Fonctions d'ABHD5

La fonction majeure d'ABHD5 est de stimuler l'activité de la lipase ATGL (Adipose Triglyceride Lipase) par le biais d'une interaction directe. Cette fonction a été décrite dans les cellules humaines cancéreuses HeLa, les fibroblastes humains (78), les cellules de singe COS-7 (108), les fibroblastes embryonnaires de souris déficiente en ABHD5 (109), un extrait de muscle squelettique de rat (110) et les adipocytes de souris 3T3L1 (111). Les caractéristiques de cette interaction entre ABHD5 et ATGL seront décrites dans la partie suivante en 3.a.

Une autre fonction d'ABHD5, décrite en 2010 est une fonction d'acylation de l'acide lysophosphatidique en acide phosphatidique (112). Cependant, en 2014, cette fonction a été infirmée par une autre équipe et attribué à un problème expérimental de contamination par la paroi bactérienne d'*Escherichia coli* (113).

Une autre fonction proche, décrite en 2014, est une activité acyltransférase transformant le lysophosphatidylglycérol en phosphatidylglycérol. Cette fonction a un rôle dans le cycle oxydatif mitochondrial et intervient dans l'autophagie et la mitophagie par la voie mTORC1 (114).

La protéine ABHD5 est également impliquée dans le transport des apolipoprotéines B dans le foie après l'hydrolyse des triglycérides des vacuoles lipidiques (115). ABHD5 va utiliser les triglycérides afin de les intégrer dans les lipoprotéines qui vont être sécrétées par les hépatocytes. En cas de réduction d'ABHD5, la sécrétion de ces lipoprotéines va diminuer également (116).

3. Molécules interagissant ou modulant d'ABHD5

a. Protéines du métabolisme lipidique

Adipose Triglyceride Lipase

L'Adipose Trigacylglycerol Lipase (ATGL), ou PNPLA2 est une enzyme de la lipolyse décrite en 2004 (117)(118)(119), qui hydrolyse les triglycérides en diglycérides et AG (120). Elle intervient dans le cycle lipolytique avant l'action de la lipase hormono-sensible (HSL) et de la lipase des monoglycérides (MGL) (121). Elle est localisée dans le cytosol à la surface des vacuoles lipidiques (122).

L'activité de cette lipase est principalement étudiée dans les adipocytes et le tissu adipeux blanc, lieu principal de la dégradation des triglycérides comme fournisseur d'énergie par le catabolisme des lipides (123). L'intensité de l'activité lipolytique va dépendre de l'état du système: en condition basale ou sous l'effet d'une stimulation par des catécholamines, et en période pré- (lipolyse) ou post-prandiale (stockage des lipides) (124). ATGL dégrade les triglycérides porteurs, préférentiellement, d'acides gras à chaînes longues, saturés ou non avec une préférence pour l'acide palmitoléique ; de plus, l'ATGL produit des diglycérides au numéro stéréospécifique (ce numéro concerne l'organisation des carbones du glycérol selon la représentation de Fischer) sn- 1,3 et sn- 2,3. L'acide gras libéré du triglycéride se situe préférentiellement en position sn-2 ou en position sn-1 sur ce triglycéride (125).

La lipase ATGL peut interagir avec 2 partenaires: ABHD5 et G0S2 (G0/G1 switch gene 2) (78)(126).

Cette interaction entre ABHD5 et ATGL nesemble pas avoir lieu dans les kératinocytes. En effet, la protéine ATGL semble être absente de l'épiderme. D'ailleurs, les patients atteints de NLSDM ayant une mutation d'ATGL n'ont pas de vacuoles lipidiques dans leurs kératinocytes (60).

ABHD5 augmente l'activité enzymatique de la lipase ATGL. Cette augmentation est rapportée dans différentes études avec une intensité différente. Cette variation est expliquée par l'origine des espèces dans lesquelles cette activité est testée, le type de tissu employé ou le type cellulaire utilisé. Par exemple, dans différents lysats tissulaires de souris, l'ajout d'ABHD5 recombinante permet d'augmenter l'activité d'ATGL de 4 fois (activité évaluée par suivi radioactif d'un substrat d'ATGL, la trioléine). Dans les cellules Cos-7 transfectée avec des vecteurs codants pour ABHD5 et ATGL humains ou ABHD5 et ATGL murins, l'activité d'ATGL est augmentée respectivement de 20 et 4 fois (activité évaluée par suivi radioactif de la trioléine) (78). Dans les cellules HeLa transfectées avec des vecteurs codants pour ATGL et ABHD5 murins, en présence d'ABHD5, l'activité d'ATGL est augmentée de 4 fois (suivi radioactif de la trioléine) (126). Enfin, l'activité de l'ATGL humaine était augmentée de 6 fois en présence d'ABHD5 humaine dans les lysats cellulaire transfectées de cellules Cos-7 (suivi radioactif de la trioléine) (127).

L'interaction augmentant l'activité lipolytique d'ATGL se produit au niveau N-terminal (région minimale d'activation : a.a. 1 – a.a. 30) d'ABHD5 (128) et C-terminal d'ATGL (région minimale d'activité par interaction : après l'a.a 254 qui est une leucine) (108).

G0S2 a un rôle inhibiteur sur l'activité de la lipase ATGL (126). L'interaction entre ATGL et G0S2 a été démontrée dans le muscle squelettique humain et murin et dans le tissu adipeux de souris (126). Cette inhibition de l'ATGL par G0S2 permet de ne pas diminuer la quantité et la taille des vacuoles lipidiques adipocytaires car elles ne perdent pas leur contenu lipidique du fait de l'absence de lipolyse liée à ATGL (126). G0S2 est une protéine cytosolique qui semble se situer à la surface des vacuoles lipidiques des adipocytes lorsque l'ATGL s'y trouve. L'interaction entre G0S2 et la lipase ATGL se fait comme pour ABHD5 au niveau de la partie C-terminale d'ATGL (108). G0S2 contrôle la lipolyse de façon ATGL-dépendante, et une diminution de G0S2 par shRNA permet d'augmenter la lipolyse dans le muscle (129). Les ratios d'ABHD5 et de G0S2 par rapport à ATGL sont variables dans les différents types de muscle de rat. ABHD5 est présent en plus petite quantité par rapport à ATGL (130). Il a été suggéré qu'ABHD5 et G0S2 régulent ATGL par un mécanisme non compétitif dans les cellules HeLa (131).

<u>Périlipines</u>

Les périlipines (PLIN) sont des protéines présentes à la surface des vacuoles lipidiques et impliquées dans la lipolyse et l'adressage des différents acteurs de cette voie catabolique (132).

Les vacuoles lipides sont des vésicules de stockage de lipides qui pouvent être mobilisés durant la lipolyse par un mécanisme complexe faisant intervenir les périlipines, des lipases et des activateurs de lipases (ABHD5 notamment).

La majorité des cellules chez l'Homme contiennent des vacuoles lipidiques. Les adipocytes et les hépatocytes sont les 2 types cellulaires qui en possèdent le plus du fait de leurs activités de stockage, de dégradation et de synthèse des lipides. Les cellules non-adipocytaires ont des vacuoles lipidiques d'une taille allant de 100 à 200 nm de diamètre mais les adipocytes peuvent avoir des vacuoles d'un diamètre supérieur à 100 µm.

Les lipides qu'elles contiennent sont des triglycérides et des esters de stérol qui sont des lipides neutres.

Ces vacuoles sont composées d'une membrane de phospholipides avec des protéines la tapissant. Ces protéines sont les périlipines qui ont un rôle structural, des lipases (comme l'ATGL) qui ont un rôle dans le métabolisme lipidique et des protéines Rab (Rab18 et Rab5) pour le transport (133)(134).

Les périlipines sont les protéines majoritaires des vacuoles lipidiques. Elles forment une famille de 5 membres différents : PLIN1 (Périlipine A), PLIN2 (ADRP), PLIN3 (TIP-47), PLIN4 (S3-12) et PLIN5 (MLDP). ABHD5 interagit avec 4 d'entre elles :

PLIN1 est une protéine dont il existe 3 isoformes : les périlipines A, B et C. La périlipine A (la plus abondante des 3 isoformes) est localisée à la surface des vacuoles lipidiques des adipocytes de souris. La périlipine A est considérée par défaut comme PLIN1 (135)(136). PLIN1 est une protéine de 56 kDa. Elle est exprimée dans les adipocytes et les cellules stéroïdogéniques. PLIN1 est associée à ABHD5 à la surface des vacuoles lipidiques (137)(101). Cette interaction fait intervenir la partie C-terminalede PLIN1 et permet de séquestrer ABHD5 en condition basale (postprandiale), limitant de cette façon la lipolyse puisqu'ABHD5 interagit avec PLIN1 et non pas ATGL (101).

Ces périlipines peuvent être phosphorylées par des protéines kinases A après stimulation des récepteurs β -adrénergiques par des catécholamines. Ainsi, ABHD5 sera libéré de son interaction avec PLIN1 et migrera dans le cytosol pouvant allant s'associer avec la lipase ATGL et augmenter l'activité de dégradation des triglycérides une fois à proximité des vacuoles lipidiques. Cette interaction d'ABHD5 avec les vacuoles lipidiques se fait par sa partie N-terminale (a.a. 1 – a.a. 30) (128).

PLIN2 est une protéine ubiquitaire, très abondante dans le foie (138). Elle a un poids moléculaire de 48 kDa. Elle est impliquée dans la lipolyse, mais son rôle précis n'est pas clair. PLIN2 bloque l'accès de la lipase ATGL aux triglycérides en empêchant l'insertion de sa partie hydrophobe (139). De plus, lorsque PLIN2 est associée aux vacuoles lipidiques, celles-ci augmentent en taille (122). Cette protéine a été décrite comme partenaire de CGI-58 dans les cellules 3T3-L1 (pré-adipocytes de souris) par double-hybride (137), par GST pulldown (140) ou encore par immunoprécipitation (101). Cette interaction a été également démontrée par co-localisation en immunofluorescence (135) dans des cellules COS7 (fibroblastes de singe). Cependant, l'interaction entre PLIN2 et ABHD5 par immunoprécipitation n'a pas été retrouvée dans un autre article plus récent (110) dans le muscle de rat.

PLIN3 est une protéine de 47 kDa ubiquitaire.Elle a une homologie de 43% avec PLIN2 (139). Elle est identifiée avant tout comme une protéine cargo pour le récepteur du mannose-6phosphate (141). Cette protéine semble également impliquée dans le métabolisme des triglycérides. Elle a été retrouvée à la fois dans le cytosol et à la surface des vacuoles lipidiques des cellules cancéreuses humaines HeLa, des fibroblastes de souris, des mélanocytes humains, des cellules murines 3T3-L1, des cellules de Leydig, des cellules du tube séminifère, des cellules de Sertoli et des gamètes de souris (142)(143). À la différence de PLIN1 et PLIN2, PLIN3 reste stable en absence de vacuoles lipidiques et persiste dans le cytosol. Il a été suggéré que PLIN3 soit impliquée à la phase initiale de la formation des vacuoles lipidiques de certains types cellulaires (144)(134). Une interaction physique entre ABHD5 et PLIN3 a été démontrée dans le muscle du rat par immunoprécipitation (110). La périlipine 3 intervient dans le processus de relargage des particules virales du virus de l'hépatite C en association avec la protéine G Rab9 (Les protéines Rab sont impliquées dans le processus de transport vésiculaire (31)) (145). De plus, ABHD5 participe au processus de production des particules virales de l'hépatite C (146).

PLIN5 a été principalement retrouvée dans le myocarde, le foie et le muscle (138), et est une protéine de 50 kDa. Elle va interagir avec ABHD5 et ATGL et ainsi moduler l'activité lipolytique dans les vacuoles lipidiques (147)(148)(149). Cette interaction est démontrée dans les cellules 3T3-L1, COS-71, HEK293 (cellules rénales embryonnaires), CHO-K1 (ovaire d'hamster), les cardiomyocytes, le foie de souris et le muscle de rat. La périlipine 5 aurait un rôle comparable à PLIN1 (protéine qui est principalement présente dans les adipocytes) dans les tissus non-adipeux en séquestrant ABHD5, en diminuant l'activation de la lipase ATGL et de cette manière en réduisant la dégradation des triglycérides (150).

Fatty Acid Binding Protein

Les Fatty Acid Binding Protein (FABP) appartiennent à une famille multigénique de 10 protéines cytosoliques (chez l'Homme) qui interviennent dans le flux et le trafic des lipides, la lipolyse et la régulation de gènes métaboliques via la signalisation PPAR (151).

Le nom de chaque protéine provient du tissu où elle a été trouvéepour la première fois, mais à présent, elles ne sont plus exclusives d'un tissu. Ainsi FABP1 avait pour nomenclature Liver-FABP, FABP2 était Intestinal-FABP, FABP3 était Heart-FABP, FABP4 était Adipocyte-FABP et FABP5 était Epidermal-FABP (152). FABP4 et 5 sont retrouvées comme partenaires les plus fréquents d'ABHD5 chez l'homme et la souris, bien que FABP1, 2 et 3 interagissent aussi avec la protéine ABHD5.La protéine FABP4 murine va lier la protéine ABHD5 murine par ses résidus : phénylalanine-58, lysine-59 et les acides aspartiques-77 et -78. Chez la souris, la FABP4 peut stimuler indirectement l'activité lipolytique de la lipase ATGL à condition qu'ABHD5 soit associée à FABP4. Ainsi, ABHD5 est un adaptateur entre ATGL et FABP4 (153).

b. <u>Les miRNA</u>

Les micro-ARN ou miR(NA) sont de petits ARN d'environ 20 nucléotides qui régulent l'expression des gènes. L'existence de 2 miR diminuant l'expression du gène *ABHD5* a été mise en évidence :

miR 145 sous la dépendance de la protéine KSRP (KH-type splicing regulatory protein) (154) et le miR 124a (155). Dans le premier cas, la suppression de l'expression de la protéine KSRP augmente l'activité lipolytique dans les cellules 3T3-L1 par augmentation de l'expression d'ABHD5. KSRP étant impliquée dans le processus de maturation du MiR 145, l'inhibition de cette protéine perturbe la maturation du MiR qui n'ira pas réduire l'expression du gène ABHD5.

Le MiR 124a diminue l'expression de la lipase ATGL et d'ABHD5 dans les adipocytes de souris et provoque donc une diminution de l'activité de dégradation des triglycérides.

c. Autres protéines

Transporteur peroxysomal ABC1

Chez *Arabidopsis thaliana*, un orthologue d'ABHD5 a été décrit : At4g24160 (156). Cette protéine semble avoir un rôle similaire à ABHD5 chez l'homme car lorsque celle-ci est perturbée, une accumulation de lipides est observée dans cette plante (157).

Une interaction d'ABHD5 avec le transporteur peroxysomal ABC 1, PXA1, a été rapportée au niveau de la partie C-terminale de PXA1. PXA1 permet l'internalisation d'AG libres, en provenance des vacuoles lipidiques, dans le peroxysome afin qu'ils subissent une β-oxydation et soient utilisés pour la signalisation hormonale végétale. Une de ces hormones produite est l'auxine, qui est une hormone de croissance et l'autre est l'oxylipine impliquée dans la réponse au stress et dans l'immunité innée.L'orthologue probable de PXA1 chez l'Homme est l'Adrenoleukodystrophy protein (ALDP ou encore ATP binding cassette subfamily D member 1, ABCD1) (158). Cette interaction d'ABHD5 et PXA1 chez *Arabidopsis thaliana* a été localisée à proximité du peroxysome, localisation qui est différente dans d'autres espèces. Un des rôles évoquésdans l'interaction d'ABHD5 avec PAX1 serait de contribuer au transport des AG par PXA1 et de faciliter l'adressage des AG au peroxysome grâce à PXA1. L'implication d'ABHD5 dans le métabolisme des lipides d'*Arabidopsis thaliana* serait importante essentiellement dans les cellules qui ne stockent pas de lipides, plus que dans les graines, où les cellules vont stocker les nutriments (102).

Spermidine synthase 1

Chez les plantes, la spermidine synthase 1 (SPDS1) est une protéine impliquée dans le métabolisme des polyamines (spermidine, putrescine et spermine), hormones impliquées dans la croissance cellulaire et la tolérance au stress. Chez *Arabidopsis thaliana*, ABHD5 interagit et augmente l'activité de la SPDS1 et ainsi augmente la synthèse de spermidine. L'intervention d'ABHD5 dans le métabolisme des polyamines est indépendant de PXA1, mais semble quand même être modulé au niveau transcriptionnel par des signaux lipidiques (159). Chez l'Homme, il a été montré qu'ABHD5 à l'inverse diminue la production de spermidine dans les macrophages associés aux tumeurs du cancer colorectal (160).

De-Etiolated 3

Une autre protéine, la De-Etiolated 3 (DET3), a été découverte comme interagissant avec ABHD5 chez la plante. Cependant, la signification fonctionnelle de cette interaction reste à déterminer (159).

OBJECTIFS

Le SDC est une maladie de surcharge à lipides neutres liée à une mutation du gène ABHD5. Les dépôts intracellulaires de triglycérides sont bien expliqués par la réduction d'activité de la lipase ATGL qui n'est plus stimulée efficacement par ABHD5 muté. En revanche, le mécanisme de l'ichtyose du SDC reste inexpliqué. La deuxième fonction connue d'ABHD5 d'acylation du lysophosphatidylglycérol ne permet pas de formuler une hypothèse sur le mécanisme du trouble de la différenciation épidermique. Les CER sont des acteurs importants dans la barrière épidermique et quelques auteurs ont proposé qu'ABHD5 jouerait un rôle dans la genèse des CER en fournissant des acides gras pour les CER en stimulant une lipase ATGL-like ou en activant une autre enzyme spécifique (25)(26)(27). De plus, plusieurs ichtyoses génétiques étant liées à des mutations dans des gènes impliqués dans la voie de synthèse des CER et de rares travaux ayant montré des anomalies des CER dans le SDC, nous nous sommes intéressés à cette famille de molécules qui pourraient expliquer le développement d'une ichtyose. Nous avons analysé différentes enzymes impliquées dans la biosynthèse des CER chez des patients porteurs d'un SDC. Nous avons également recherché un nouveau partenaire protéique d'ABHD5 qui pourrait être impliqué indirectement dans la genèse de l'ichtyose du SDC.

Par ailleurs, le gène *ABHD5* ayant été découvert en 2000, peu de données sont disponibles sur la protéine ABHD5, en particulier dans les kératinocytes. Des transcrits alternatifs d'ABHD5 ayant été décrits dans plusieurs espèces animales, il pourrait en être de même chez l'Homme. D'autre part, une isoforme protéique d'ABHD5 codée par un transcrit alternatif chez l'Homme pourrait être impliquée spécifiquement dans la différenciation épidermique. Nous avons donc cherché par biologie moléculaire des formes alternatives d'ARNm et par des techniques de biochimie classique des isoformes de la protéine ABHD5.

La première partie des résultats synthétise les travaux effectués sur les céramides et les nouveaux partenaires d'ABHD5 en condition pathologique (SDC). Elle se présente sous la forme du manuscrit soumis au *Journal of Investigative Dermatology*.

La seconde partie expose en détail les résultats qui concernent l'étude moléculaire et biochimique d'ABHD5 en condition physiologique.

58

MATÉRIELS ET MÉTHODES

a. Échantillons humains

Des prélèvements de sang provenant du service de Dermatologie de l'hôpital Avicenne (Bobigny) ont été obtenus auprès du Pr. Frédéric Caux. Il s'agissait de sang de 5 personnes normales. Des biopsies de peau normale ontégalement été fournies par le Pr. F. Caux. Une biopsie large chirurgicale issue d'une plastie abdominale a été obtenue auprès du Pr. Christophe Barrat du Service de Chirurgie Générale de l'hôpital Jean Verdier (Bondy).

Un consentement éclairé a été signé par les patients et les sujets sains avant la réalisation des prélèvements sanguins ou cutanés.

b. <u>Échantillons de souris</u>

Cinq souris de deux espèces différentes (C57BL/6 et BALB/c) ont été utilisées. Après sacrifice et dissection à l'animalerie selon les règles de bon usage, 31 tissus ont été prélevés puis conservés à -80°C. La liste des tissus prélevés est présentée ci-dessous :

Organes	Lignées	Sexe
Testicule	C57BL/6	Mâle
Ovaire	C57BL/6	Femelle
Glande de Tyson	BALB/C	Mâle
Epididyme	C57BL/6	Mâle
Vésicule séminale	BALB/C	Mâle
Prostate	BALB/C	Mâle
Glande surrénale	C57BL/6	Femelle
Graisse abdominale	BALB/C	Mâle
Graisse péri-rénale	C57BL/6	Mâle
Graisse de la peau	BALB/C	Mâle
Graisse péri-testiculaire	C57BL/6	Mâle
Graisse péri-utérine	C57BL/6	Femelle
Muscle de la cuisse	BALB/C	Mâle
Cœur	BALB/C	Mâle
Langue	BALB/C	Mâle
Cerveau	BALB/C	Mâle

Organes	Lignées	Sexe
Cervelet	BALB/C	Mâle
Œil	C57BL/6	Mâle
Rate	BALB/C	Mâle
Foie	BALB/C	Mâle
Peau	BALB/C	Mâle
Utérus	C57BL/6	Femelle
Vagin	C57BL/6	Femelle
Poumon	BALB/C	Mâle
Thymus	BALB/C	Mâle
Colon	BALB/C	Mâle
Estomac	BALB/C	Mâle
Œsophage	BALB/C	Mâle
Vessie	C57BL/6	Femelle
Trachée	C57BL/6	Femelle
Rein	C57BL/6	Femelle

c. <u>Séparation des cellules sanguines</u>

Une séparation par gradient de densité utilisant du Ficoll a été pratiquée sur les échantillons de sang afin de récolter les cellules mononuclées. Le sang était dilué au ½ dans une solution de NaCl 0,9% (Versylene). Le sang dilué était déposé délicatement volume à volume sur une solution de milieu de séparation des lymphocytes (Lymphocyte Separation Medium, Eurobio). Cette suspension était centrifugée à 1200 rpm pendant 20 minutes à 20°C. Après centrifugation, la phase intermédiaire contenant les cellules mononuclées était prélevée à l'aide d'une pipette. Les cellules collectées étaient ensuite mises en culture ou centrifugées et congelées à -80°C sous forme d'un culot sec.

La séparation de l'ensemble des leucocytes se faisait de la même façon en utilisant le PolymorphPrep à la place du Ficoll.

d. Séparation de la peau par la dispase

Afin d'analyser les différents tissus constituant la peau, une séparation enzymatique a été réalisée afin de séparer l'épiderme du derme. Lorsque la biopsie cutanée chirurgicale a été reçue, l'hypoderme a été repéré grâce à son aspect jaunâtre et enlevé à l'aide d'un scalpel. L'hypoderme a été stocké à -80°C en attendant d'être analysé. La partie supérieure de la peau a été incubée avec de la dispase (Gibco).

La solution de séparation était constituée de 10mL de milieu de Hanks, 561 mg de dispase, 100 μ L de pénicilline (10 000 UI/mL) - streptomycine (10 000 μ g/mL) (Eurobio) et 1,25 μ L de gentamycine à 40 mg/mL. La solution était filtrée (0,2 μ), mise dans une petite boîte de Pétri et les morceaux de peau d'environ 1 cm² étaient ajoutés, épiderme dirigé vers le bas. La boîte de Pétri était mise à 4°C pendant la nuit et le lendemain matin, l'épiderme était séparé du derme à l'aiguille. Les échantillons de derme et d'épiderme étaient rincés avec une solution de sérum physiologique et étaient stockés indépendamment à -80°C.

e. Culture de fibroblastes dermiques

Afin d'établir une culture primaire de fibroblastes cutanés, une biopsie de peau était débarrassée de son hypoderme.

Le fragment contenant l'épiderme et le derme était découpé stérilement au moyen d'un bistouri en morceaux très fins (≈1 mm) qui étaient distribués au fond de petites boîtes de Pétri. Après 5 min, étaient déposés 10 ml de milieu RPMI 1640 avec 1% de pénicilline (10 000 UI/mL) - streptomycine (10 000 µg/mL), 10% de SVF décomplémenté et 10 µL d'amphotéricine B à 5 mg/mL. Les boîtes étaient mises à l'étuve à 37°C (5% de CO2). Lorsque les cellules étaient quasiment à confluence, elles étaient passées en flasques de 25 cm² puis 75 cm².

Ce passage était réalisé en décollant les cellules à l'aide d'une solution de trypsine-EDTA (0.5 g/L de trypsine et 0.2 g/L d'EDTA, Eurobio). Le changement de milieu de culture était effectué une fois par semaine.

f. Extraction des ARN totaux

Les extractions d'ARN totaux ont été réalisées à partir de cellules ou de tissus humains ou murins. Chez l'homme, les tissus suivants ont été utilisés: épiderme, derme, hypoderme, fibroblastes cutanés et cellules mononuclées du sang. Chez la souris, 31 organes ou tissus différents ont été étudiés. Le matériel à extraire était lysé dans 1 mL de Tri-Reagent (Molecular Research Center) adapté au type d'échantillons (dérivés du sang ou autres). À ce lysat étaient ajoutés 200 µL de chloroforme puis une centrifugation était réalisée (15 minutes, 12000 g, 4°C). La phase aqueuse qui contenait les ARN totaux était recueillie et 500 µl d'isopropanol étaient ajoutés. L'échantillon était centrifugé (8 minutes, 12000 g, 4°C) ce qui permettait la précipitation des ARN. Le culot d'ARN totaux était lavé dans de l'éthanol à 75%, puis centrifugé (5 minutes, 7500 g, 4°C). Le culot obtenu était resuspendu dans 34 µL d'eau DNAse free et incubé au bain marie à 60°C pendant 10 mn. Les échantillons étaient ensuite congelés.

g. <u>RT-PCR</u>

La réaction de transcription inverse (RT) était réalisée à partir de 11,5 μ L d'ARN totaux à l'aide de l'enzyme SuperScript III reverse transcriptase (Invitrogen). Aux ARN totaux étaient ajoutés 1 μ L de nucléotides 10 mM (dNTP) et 1 μ L d'oligonucléotides 5 mg/L (dT) et ce mélange était incubé 5 min à 65°C au thermocycleur.

Cent unités de l'enzyme dans un volume de 0,5 μ L étaient ajoutées ainsi que 4 μ L de solution tampon FS 5X et 2 μ L de dithiothréitol à 0,1 M. La transcription spécifique des ARNm était obtenue en plaçant les échantillons au thermocycleur pendant 50 min à 50°C puis 15 min à 70°C.

La concentration et la pureté des ADN complémentaires (ADNc) issus de la réaction de transcription inverse étaient mesurées par spectrophotométrie. La concentration d'ADNc était calculée automatiquement selon la formule suivante: (K1A1+K2A2+K3A3+K4A4) x K5 x Facteur de dilution où K1, K2, K3, K4 et K5 sont des constantes, A1 et A4 la densité optique à 260 nm, A2 la densité optique à 320 nm et A3 la densité optique à 280 nm. La pureté était calculée en fonction du ratio Densité Optique 260 nm / Densité Optique 280 nm.

La réaction d'amplification en chaîne (PCR) utilisait plusieurs couples d'amorces dont les séquences sont présentées ci-dessous. Les couples d'amorces ont été choisis en utilisant le logiciel Primer 3 (*biotools.umassmed.edu/bioapps/primer3_www.cgi*). La spécificité des réactions de PCR avec les couples d'amorces choisis a été vérifiée en réalisant une PCR *in silico* utilisant le logiciel MFEPrimer-2.0 (*biocompute.bmi.ac.cn/CZlab/MFEprimer-2.0/*).

LOCALISATION	SENS
Exon 1	1S : CGGTGATGAAAGCGATGG
Exon 2	2S : GTGGCTTCCTACCTGGTGTC
Exon 3	3S : AAAGAGCCTGTGCGCATATC
Exon 1 / Exon 4	1.4S : CGGTGGAGGGGTTAGTCAC

<u>Séquences des amorces utilisées pour l'amplification d'ABHD5 chez la souris (5'--> 3') :</u>

LOCALISATION	ANTISENS
Exon 7	7AS : TCAGTCTACTGTGTGGCAGATC
Exon 3	3AS : GACAGGCCTATCGGTGCTTA

Couples utilisés chez la souris :

1S – 7AS, Taille de l'amplicon : 1061 pb / Température d'hybridation : 60°C

2S – 7AS, Taille de l'amplicon : 985 pb / Température d'hybridation : 59°C

3S – 7AS, Taille de l'amplicon : 897 pb / Température d'hybridation : 59°C

1.4S – 7AS, Taille de l'amplicon : 553 pb / Température d'hybridation : 60°C

1S – 3AS, Taille de l'amplicon : 323 pb / Température d'hybridation : 60°C

LOCALISATION	SENS
Exon 1	1S : GAGGAGGAGGAGGTGGACTC
Exon 4	4S : CTCATTTTAGTGGAGCCTTGG
Exon 5	5S : AAGGCCTGATTTCAAACGAA

Séquences des amorces utilisées pour l'amplification d'ABHD5 chez l'Homme (5'---> 3') :

LOCALISATION	ANTISENS
Exon 3	3AS : GACAGGTCTGTTGGTGCAAA
Exon 4	4AS : CAAAGGGTCCTGCAATCCT
Exon 7	7AS : CAGTCCACAGTGTCGCAGAT
Exon 6	6AS : GTCTTCACATATGAATGTGGTCGT
Exon 6	Δintra6AS : CAAAGATCACTGAAACTTGGAGTC
Exon 4 / Exon 6	Δ5AS : GAAAGCTGTCTCACCACAAAG
Exon 4 / Exon 7	Δ5,6ΑS : TGCCCCAAGAATAGCCAAA
Exon 5 / Exon 7	Δ6AS : CCCAAGAATAGCCTTGGAGTC

Couples utilisés chez l'homme:

1S – 3AS, Taille de l'amplicon : 303 pb / Température d'hybridation : 60°C

1S – 4AS, Taille de l'amplicon : 652 pb / Température d'hybridation : 60°C (utilisable également chez la souris bien qu'il existe une différence mineure de nucléotides par rapport à la séquence murine) TGCCCCAAGAATAGCCAAA

- 1S 7AS, Taille de l'amplicon : 1040 pb / Température d'hybridation : 60°C
- 4S 7AS, Taille de l'amplicon : 533 pb / Température d'hybridation : 60°C
- 5S 7AS, Taille de l'amplicon : 366 pb / Température d'hybridation : 60°C
- 4S 6AS, Taille de l'amplicon : 440 pb / Température d'hybridation : 59°C
- 4S Δintra6AS, Taille de l'amplicon : 272 pb/ Température d'hybridation : 58°C
- $4S \Delta 5AS$, Taille de l'amplicon : 161 pb / Température d'hybridation : $58^{\circ}C$
- 4S Δ5,6AS, Taille de l'amplicon : 160pb / Température d'hybridation : 59°C
- 4S Δ6AS, Taille de l'amplicon : 269pb / Température d'hybridation : 59°C

Les conditions expérimentales de la PCR étaient les suivantes:

Une première dénaturation de 15 minutes à 95°C suivie de 35 cycles composés de trois étapes: une dénaturation de l'ADN pendant 1 minute à 94°C, une hybridation pendant 30 secondes à la température convenable selon les amorces et une élongation pendant 1 minute à 72°C. Une extension finale de 10 minutes à 72°C avait finalement lieu. Les fragments amplifiés ont été séparés par électrophorèse sur gel d'agarose à 2,5%, révélés par le GelRed et visualisés sous lampe UV.

h. Extraction des bandes d'intérêt en gel d'agarose

A l'issue des électrophorèses en gel d'agarose, certaines bandes d'intérêt ont été découpées. La purification du fragment présent dans l'agarose excisé a été faite à l'aide du kit Qiagen Gel Extraction.

Pour un échantillon de 100 mg de gel, celui-ci était dissout au bain marie à 50°C dans 300 µL d'un premier tampon pendant 10 minutes. La solution était déposée sur une colonne de séparation et la filtration se faisait par centrifugations successives à 11 000g pendant 1 minute à température ambiante. Deux lavages étaient effectués, le premier avec 0,5mL du premier tampon suivi d'une centrifugation à 11 000g pendant 1 minute à température ambiante et le second avec 0,75 mL du second tampon suivi d'une centrifugation à 11 000g pendant 1 minute à température ambiante. Une dernière centrifugation était faite pour éliminer le second tampon à 15 000g pendant 1 minute à température ambiante. L'ADNc présent dans l'agarose était élué en déposant 30-50 µL de tampon d'élution et en centrifugeant à 11000g pendant 1 mn à température ambiante. L'ADNc était présent dans le surnageant que l'on obtenait après centrifugation.

i. <u>Séquençage</u>

Les séquençages ont été réalisés dans les services de Biochimie et de Virologie de l'hôpital Avicenne (APHP, Bobigny, France). À partir des produits extraits des gels d'agarose, une réaction de séquençage était préparée avec le kit BigDye Terminator version 3.1 (Applied Biosystems), ceci pour chaque amorce.

Chaque réaction consistait en un mélange de 4 μ L de solution tampon, 2 μ L de mix V3.1 (contenant les dNTP fluorescents), 8,5 μ L d'eau DNase free, 3,5 μ L d'amorce à 10 pmol/ μ L et 2 μ L de l'ADN extrait. Ce mélange était soumis à 25 cycles de PCR selon le programme suivant:

- 96°C pendant 10 sec
- 50°C pendant 5 sec
- 60°C pendant 4 min.

Le produit de PCR était séparé des dNTP fluorescents grâce à des billes de Séphadex G50 (Amersham Pharmacia Biotech). Pour chaque produit à séquencer, un puits était préparé dans une plaque de filtration Millipore adaptée à une plaque de 96 puits, en déposant 125 μ L de Séphadex en suspension puis en centrifugeant à 900g pendant 5min. Cette étape était répétée trois fois. Les produits de réaction de séquençage étaient déposés sur les puits contenant le Séphadex. Une centrifugation de 2700rpm pendant 5min était effectuée permettant l'élution des produits à séquencer. Le séquençage était réalisé dans un automate ABI-PRISM 3100 Avant (Applied Biosystems) à l'aide des programmes Orxiwebdaemon et AEServer. La lecture et l'analyse des séquences obtenues se faisaient grâce aux logiciels Sequence Navigator et BioEdit.

j. Extraction des protéines cellulaires

Les protéines ont été extraites soit dans une solution compatible avec l'électrophorèse bidimensionnelle (7 M d'urée, 2 M de thiourée, 4% de chaps, 0.24% NP40, 1% DTT), soit dans une solution compatible avec l'immunoprécipitation (25 mM Tris-HCl pH 7.4, 150 mM NaCl, 1% NP-40, 1 mM EDTA, 5% glycérol). Chaque solution d'extraction contenait des antiprotéases / anti-phosphatases (Protease and Phosphatase Inhibitor Mini Tablets, Pierce). Une quantité de 1 g de tissus / ml de solution d'extraction était utilisée pour chaque extraction.

Les cellules étaient broyées au potter 10 minutes dans la solution d'extraction sur de la glace. Après incubation de 60 minutes à 4°C, le broyat était soumis à une sonication de 15 minutes à 4°C. Après une ultracentrifugation de 30 minutes à 150000g, le surnageantétait récupéré. La quantité de protéines présente dans l'extrait était dosée à l'aide du kit 2DQuant (GE Healthcare). L'extrait protéique était conservé à -20°C.

k. Extraction des protéines d'un gel d'acrylamide par élution passive

Deux mg de protéines extraites de graisse sous-cutanée étaient déposées sur toute la longueur (à la place des puits, avec un peigne n'ayant qu'une large dent) de deux gels d'acrylamide pour une migration en SDS-PAGE.

Après migration, les gels d'acrylamide étaient découpés entre les zones d'intérêts (entre 50 et 37 kDa, et entre 37 et 25 kDa) et deux bandes étaient obtenues.

Chaque bande (environ 5 cm x 0.5 cm x 0.15 cm) était découpée en petits cubes de gel qui étaient lavés 2 fois avec de l'eau distillée. Ces morceaux étaient mis en présence de 2 mL de tampon d'élution passive (50 mM de TrisHCl, 10 mM NaCl, 0.1 mM d'EDTA, Q.S.P 100 mL H2O MilliQ, solution tamponnée à pH = 7.5) respectivement et incubés à 30°C la nuit sous agitationdans une étuve.

Après cette incubation, les échantillons étaient centrifugés à 10 000g à 4°C pendant 10 minutes. Les surnageants étaient recueillis, et l'on y ajoutait 9 volumes d'acétone-méthanol (8 volumes d'acétone pour 1 volume de méthanol) pour 1 volume d'échantillon. La précipitation se faisait pendant la nuit à -20°C.

Puis, les solutions étaient centrifugées à 10 000g pendant 30 minutes à 4°C. Les protéines extraites formaient un culot. Le surnageant était éliminé par pipetage puis évaporation pendant 1h. Les protéines étaient reprises dans 200 μL (quantité minimum nécessaire) de solution compatible avec l'électrophorèse bidimensionnelle.

125 μL étaient utilisés pour l'électrophorèse bidimensionnelle suivie d'une coloration au bleu de Coomassie (découpe des taches polypeptidiques ou « spots » pour identification en spectrométrie de masse), et 35 μL étaient utilisés pour l'électrophorèse bidimensionnelle suivie d'un western blot anti-ABHD5 (pour localiser la protéine ABHD5 par superposition sur les gels colorés au bleu de Coomassie). Cela était effectué pour les deux régions d'intérêts.

I. Electrophorèse bidimensionnelle (2D)

Les travaux de protéomique (chapitres l., m. et n.) ont été réalisés en collaboration avec la plateforme de protéomique de l'université Paris 13 (https://proteomique.univ-paris13.fr/). L'électrophorèse bidimensionnelle (2D) est une technique de séparation des protéines dans un gel d'acrylamide qui s'effectue suivant deux étapes successives : une première étape où les protéines sont séparées en fonction de leur point isoélectrique (pl) et une seconde étape où les protéines sont séparées selon leur masse moléculaire relative (Mr).

La première dimension appelée isoélectrofocalisation (IEF), a été réalisée avec des bandes d'acrylamide de 7 cm (strips) à gradient de pH immobilisé (IPG) allant de pH 3 à pH 10 (BioRad). L'extrait protéique (100 μ g) était mélangé à la solution IEF (7M d'urée, 2 M de thiourée, 4% de chaps, 0.24% NP40) pour un volume final de 125 μ L À ce mélange étaient ajoutés 2,5 μ L de Dithiothréitol (DTT) à 10 mM, 0,625 μ L d'ampholytes de pH 3-10 (Biolytes, BioRad), et quelques grains de bleu de bromophénol.

L'échantillon était ensuite déposé dans un rack de réhydratation, le gel IPG était mis à son contact et l'ensemble était recouvert avec 2 mL d'huile minérale. Après 7h de réhydratation, le gel avait absorbé la totalité de l'échantillon protéique. Des mèches de papier étaient humidifiées avec 20 µL d'eau pure puis insérées entre l'électrode du générateur (IEFCell, BioRad) et la bande de gel au niveau de ses deux extrémités: extrémité pH 3 (pôle (+) du générateur) et extrémité pH 10 (pôle (-) du générateur). L'IEF était réalisée sur plusieurs heures à 19°C pour atteindre 10 000 V/h final.

Avant de réaliser la seconde dimension, les strips IPG étaient incubées 20 min dans une solution d'équilibration (50 mM Tris/HCL pH 8.8, 6 M Urée, 30% glycérol, 2% SDS) contenant 0.5% de DTT, puis de nouveau 20 min à l'obscurité dans la solution d'équilibration contenant 1.6% d'iodoacétamide. Un gel SDS-PAGE de seconde dimension à 12% d'acrylamide était réalisé comme décrit dans la section « Western blot ». Sur ce gel, 2 mL d'agarose 2% (p/v) à 80°C étaient déposés, puis la strip IPG était positionnée horizontalement au contact du gel SDS-PAGE (pH3 de la strip orienté vers le pôle + de l'électrode). Des marqueurs protéiques de masse moléculaire connue étaient positionnés à gauche du gel. Une fois l'agarose solidifié, la migration SDS-PAGE était réalisée comme décrit dans la section « Western blot ». Après migration, les gels étaient placés 1h sous agitation dans une solution de fixation des protéines (Ethanol 30%, Acide acétique 7%) puis une nuit dans du bleu de Coomassie commercial (bioRad). Après coloration, les gels étaient numérisés grâce à un scanner utilisant le logiciel ImageMaster 2D platinium (GE Healthcare).

m. Digestion des protéines par la trypsine

Les spots 2D et bandes SDS-PAGE d'intérêt étaient excisés des gels puis lavés avec 2 incubations successives de 30 minutes d'acétonitrile et de tampon bicarbonate d'ammonium 25 mM. Les morceaux de gels étaient déshydratés 5 minutes avec 100 µl d'acétonitrile pur. Le surnageant d'acétonitrile était éliminé et 10 μ l de solution de trypsine (12 μ g/ml de bicarbonate d'ammonium 25 mM) étaient ajoutés. La digestion des protéines par la trypsine était réalisée une nuit à 37°C. Après digestion, les peptides étaient extraits des gels avec 5 μ L de solution d'extraction (60% acétonitrile et 5% acide formique) et analysés par spectrométrie de masse.

n. Identification des protéines par spectrométrie de masse

L'identification des protéines par MALDI-TOF (Matrix Assisted Laser Desorption Ionization-Time Of Flight) a été effectuée sur un appareil de type UltrafleXtreme (Bruker). Pour l'analyse, 1 µl d'échantillon peptidique était déposé sur une cible MALDI avec 1 µl de solution saturée de matrice (acide alpha-cyano-4-hydroxycinnamique). Après cocristallisation matrice/peptides, la cible était introduite dans la source MALDI et l'échantillon est bombardé par un laser.

L'analyse par nanoLC-MS/MS était effectuée sur une chaîne de chromatographie liquide à nano-débits (nanoLC) (Agilent Technologies) couplée en amont d'un spectromètre de masse de type trappe ionique équipé d'une source nano à ionisation électrospray (nano-ESI) (Agilent Technologies). Un volume de 7 µL de peptides en solution était injecté à un débit de 4µl/minute sur la précolonne capillaire de phase inverse C18 (Zorbax 300SB-C18 4mm x 40nl, Agilent Technologies) à l'aide d'une solution composée de 2% (v/v) d'acétonitrile et 0,1% (v/v) d'acide formique. Cette étape permet la concentration et le dessalage des peptides. La précolonne va ensuite automatiquement basculer dans le circuit de la nano-colonne analytique de phase inverse C18 (Zorbax 300SB-C18 43 mm x 75 µm, Agilent Technologies) traversée par une solution à 2% (v/v) d'acétonitrile et 0,1% (v/v) d'acide formique sous un débit de 200 nl/min. Un gradient croissant d'acétonitrile (ACN) d'une durée de 22 minutes était alors appliqué à un débit de 200 nl/min afin d'éluer les peptides de la nano-colonne en fonction de leur hydrophobicité. En sortie de la nano-colonne, les peptides étaient introduits dans le spectromètre de masse sous forme d'un « spray » de fines gouttelettes grâce à une aiguille portée à un haut potentiel électrique en mode positif. Les peptides ainsi ionisés étaient accélérés vers l'analyseur trappe ionique et analysés par spectrométrie de masse en tandem (MS/MS).

Par MS/MS, les peptides dont les signaux étaient les plus intenses étaient sélectionnés, isolés puis fragmentés dans la trappe ionique par collision avec des molécules d'hélium. Les peptides précurseurs se fragmentaient en rompant principalement les liaisons peptidiques formant des ions fils permettant de remonter à leur séquence en acides aminés.

Les identifications de protéines étaient réalisées avec le logiciel Mascot (MatrixScience) par interrogation de la banque de données Swiss-Prot accessible sur internet (<u>http://www.expasy.proteome.org</u>). À l'issue de la consultation de la banque de données, Mascot proposait une liste de protéines candidates avec un score d'identification pour chacune d'entre elles. Les protéines dont le score Mascot était supérieur à 30 étaient des identifications fiables (p<0.05).

o. Prédictions protéiques bioinformatiques

http://web.expasy.org/compute_pi/ a été utilisé pour prédire le poids moléculaire d'une protéine et http://web.expasy.org/translate/ pour traduire une séquence nucléotidique en a.a.

p. Western blot

Deux gels d'acrylamide étaient préparés : un gel à 10% (gel de migration) et un à 5% (gel d'empilement, « stacking »). Les gels migraient dans du tampon Tris/glycine/SDS (BioRad) dont la composition était la suivante : 25 mM de Tris, 192 mM de glycine, 0.1% de SDS, pH 8.3). Les échantillons protéiques (90 µg) étaient dénaturés durant 5 minutes à 96°C au bain-marie et ajoutés à une solution de β -mercaptoethanol-Laemmli (BioRad) dans un rapport 1 : 1 (V/V). Une fois les échantillons déposés, la migration était faite à 150V.

Après la migration du gel, le transfert semi-liquide utilisait une membrane PVDF dans une solution de Tris/Glycine (BioRad) de composition 25 mM de Tris, 192 mM de glycine, 20% d'éthanol, pH 8.3. Le transfert était fait pendant 1 heure à 100V.

L'efficacité du transfert des protéines était vérifiée en réalisant une coloration de la membrane PVDF au rouge Ponceau.

70

Les membranes PVDF avec les protéines transférées étaient découpées puis incubées dans une solution de saturation (PBS, Tween 20 (0.05%), 5% de lait en poudre) pendant 2 heures à température ambiante. Les membranes étaient ensuite incubées toute la nuit à 4°C dans une solution contenant les anticorps primaires (PBS, Tween 20 (0.05%) et 2,5% de lait en poudre). Après l'incubation des anticorps primaires, 3 lavages avec du PBS-Tween 20 à 0.05% étaient effectués puis les membranes PVDF étaient mises en présence des anticorps secondaires en solution PBS-Tween 20 à 0.05% et 2,5% de lait en poudre pendant 1 heure à température ambiante. Ensuite, 3 lavages avec du PBS-Tween 20 à 0.05% étaient faits.

La révélation du western blot utilisait un kit d'électrochimiluminescence hautement sensible (ECL Select, GE Healthcare) et les résultats étaient visualisés avec un instrument de détection de chimiluminescence (ChemiDoc MP System, BioRad).

Les anticorps primaires suivants ont été utilisés : monoclonal de souris anti-ABHD5 4B12 qui reconnait les a.a. de la partie C-terminale d'ABHD5 (1 : 1000, Sigma-Aldrich), monoclonal de souris anti-ABHD5 E1 qui reconnait les a.a. de la partie centrale de la protéine ABHD5 (1 : 500, SantaCruz), monoclonal de souris anti-phosphothréonine 5H5 (1 : 500, Invitrogen), monoclonal de souris anti-phosphosérine 4A4 (1 : 500, Millipore), monoclonal de souris anti-phosphotyrosine 4G10 (1 : 20 000, Millipore) L'anticorps secondaire suivant a été utilisé : chèvre anti-souris couplé à la peroxydase 32430 (1 : 6000, Thermo).

q. Digestion par la glycopeptidase F

La glycopeptidase F hydrolyse directement au niveau de la chaîne polypeptidique les oligosaccharides N-liés au niveau de leur liaison avec l'asparagine. Le test était effectué en condition dénaturante selon les recommendations du fabricant. Les échantillons étaient mis en présence d'1 mU de glycopeptidase F puis incubés à 37°C pendant 20 heures. (4450, Takara Biotechnology, Japon). Le contrôle positif était de la fétuine bovine.

r. Immunoprécipitation

Les immunoprécipitations ont été réalisées avec le kit Crosslink IP Kit (Pierce) et selon le protocole indiqué par le fournisseur (https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/MAN0011670_Pierce_CrsLnk_Immun oprecipitation UG.pdf).

71

Les colonnes étaient préparées avec 50 μ g d'anticorps (pour la colonne du protocole E1 : 50 μ g d'anticorps anti-ABHD5 E1, pour la colonne du protocole E1+4B12 : 25 μ g d'anticorps anti-ABHD5 E1 et 25 μ g d'anticorps anti-ABHD5 4B12). Une quantité de 600 μ L d'échantillons protéiques a été utilisée pour les immunoprécipitations. La fraction protéique attachée à la colonne (le produit d'immunoprécipitation à proprement parler) était éluée dans un volume total de 50 μ L.
RÉSULTATS

<u>A. Étude d'ABHD5 en condition pathologique</u> (manuscrit)

Journal of Investigative Dermatology



Perilipin-3, a new ABHD5 protein partner, may be involved in ichthyosis pathophysiology in Dorfman–Chanarin syndrome

Journal:	Journal of Investigative Dermatology
Manuscript ID	Draft
Article Type:	Original Article
Date Submitted by the Author:	n/a
Complete List of Authors:	Roussel, Benjamin; Paris 13 University, Sorbonne Paris Cité, INSERM UMR1125 Prost-Squarcioni, Catherine; Avicenne Hospital, AP-HP, Department of Pathology; Paris 13 University, Sorbonne Paris Cité, Laboratory of Histology; Avicenne Hospital, AP-HP, Referral Center for Genetic Skin Diseases, Department of Dermatology Levy, Annie; Avicenne Hospital, AP-HP, Department of Pathology Bohelay, Gérôme; Avicenne Hospital, AP-HP, Referral Center for Genetic Skin Diseases, Department of Dermatology Safa, Gilles; Saint-Brieuc Hospital, Department of Pediatry Laroche, Liliane; Avicenne Hospital, Department of Pediatry Laroche, Liliane; Avicenne Hospital, AP-HP, Referral Center for Genetic Skin Diseases, Department of Dermatology Schischmanoff, Pierre-Olivier; Avicenne Hospital, AP-HP, Referral Center for Genetic Skin Diseases, Department of Dermatology Schischmanoff, Pierre-Olivier; Avicenne Hospital, AP-HP, Referral Center for Genetic Skin Diseases, Department of Dermatology Schischmanoff, Pierre-Olivier; Avicenne Hospital, AP-HP, Referral Center for Genetic Skin Diseases, Department of Dermatology; Paris 13 University, Sorbonne Paris Cité, INSERM UMR1125
Key Words:	Ichthyosis, Dorfman-Chanarin syndrome, ABHD5, PLIN3

SCHOLARONE[™] Manuscripts

Perilipin-3, a new ABHD5 protein partner, may be involved in ichthyosis pathophysiology in Dorfman–Chanarin syndrome

Benjamin Roussel¹, Catherine Prost-Squarcioni^{2,3,4}, Annie Levy², Gérôme Bohelay⁴, Gilles Safa⁵, Estelle Breton⁶, Liliane Laroche⁴, Pierre-Olivier Schischmanoff⁷ and Frédéric Caux^{1,4} ¹INSERM UMR1125, Paris 13 University, Sorbonne Paris Cité, Bobigny, France; ²Department of Pathology, Avicenne Hospital, AP-HP, Bobigny, France; ³Laboratory of Histology, Paris 13 University, Sorbonne Paris Cité, Bobigny, France; ⁴Referral Center for Genetic Skin Diseases, Department of Dermatology, Avicenne Hospital, AP-HP, Bobigny, France; ⁵Dermatology Unit, Saint-Brieuc Hospital, Saint-Brieuc, France; ⁶Department of Pediatrics, Saint-Brieuc Hospital, Saint-Brieuc, France; and ⁷Laboratory of Biochemistry, Avicenne Hospital, AP-HP, Bobigny, France

Correspondence: Frédéric Caux, INSERM UMR1125, Paris 13 University, Sorbonne Paris Cité, 74, rue Marcel Cachin, 93000 Bobigny, France, or Referral Center for Genetic Skin Diseases, Department of Dermatology, Avicenne Hospital, AP-HP, 125, rue de Stalingrad, 93000 Bobigny, France. Phone: +33 (0)1 48 95 51 89; Fax: +33 (0)1 48 95 51 87; Email: frederic.caux@aphp.fr

Short title: ABHD5 and PLIN3 in Dorfman-Chanarin syndrome

Abbreviations: ABHD5, α/β-hydrolase domain-containing protein-5; ALOXE3, arachidonate lipoxygenase-3; ATGL, adipose triacylglycerol lipase; CGI-58, comparative genomic identification number 58; DCS, Dorfman–Chanarin syndrome; ELOVL4, elongation of very long-chain fatty acids protein-4; GBA, β-glucocerebrosidase; NCIE, nonbullous congenital ichthyosiform erythroderma; NTS, Netherton syndrome; PLIN3, perilipin-3; SB, stratum basale; SC, stratum corneum; SG, stratum granulosum; SS, stratum spinosum; XLI, X-linked ichthyosis; TGM1, transglutaminase-1

ABSTRACT

ABHD5 is a lipase activator whose mutations induce the intracellular triacylglycerol accumulation called Dorfman-Chanarin syndrome (DCS). DCS is characterized by nonbullous congenital ichthyosiform erythroderma resulting from acanthosis and orthokeratotic hyperkeratosis. Ultrastructural findings include lipid droplets in basal and granular layers and abnormal lamellar bodies. The ichthyosis pathomechanism is unclear. Because some hereditary ichthyoses are associated with defective ceramide biosyntheses, we examined ceramides in seven DCS patients. ABHD5 genetic analysis identified four different mutations, including two original, one missense (p.Gly259Asp) and one 15.9-kb deletion (g.43726376 43742311del15935+ins46). Epidermal ceramides were absent or very low in all DCS patients but expression of ceramide biogenesis-related enzymes was minimally changed. Because ABHD5 might act indirectly on ceramides, we used yeast two-hybrid screening to identify ABHD5 partners. Three interactors were detected: perilipin-1, -2 and -3 (PLIN3); the latter is a new partner and involved in late endosome transport through its binding to Rab9. Proximity-ligation assay demonstrated PLIN3's physical closeness to ABHD5 in epidermis and PLIN3 was weakly expressed in DCS epidermis. These findings suggest that DCS-ichthyosis pathophysiology is linked to a trafficking defect of lamellar granules rather than lipid storage.

INTRODUCTION

Dorfman-Chanarin syndrome (DCS, OMIM #275630), known as a neutral lipid-storage disease with ichthyosis, was described in 1974 (Chanarin et al., 1975; Dorfman et al., 1974). This rare autosomal recessive disorder is characterized by nonbullous congenital ichthyosiform erythroderma (NCIE), steatohepatitis, subcapsular cataract and deafness. Cutaneous manifestations are acanthosis and marked orthokeratotic hyperkeratosis, variably associated with lipid vacuoles in basal keratinocytes. Electron microscopy demonstrates abnormal lamellar bodies and lipid droplets in basal and granular layers (Akiyama et al., 2003). Cytoplasmic lipid droplets are constantly found in leukocytes (Jordans' anomaly) but are also seen in most other cells. This lipid accumulation reflects blockage in the triacylglycerol catabolism. In 2001, we demonstrated eight distinct comparative genomic identification-58 (CGI-58) mutations in 13 DCS patients from nine families (Lefèvre et al., 2001). CGI-58, renamed ABHD5 (\alpha/\betahydrolase domain-containing protein 5), is located on chromosome 3p21; it contains seven exons and encodes the cytoplasmic 349-amino-acid protein ABHD5. That protein is found in the keratinocyte lamellar bodies (Akiyama et al., 2008) and on the surface of adipocyte lipid droplets (Boeszoermenyi et al., 2015; Subramanian et al., 2004). It can interact with other proteins involved in lipid metabolism, e.g. perilipin-1 (PLIN1) (Subramanian et al., 2004), PLIN2 (Yamaguchi et al., 2004) and PLIN5 (Granneman et al., 2009). ABHD5 also interacts with another lipid droplet protein, adipose triacylglycerol lipase (ATGL) increasing the latter's activity, hydrolyzing triacylglycerol into diacylglycerol and free fatty acid (Lass et al., 2006). Mutated ABHD5 proteins fail to activate ATGL, resulting in triacylglycerol accumulation. Moreover, ABHD5 was recently shown to be able to catalyze the lysophosphatidylglycerol reacylation to phosphatidylglycerol and could be involved in mitophagy and autophagy (Zhang

et al., 2014).

DCS ichthyosis is related to hyperproliferative hyperkeratosis but its precise pathomechanism remains unclear. ABHD5 ability to activate ATGL might not explain the epidermal differentiation disorder. Indeed, ATGL mutations provoke neutral lipid storage disease with myopathy (OMIM #610717) but without ichthyosis (Fischer et al., 2007). ABHD5's second enzymatic activity, lysophosphatidylglycerol acylation, does not help explain the epidermal differentiation. Recently, Rabionet et al. (2014) and Krieg et al. (2014) proposed that ABHD5 could catalyze one ceramide biosynthesis step. Ceramides are composed of a fatty acid amide bond linked to a sphingoid base; both components are highly variable. Ceramides detected in human stratum corneum (SC) included 342 distinct molecules but the estimated number of unique ceramide exceeds 1000 (Masukawa et al., 2008; t'Kindt et al., 2012). Ceramides represent 50% of the SC lipid mass and play important roles in the epidermal barrier (Feingold et al., 2014). Genetically defective enzymes involved in ceramide biosynthesis, e.g. ceramide synthase 3 or elongation of very long chain fatty acids protein 4 (ELOVL4) cause some hereditary ichthyoses (Aldahmesh et al., 2011; Radner et al., 2013). Herein, we provide new information on the DCS ichthyosis pathophysiology. Genetic analyses of a series of seven DCS patients revealed two novel ABHD5 mutations. Then we studied ceramides and several enzymes involved in their biosyntheses by immunofluorescence. Finally, we sought new ABHD5 protein partners and identified perilipin 3 (PLIN3).

RESULTS

Identification of ABHD5 mutations

To confirm the DCS diagnoses of seven typical patients with NCIE (Figure 1a) and Jordans'

Page 5 of 40

Journal of Investigative Dermatology

anomaly on blood smears (Figure 1b), genomic DNA was extracted from their blood samples and ABHD5's seven exons and intron/exon boundaries were sequenced. Genomic alterations were found (Table S1). Patient A had a homozygous C insertion at exon 4 position 594 leading to a frameshift and premature stop codon at amino acid 209. Patient B had a homozygous splicesite mutation affecting the exon 6 invariant G of the acceptor splice-site AG dinucleotide (c.774-1G>A). Patient A and B's genetic analyses were previously reported in our article identifying CGI-58/ABHD5 mutations as responsible for DCS (Lefèvre et al., 2001). Patient C, a DCS woman from Bizerte (Northern Tunisia), and patient B, from Djerba Island (Southeastern Tunisia), had the same mutation (c.774-1G>A). Three Iraqi Kurds (family D) had homozygous exon 6 c.776G>A transition, heterozygous in both parents and one daughter, but absent in normal subjects (Figure 1c). This nucleotide variation did not change the reverse transcriptase-PCR (RT-PCR)- and quantitative RT-PCR (QRT-PCR)-assessed mRNA size or quantity, respectively in patient D-2, his father or one healthy control (Figure S1), but substituted small apolar glycine 259 for large acidic aspartate (p.Gly259Asp). Several findings suggested this mutation might have functional consequences. That glycine-to-aspartate conversion might affect ABHD5 conformation because in silico analysis (http://scratch.proteomics.ics.uci.edu/) predicted amino-acid-259 structural changes of nearby serine-238, methionine-239 and arginine-273, respectively from turn-to-helix, coil-to-helix and helix-to-turn, respectively (Figure 1d). Moreover, glycine-259 is highly conserved among all studied species (Figure 1e). Using patient E's genomic DNA, PCR of ABHD5 exons 1 and 2 yielded no amplification in contrast to efficient amplification of exons 3-7 (Figure 2a), suggesting a large genomic deletion.

Analysis of the large genomic ABHD5 deletion (g. 43726376_43742311del15935+ins46)

To confirm patient E's putative deletion, ABHD5 introns 1 and 2 were amplified and yielded no amplicon. His mother's PCR yielded a fainter band, like the healthy control (Figure S3). As expected, RT-PCR detected no ABHD5 mRNA using paired primers located within exons 1 and 4 (Figure 2b). That absence was confirmed by QRT-PCR using exon 3 primers and ABHD5 mRNA quantity was 50% below the control for both parents and the only sister than control (Figure 2c). Attempting to define the deleted region limits of the deleted region, exon 3 but not intron 2 amplification was possible, leading us to conclude that intron 2 was the 3' border. To define the 5' border, we took advantage of the fact that the ANO10 gene, located ~68 kb upstream from the ABHD5 gene, was probably normal, because ANO10 mutations are associated with recessive spinocerebellar ataxia and our patient had no neurological symptoms. Therefore, we designed multiple regularly distributed primer pairs from -40 kb to -2 kb upstream from the ABHD5 start codon for PCR with genomic DNA. Amplicon absence with -2 kb and -5 kb primers and presence with -7 kb, -10 kb, -20 kb and -40 kb primers placed the 5' deletion border close to -7 kb upstream from ATG (Figure S2a). Then, the forward -7 kb primer pair and the antisens intron 2 primer yielded amplification for the patient, his parents and sister (Figure S3b). Amplicons were extracted from the agarose gel and sequenced revealing a large 15,935 bp deletion from -6,103 bp upstream from ATG to +9,832 bp downstream from it. Moreover, between the deletion's two edges, a 46-bp insertion was detected (Figure 2d). To understand the mechanism of this genetic rearrangement, we searched close to the deleted region limits for repetitive and transposable elements, reportedly involved in such genomic events. Bioinformatics tools demonstrated high 5' border similarity with a LINE-1 PA4, and high 3' border homology with an Alu-Sb1 sequence; the 46-bp insertion also showed similarly homology with another Alu-Sb1 sequence. To determine the protein level consequence of this disease-causing large

 deletion, immunofluorescence assays using antibodies targeting the internal ABHD5 region were run. In accordance with mRNA absence, ABHD5 labeling was totally negative in the patient's sebaceous glands, whereas lipidic vesicles in sebocyte cytoplasm were labeled in normal skin (Figure 2e).

Abnormal expression of epidermal ceramides and enzymes involved in their biosyntheses

To explore the functional consequences of these *ABHD5* mutations on epidermal ceramides and on the distributions of some enzymes involved in their biosyntheses, immunofluorescence labeling of six CDS patients' skin samples was compared to those of patients with psoriasis (n=2), X-linked ichthyosis (XLI) or Netherton syndrome (NTS). Ceramides were recognized by a monoclonal antibody detecting ceramides with very long chain (ceramide-2, -3, -5) and short chain (ceramide-C14, ceramide-C16 and dihydroceramide-C16). The normal skin whole SC was labeled (Figure 3). Ceramide expression was absent in DCS patient E and clearly diminished in the other patients (Table 1). Similarly, ceramide expression was absent or weak in both psoriasis and the XLI biopsies but the NTS patient had normal labeling.

ELOVL4, an enzyme involved in fatty acid elongation, is located in the cytoplasm of stratum granulosum (SG) keratinocytes. Its labeling covered two to three cell layers in normal skin but five to seven layers in the hyperplastic NTS and six DCS patients' skin (Figure 3). ELOVL4 expression was stronger and more widely distributed throughout the stratum basale (SB), stratum spinulosum (SS) and SG in both psoriatic biopsies but the XLI patient's pattern resembled normal skin.

 β -glucocerebrosidase (GBA), an enzyme with glucosylceramidase activity, is present in the normal skin SC. Its expression was normal in five DCS patients and low for the other two

(Figure 3). GBA labeling was drastically lower, with only some fluorescent patches in parakeratotic hyperplasia, in the two psoriasis patients' biopsies. The thickened SC in NTS skin had normal intensity, whereas in XLI skin GBA staining was enhanced.

Arachidonate lipoxygenase-3 (ALOXE3) catalyzes acyl-ceramide oxidation and was membrane-expressed in SB, SS and SG of all biopsies (Figure 3). Labeling intensity was similar to normal skin in both psoriasis, the XLI and two DCS patients but weaker in the NTS and five DCS patients. Curiously, psoriasis and XLI sample keratinocyte nucleoli were also labeled.

Transglutaminase-1 (TGM1) transesterifies ω -esterified glucosylceramides into cornified envelope proteins and is membrane-expressed in normal skin upper SG and SC. XLI skin had a normal labeling pattern. TGM1 expression extended into the SG in DCS, psoriasis and NTS patients (Figure 3) and SG fluorescent intensity was stronger in psoriasis and two DCS patients (Table 1).

PLIN3, a new ABHD5 partner, is poorly expressed in DCS epidermis

Because ceramide-synthesis-enzyme expression in DCS was not notably modified, we hypothesized that ABHD5 might be indirectly involved in the biosyntheses of these lipids. Therefore, we searched for ABHD5 partners that could be intermediaries linking ABDH5 with epidermal ceramide metabolism. Yeast two-hybrid (Y2H) screening using ABHD5 as bait and the Episkin® library identified three interacting proteins, PLIN3 (TIP47), PLIN2 (ADRP) and PLIN1 (Perilipin A) with high-to-good interaction confidence (Figure 4a). PLIN3 and PLIN2 interactions were confirmed in the human placenta library, and GORASP2 and ATF6 interactions were also found. Proximity-ligation assay (PLA) in HaCaT cells and human epidermis was used to test the PLIN3-ABHD5 interaction in vivo. PLA signals were detected in

Journal of Investigative Dermatology

HaCaT cell and SC corneocytes cytoplasm, indicating that PLIN3 was in close proximity to ABHD5 (Figure 4b).

Because ABHD5 interacts with PLIN3, we verified whether its mutations could disturb PLIN3 cellular localization. In healthy skin, granular cytoplasmic PLIN3 labeling was seen in all epidermis layers with stronger immunofluorescence intensity in the SG (Figure 5c). However, PLIN3 was almost totally absent from all DCS patients tested (n=4) (Figure 4c) but was normally distributed in the XLI patient's skin.

DISCUSSION

ABHD5 sequencing for our seven serial DCS patients of diverse ethnicities and from five unrelated families revealed four different mutations distributed all along the gene: splice-site, insertion, new missense mutations and novel large deletion, thereby expanding the spectrum of *ABHD5* DCS-causing mutations. In silico splice-site analysis predicted the splice-site 774-1G>A mutation (patients B and C) would suppress the acceptor splice-site at the intron-5/exon-6 boundary and a cryptic splice-site would appear 95 nucleotides downstream. We previously reported an RT-PCR-detected shortened amplicon, with weaker transcript intensity whose sequencing showed deletion of the first 95 exon-6 nucleotides (Ben Selma et al., 2008). That transcript predicted a truncated 323-amino–acid protein, including 65 C-ter missense amino acids. Its weaker intensity was confirmed by QRT-PCR; it was attributed to nonsense-mediated mRNA decay as demonstrated by puromycin inhibition of this mechanism (data not shown). This c.774-1G>A mutation was previously found in two other unrelated Tunisian patients (Ben Selma et al., 2008). Consequently, the same mutation detected in four Tunisian patients supports a founder effect in this population.

A new p.Gly259Asp missense mutation was identified in a Iraqi Kurd family and could also be recurrent in this ethnicity, because we were able to detect the same mutation in another DCS patient from the same region as family D (data not shown). Several modeling programs predicted this mutation would have major consequences on the protein's structure. Moreover, functional analyses demonstrated that a close mutation (p.Glu260Lys) induced intracytoplasmic ABHD5 mislocalization, i.e., abolition of ABHD5 recruitment to lipid droplets in rat adipocytes, CHO-K1 cells and HeLa cells, and absence of PLIN1 and PLIN2 colocalizations (Yamaguchi et al., 2004). Furthermore, this p.Glu260Lys-mutated ABHD5 is less able to interact with PLIN1 using glutathione S-transferase pull-down assay (Yamaguchi et al., 2004). Ultimately, the p.Glu260Lys mutation abrogated ABHD5 capacity to stimulate ATGL activity (Lass et al., 2006). Currently, 36 distinct ABHD5 mutations have been described, including three large deletions, 1,487 bp, 1,058 bp and 3,955 bp (Missaglia et al., 2014; Redaelli et al., 2010) (Figure 5). Genomic deletions are provoked by homology-based recombination using repeated sequences, like Alu or LINE-1. The first reported ABHD5 deletion was attributed to Alu sequences, the second to a LINE-1 sequence, and the last has not yet been explained by any repetitive sequences or transposable elements.

Patient E's g.43726376_43742311del15935+ins46 is the largest deletion among all *ABHD5* mutations described so far. This 15.9-kb deletion could reflect nonhomologous recombination using LINE-1 PA4 and Alu-Sb1 repeats. Deletions causing human genetic diseases and attributed to Alu-mediated recombination have frequently been reported (Cooper et al., 2011) but recombinations between LINE-1 and Alu sequences were only described twice in a patient with Duchenne muscular dystrophy (Suminaga et al., 2000) and another with Maple syrup urine disease (Chi et al., 2003). The consequences of patient E's deletion were complete absence of

Journal of Investigative Dermatology

ABHD5 mRNA and protein. Those absences enabled us to analyze the epidermal effects of total ABHD5 silencing on some ceramides and enzymes involved in their biosyntheses.

Notably, some short and very-long chain ceramides (including ceramide-1, -3 and -5) were absent from the silenced patient's SC and their expressions were weak in the other five DCS patients. Those lower levels agree with less ceramide-1 observed in the SC of an DCS patient with a p.Iso72Thr ABHD5 mutation (Goto-Inoue et al., 2012; Uchida et al., 2010) and could be explained by the decreased ABHD5 activity as an enzyme in the biosyntheses of these lipids, as recently proposed (Krieg et al., 2014; Rabionet et al., 2014). However, to exclude an indirect ABHD5 role in this pathway, we analyzed several enzymes involved in the ceramide biosyntheses and mutated in some hereditary ichthyoses, like those encoded by TGMI (Russell et al., 1995), ELOVL4 (Aldahmesh et al., 2011), ALOXE3 (Jobard et al., 2002) and GBA. We demonstrated extended expression of membrane-localized TGM1 in the DCS patients' hyperplastic epidermis, which agrees with disturbed in situ TGM1-activity localization in SS and SG in an DCS patient (Akiyama et al., 2003). That observation was not DCS-specific as it was also found in psoriasis (Schroeder et al, 1992) or other genetic ichthyoses (Li et al., 2012). We observed no significant modification of GBA expression in DCS skin, unlike its lower presence in psoriatic skin (Alessandrini et al., 2004). ELOVL4 expression was normal in DCS patients' hyperplastic epidermis. ELOVL4 was shown downregulated in a murine atopic dermatitis model in parallel to fewer very long-chain ceramides (Park et al., 2012). Finally, ALOXE3 expression was weaker in most DCS patients but slightly stronger in patients with ALOX12B, ALOXE3, and TGM1 mutations, and mislocalized in the SC of patients with NIPAL4 mutations (Li et al., 2012). Interpretation of this ALOXE3 loss could only be hypothetical in light of the scarce information available on the regulation and interplay between enzymes involved in epidermal ceramide

biosyntheses.

Our Y2H-screening search for human ABHD5 partners revealed its interactions with human PLIN1, PLIN2 and PLIN3. ABHD5-PLIN1 and ABHD5-PLIN2 interactions were previously seen in rat adipocytes on the lipid droplet surface (Subramanian et al., 2004; Yamaguchi et al., 2004). We detected a previously unknown ABHD5-PLIN1 interaction in humans, but it probably does not occur in epidermis because no PLIN1 was detected therein (data not shown). Coimmunoprecipitation experiments recently revealed an ABHD5-PLIN3 interaction in rat skeletal muscle (MacPherson et al., 2013) and we confirmed it by Y2H-screening in humans. Moreover, mutated ABHD5 was associated herein with epidermal PLIN3 disappearance in vivo. PLIN3 is a ubiquitous protein found in cytosol, on the surface of lipid droplets in adipocytes and also in keratinocyte lamellar bodies (Raymond et al., 2008). It is implicated in late endosomal vesicle transport through its binding to Rab9 (Carroll et al., 2001) and its depletion destabilized Rab9 (Ganley et al., 2004). The PLIN3-Rab9 complex is involved in the late-endosome-toplasma-membrane vesicular transport of hepatitis C virus (Ploen et al., 2013) and PLIN3 acts as a trafficking adaptator between HIV-1 Env and Gag proteins during virus morphogenesis (Bauby et al., 2010). We hypothesize that the PLIN3-ABHD5 complex may be involved in the Rab9 guided vesicle trafficking in keratinocytes. Indeed, it was recently been shown that silencing of Rablla, which is involved in intracellular trafficking led to altered lamellar body density and SC function (Reynier et al., 2016). Disruption of the ABHD5-PLIN3-Rab9 complex could disturb vesicular transport, known to be crucial in cornification. It might explain the numerous irregularly shaped lamellar bodies in DCS keratinocytes (Akiyama et al., 2003). In summary, DCS-ichthyosis pathophysiology seems to be independent of the lipid droplet accumulation but tributary to defective lamellar body transport, thereby inducing impaired release of their contents

at the SG-SC interface.

MATERIALS AND METHODS

Genetic analysis

See the Supplementary Material.

Sequencing

Amplicons of patients A to D were obtained by PCR. Patient E's amplicons were extracted from agarose gel with the QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen). They were purified with the Exosap-IT reagent (GE Healthcare) and subjected to direct sequencing with the ABI PRISM Big Dye Terminator V.1.1 Kit on an ABI PRISM 3100 genetic analyzer (Life Technologies). BioEdit software (http://www.mbio.ncsu.edu/bioedit/bioedit.html) analyzed the sequences.

Bioinformatics

ABHD5 amino acids from 11 species were aligned using ClustalW2 for comparison with family D patients.

To search for Alu and LINE-1 sequences close to patient E's deleted-region borders, we used the following websites: http://www.repeatmasker.org/cgi-bin/WEBRepeatMasker and http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&PAGE_TYPE=BlastSearch&LINK_LOC=blasthome (Human ALU repeat elements).

Fluorescence microscopy

Skin biopsies were fixed in 10% formalin, embedded in paraffin (Tissue-Tek Paraffin Wax, Sakura, Villeneuve d'Ascq, France) and 7-µm-thick sections were cut. Antigens were retrieved at pH 6.0 in a boiling citrate-buffer solution. A 90-minute saturation step used 10% serum (serum originated from the same species in which the secondary antibody was raised). Sections

were incubated with primary antibody for 90 minutes, washed three times with phosphate-buffer saline (PBS), incubated for 1 hour with secondary antibody, and washed three times with PBS before being counterstained and mounted. The following antibodies were used: mouse monoclonal IgG anti-β-glucocerebrosidase (GBA; 1:100, ab55080, Abcam), rabbit polyclonal IgG antibodies anti-transglutaminase-1 (TGM1; 1:100, 12912-3-AP, Proteintech), anti-arachidonate lipoxygenase-3 (ALOXE3; 1:400, sc-133275, Santa Cruz), anti-elongation of very long-chain fatty acids protein-4 (ELOVL4; 1:250, OAAB11736, Interchim, Montluçon, France) and anti-perilipin-3 (PLIN3; 1:100, ab47638, Abcam) as primary antibodies. A mouse monoclonal IgG2a recognizing the internal part of human ABHD5 protein (1:500, clone E1, Santa Cruz) was used to detect ABHD5 in the skin. We were able to detect ABHD5 in sebaceous glands but not in epidermis.

Mouse monoclonal IgM recognizing ceramide-2, -3, -5, -C14, and -C16 and dihydroceramide-C16 (1:50, MAB_0011, Glycobiotech, Kükels, Germany) was used, enabling detection of at least 40% of stratum corneum ceramides (t'Kindt R et al., 2012).

The secondary antibodies were: goat-anti-mouse IgG Alexa Fluor 568 (1:400, A11004, Invitrogen), goat-anti-mouse IgG Alexa Fluor 488 (1:2000, A11001, Invitrogen), goat-anti-mouse IgM Alexa Fluor 488 (1:2000, A21043, Invitrogen) and donkey-anti-rabbit IgG (1:200–1:1000, 711-545-152, Jackson ImmunoResearch). Sections labeled with anti-ABHD5 antibody were counterstained with SytoxGreen (1:20,000, Invitrogen) and mounted with VectaShield Mounting Medium for Fluorescence (Eurobio); the other sections were counterlabeled with ProLong Gold Antifade Reagent with DAPI (Invitrogen). Isotype controls, run to take into account the nonspecific background and mouse IgG2a (Invitrogen), mouse IgM (Invitrogen) and rabbit IgG (Sigma–Aldrich, Saint-Quentin-Fallavier, France), were used at the

Page 15 of 40

Journal of Investigative Dermatology

same concentration as the tested antibodies. The slides were mounted and observed under a Zeiss Axio10 Observer D1 fluorescence microscope.

Yeast two-hydrid (Y2H) screening

See the Supplementary Material.

Proximity-ligation assay (PLA)

The PLA used Duolink® In Situ Red Starter Kit (Mouse/Rabbit, Sigma–Aldrich) following the manufacturer's protocol. Mouse monoclonal IgG anti-ABHD5 (1:100, clone 4B12, Sigma Aldrich) and rabbit polyclonal IgG anti-PLIN3 (1:100, ab47638, Abcam) were used. Normal human skin 7-µm–thick cryosections and subconfluent HaCaT cells were tested. The slides were mounted and observed under a Zeiss Axio10 Observer D1 fluorescence microscope.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Nicolas Ortonne (Henri Mondor Hospital, Créteil, France) and Paul Duriez (Saint Antoine Hospital, Paris, France) for providing patients' skin sections. We thank Corinne Elie for expert technical assistance in DNA sequencing. We are grateful to Nadia Bouzaiene for the nonsense-mediated mRNA decay experiments. This work was partially supported by a French Society of Dermatology (Société Française de Dermatologie) grant to Benjamin Roussel.

REFERENCES

 $\begin{array}{c}1\\2&3\\4&5\\6&7\\8&9\\10\\11\\12\\13\\14\\15\end{array}$

16

17 18

19

 $\begin{array}{c} 33\\ 34\\ 35\\ 36\\ 37\\ 39\\ 40\\ 42\\ 43\\ 44\\ 45\\ 46\\ 47\\ 48\\ 9\\ 51\\ 52\\ 53\\ 54\\ \end{array}$

55 56

57 58 59

60

- Akiyama M, Sawamura D, Nomura Y, Sugawara M, Shimizu H. Truncation of CGI-58 protein causes malformation of lamellar granules resulting in ichthyosis in Dorfman–Chanarin syndrome. J Invest Dermatol 2003;121:1029–34.
- Akiyama M, Sakai K, Takayama C, Yanagi T, Yamanaka Y, McMillan JR, et al. CGI-58 is an alpha/beta-hydrolase within lipid transporting lamellar granules of differentiated keratinocytes. Am J Pathol 2008;173:1349–60.
- Aldahmesh MA, Mohamed JY, Alkuraya HS, Verma IC, Puri RD, Alaiya AA, et al. Recessive mutations in *ELOVL4* cause ichthyosis, intellectual disability, and spastic quadriplegia. Am J Hum Genet 2011;89:745–50.
- Alessandrini F, Pfister S, Kremmer E, Gerber JK, Ring J, Behrendt H. Alterations of glucosylceramide-beta-glucosidase levels in the skin of patients with psoriasis vulgaris. J Invest Dermatol 2004;123:1030–6.
- Bauby H, Lopez-Vergès S, Hoeffel G, Delcroix-Genête D, Janvier K, Mammano F, et al. TIP47 is required for the production of infectious HIV-1 particles from primary macrophages. Traffic 2010;11:455–67.
- Ben Selma Z, Schischmanoff P, Kumar R, Bouzaiene N, Blom A, Laroche L, et al. Dorfman-Chanarin syndrome: a founder mutation in Tunisians and a new mutation of *CGI-58* in an Indian family. J Invest Dermatol 2008;128:S111.
- Boeszoermenyi A, Nagy HM, Arthanari H, Pillip CJ, Lindermuth H, Luna RE, et al. Structure of a CGI-58 motif provides the molecular basis of lipid droplet anchoring. J Biol Chem 2015;290:26361–72.

Carroll KS, Hanna J, Simon I, Krise J, Barbero P, Pfeffer SR. Role of Rab9 GTPase in

Journal of Investigative Dermatology

1	
3	facilitating recentor recruitment by TIP47 Science 2001-202-1373_6
4	$\frac{1}{10000000000000000000000000000000000$
6 7	Chanarin I, Patel A, Slavin G, Wills EJ, Andrews TM, Stewart G. Neutral-lipid storage disease: a
, B 9	new disorder of lipid metabolism. Br Med J 1975;1:553-5.
10 11	Chi CS, Tsai CR, Chen LH, Lee HF, Mak BS, Yang SH, et al. Maple syrup urine disease in the
12 13	Austronesian aboriginal tribe Paiwan of Taiwan: a novel DBT (E2) gene 4.7 kb founder
14 15 16	deletion caused by a nonhomologous recombination between LINE-1 and Alu and the carrier-
17 18	frequency determination. Eur J Hum Genet 2003;11:931-6.
19 20	Cooper DN, Bacolla A, Férec C, Vasquez KM, Kehrer-Sawatzki H, Chen JM. On the sequence-
21 22 23	directed nature of human gene mutation: the role of genomic architecture and the local DNA
24 25	sequence environment in mediating gene mutations underlying human inherited disease. Hum
26 27	Mutat 2011;32:1075–99.
28 29 30	Dorfman ML, Hershko C, Eisenberg S, Sagher F. Ichthyosiform dermatosis with systemic
31 32	lipidosis. Arch Dermatol 1974;110:261–6.
33 34 35	Feingold KR, Elias PM. Role of lipids in the formation and maintenance of the cutaneous
36 37	permeability barrier. Biochim Biophys Acta 2014;1841:280–94.
38 39	Fischer J, Lefèvre C, Morava E, Mussini JM, Laforêt P, Negre-Salvayre A, et al. The gene
41 42	encoding adipose triglyceride lipase (PNPLA2) is mutated in neutral lipid storage disease
43 44	with myopathy. Nat Genet 2007;39:28–30.
45 46 47	Ganley IG, Carroll K, Bittova L, Pfeffer S. Rab9 GTPase regulates late endosome size and
48 49	requires effector interaction for its stability. Mol Biol Cell 2004;15:5420-30.
50 51	Goto-Inoue N, Hayasaka T, Zaima N, Nakajima K, Holleran WM, Sano S, et al. Imaging mass
52 53 54	spectrometry visualizes ceramides and the pathogenesis of Dorfman-Chanarin syndrome due
55 56	to ceramide metabolic abnormality in the skin. PLoS One 2012;7:e49519
57 58	
60	17

1		
2		
4	Granneman JG, Moore HP, Mottillo EP, Zhu Z. Functional interactions between Mldp (LSDP	5)
5 6 7	and Abhd5 in the control of intracellular lipid accumulation. J Biol Chem 2009;284:3049-57	7.
8 9	Jobard F, Lefèvre C, Karaduman A, Blanchet-Bardon C, Emre S, Weissenbach J, et	al.
10 11 12	Lipoxygenase-3 (ALOXE3) and 12(R)-lipoxygenase (ALOX12B) are mutated in non-bulle	us
13 14	congenital ichthyosiform erythroderma (NCIE) linked to chromosome 17p13.1. Hum M	lol
15 16	Genet 2002;11:107–13.	
17 18 19	Krieg P, Fürstenberger G. The role of lipoxygenases in epidermis. Biochim Biophy sActa	
20 21	2014;1841:390–400.	
22 23 24	Lass A, Zimmermann R, Haemmerle G, Riederer M, Schoiswohl G, Schweiger M, et al. Adipo	se
25 26	triglyceride lipase-mediated lipolysis of cellular fat stores is activated by CGI-58 and	
27 28 20	defective in Chanarin–Dorfman syndrome. Cell Metab 2006;3:309–19.	
30 31	Lefèvre C, Jobard F, Caux F, Bouadjar B, Karaduman A, Heilig R, et al. Mutations in CGI-58,	
32 33	the gene encoding a new protein of the esterase/lipase/thioesterase subfamily, in Chanarin-	
34 35 36	Dorfman syndrome. Am J Hum Genet 2001;69:1002–12.	
37 38	Li H, Loriè EP, Fischer J, Vahlquist A, Törmä H. The expression of epidermal lipoxygenases	
39 40 41	and transglutaminase-1 is perturbed by <i>NIPAL4</i> mutations: indications of a common	
42 43	metabolic pathway essential for skin barrier homeostasis. J Invest Dermatol 2012;132:2368-	-2
44 45	75. MaaDharson DE, Damas SV, Vandanhaam D, Dav DD, Datars SJ, Skalatel musela DI IN	
40 47 48	protoing ATGL and CGL 52 interactions at root and following stimulated contraction Am I	-
49 50	Physiol Recul Integr Com Physiol 2013:304:P644-50	
51 52 53	Masukawa V. Narita H. Shimizu F. Kondo N. Sugai V. Oba T. et al. Characterization of overal	1
54 55	ceramide species in human stratum corneum. L Linid Res 2008:49:1466_76	
56 57		
58 59 60		18
44 45 46 47 48 49 50 51 52 53 54 55 56 57 58 59 60	 MacPherson RE, Ramos SV, Vandenboom R, Roy BD, Peters SJ. Skeletal muscle PLIN proteins, ATGL and CGI-58, interactions at rest and following stimulated contraction. Am J Physiol Regul Integr Com Physiol 2013;304:R644-50. Masukawa Y, Narita H, Shimizu E, Kondo N, Sugai Y, Oba T, et al. Characterization of overal ceramide species in human stratum corneum. J Lipid Res 2008;49:1466–76. 	1

Journal of Investigative Dermatology

1 2 3 4 5 6	Missaglia S, Valadares ER, Moro L, Faguntes ED, Quintão Roque R, Giardina B, et al. Early onset of Chanarin–Dorfman syndrome with severe liver involvement in a patient with a
7 8	complex rearrangement of ABHD5 promoter. BMC Med Genet 2014;15:32.
9 10 11	Park YH, Jang WH, Seo JA, Park M, Lee TR, Park YH, et al. Decrease of ceramides with very
12 13 14	long-chain fatty acids and downregulation of elongases in a murine atopic dermatitis model. J
15 16 17	Invest Dermatol 2012;132:476–9.
18	Ploen D, Hafirassou ML, Himmelsbach K, Schille SA, Biniossek ML, Baumert TF, et al. TIP47
19 20 21	is associated with the hepatitis C virus and its interaction with Rab9 is required for release of
22 23	viral particles. Eur J Cell Biol 2013;92:374–82.
25 26	Rabionet M, Gorgas K, Sandhoff R. Ceramide synthesis in the epidermis. Biochim Biophys
27 28 29	Acta 2014;1841:422–34.
30 31	Radner FP, Marrakchi S, Kirchmeier P, Kim GJ, Ribierre F, Kamoun B, et al. Mutations in
32	CERS3 cause autosomal recessive congenital ichthyosis in humans. PLoS Genet
34 35	2013;9:e1003536.
36 37 38	Raymond AA, Gonzalez de Peredo A, Stella A, Ishida-Yamamoto A, Bouyssie D, Serre G, et al.
39 40	Lamellar bodies of human epidermis: proteomics characterization by high throughput mass
41 42 43	spectrometry and possible involvement of CLIP-170 in their trafficking/secretion. Mol Cell
44	Proteomics 2008;7:2151–75.
45 46 47	Redaelli C, Coleman RA, Moro L, Dacou-Voutetakis C, Elsayed SM, Prati D, et al. Clinical and
48 49 50	genetic characterization of Chanarin-Dorfman syndrome patients: first report of large
51 52	deletions in the ABHD5 gene. Orphanet J Rare Dis 2010;5:33.
53 54 55	Reynier M, Allart S, Gaspard E, Moga A, Goudounèche D, Serre G, et al. Rab11a is essential for
56 57 58 59	lamellar body biogenesis in the human epidermis. J Invest Dermatol 2016;136:1199–209.
60	19

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25	 Russell LJ, DiGiovanna JJ, Rogers GR, Steinert PM, Hashem N, Compton JG, et al. Mutations in the gene for transglutaminase 1 in autosomal recessive lamellar ichthyosis. Nat Genet 1995;9:279–83. Schroeder WT, Thacher SM, Stewart-Galetka S, Annarella M, Chema D, Siciliano MJ, et al. Type I keratinocyte transglutaminase: expression in human skin and psoriasis. J Invest Dermatol 1992;99:27–34. Subramanian V, Rothenberg A, Gomez C, Cohen AW, Garcia A, Bhattacharyya S, et al. Perilipin A mediates the reversible binding of CGI-58 to lipid droplets in 3T3-L1 adipocytes. J Biol Chem 2004;279:42062–71. Suminaga R, Takeshima Y, Yasuda K, Shiga N, Nakamura H, Matsuo M. Non-homologous 	n
28 29	gene: a novel source of genomic instability. J Hum Genet 2000:45:331–6.	
30 31 32	t'Kindt R, Jorge L, Dumont E, Couturon P, David F, Sandra P, et al. Profiling and characterizing	S
33 34 35	skin ceramides using reversed-phase liquid chromatography-quadrupole time-of-flight mass	
36 37 38	spectrometry. Anal Chem 2012;84:403–11.	
39 40	Uchida Y, Cho Y, Moradian S, Kim J, Nakajima K, Crumrine D, et al. Neutral lipid storage lead	IS
41 42	to acylceramide deficiency, likely contributing to the pathogenesis of Dorfman-Chanarin	
43 44 45	syndrome. J Invest Dermatol 2010;130:2497-9.	
46 47	Yamaguchi T, Omatsu N, Matsushita S, Osumi T. CGI-58 interacts with perilipin and is	
48 49	localized to lipid droplets. Possible involvement of CGI-58 mislocalization in Chanarin-	
50 51	Dorfman syndrome. J Biol Chem 2004;279:30490-7.	
53 54	Zhang J, Xu D, Nie J, Han R, Zhai Y, Shi Y. Comparative gene identification-58 (CGI-58)	
55 56 57	promotes autophagy as a putative lysophosphatidylglycerol acyltransferase. J Biol Chem	
58 59 60	2	0

Page 21 of 40

Journal of Investigative Dermatology

1 2 3 4 5 6 2014;289:33044-53.

Journal of Investigative Dermatology

Page 22 of 40

syndrome patients and 1 healthy control					
Patient	Ceramides	ELOVL4	GBA	ALOXE3	TGM1
A	++, SC	++, SG [#] ; c	++, SC*	++++, SG, SS, SB; m	+++, SG [#] , SC;
В	+, SC	++, SG [#] ; c	++, SC	++++, SG, SS, SB; m	+++, SG [#] , SC;
С	+, SC	++, SG [#] ; c	+, SC	+++, SG, SS, SB; m	+++, SG [#] , SC;
D-1	++, SC	++, SG [#] ; c	++, SC	+++, SG, SS, SB; m	++++, SG [#] , SC
D-2	+, SC	++, SG [#] ; c	++, SC	++, SG, SS, SB; m	+++, SG [#] , SC;
D-3	+, SC	++, SG [#] ; c	++, SC	+++, SG, SS, SB; m	++++, SG [#] , SC
E	Negative	++, SG [#] ; c	+, SC	++, SG, SS, SB; m	+++, SG [#] , SC;
Psoriasis 1	+, SC	++++, SG, SS, SB; c	+, SC	++++, SG, SS, SB; m, nu	++++, SG [#] , SC
Psoriasis 2	Negative	++++, SG, SS, SB; c	+, SC	++++, SG, SS, SB; m, nu	++++, SG [#] , SC
X-linked ichthyosis	Negative	+++, SG; c	+++, SC	++++, SG, SS, SB; m, nu	+++, SG [#] , SC;
Netherton syndrome	++++, SC	++, SG [#] ; c	++, SC	++, SG, SS, SB; m	+++, SG [#] , SC;
Healthy control	++++, SC	++, SG; c	++, SC	++++, SG, SS, SB; m	+++, SG, SC;

8 9

 $\begin{array}{c} 10\\ 11\\ 12\\ 13\\ 14\\ 5\\ 16\\ 17\\ 8\\ 19\\ 20\\ 22\\ 23\\ 24\\ 25\\ 26\\ 27\\ 28\\ 29\\ 30\\ 1\\ 32\\ 33\\ 4\\ 35\\ 36\\ 37\\ 38\\ 90\\ 41\\ 42\\ 34\\ 45\\ 6\\ 47\\ 48\\ 9\end{array}$

Abbreviations: c, cytoplasmic; m, membrane; nucleolus, nu; SB, stratum basale; SC, stratum corneum; SG, stratum granulosum; SS,

stratum spinosum; *Nonspecific labeling of the upper part of SC; #Increased expression on hyperplastic layer.

FIGURE LEGENDS

Figure 1. Clinical features and genetic analyses of DCS patient D-3's *ABHD5* mutation c.776G>A, p.Gly259Asp. (a) Ichthyosiform erythroderma on the foot and silvery-white scales coating the scalp. (b) Cytoplasmic vacuoles (arrows) in granulocytes (Jordans' anomaly). (c) *ABHD5* sequencing revealed a homozygous mutation (arrow) (c.776G>A leading to p.Gly259Asp) (P), a heterozygous mutation (arrow) in his father (F) and a normal sequence (arrow) in a control (C). (d) In silico analysis of the glycine-259 conversion to aspartate (arrow) predicted structural changes (arrowheads) of serine-238, methionine-239 and arginine-273; turn (T), helix (H), coil (C) (http://scratch.proteomics.ics.uci.edu/). (e) ABHD5 amino-acid alignment for 11 species (ClustalW2) demonstrated that glycine-259 (red box) is highly conserved throughout evolution.

Figure 2. Genetic analyses of patient E's large ABHD5 deletion g.43726376_43742311del15935+ins46. (a) Amplification of the seven ABHD5 exons revealed the absence of exon-1 and -2 (arrow). (b) QRT-PCR using intra-exon-1 and -4 primers indicated the absence of ABHD5 mRNA. (c) QRT-PCR of ABHD5 with exon-3 primers detected no mRNA for the patient and 50% of normal levels for his parents and sister. (d) Amplicon sequence obtained with -7-kb and intron-2 ABHD5 primers showed the deletion borders (black lines) and a 46-bp insertion (red line). (e) ABHD5 immunofluorescence was negative in the patient's sebaceous glands but positive in a control (red: ABHD5, green: nuclei). Scale bar = 50 μm.

Figure 3. Immunofluorescence labeling for DCS patients D-1 and E, and one subject each with psoriasis, X-linked ichthyothis or Netherton syndrome and a healthy control. Subjects' paraffin-embedded skin sections of were immunolabeled for ceramides, ELOVL4, GBA,

ALOXE3 or TGM1. Areas between dotted lines represent the stratum corneum. Scale bar = 50 μ m.

Figure 4. PLIN3, a new ABHD5 protein partner, is very poorly expressed in DCS patients' epidermis. (a) Y2H technology used Episkin® and human placenta prey libraries and ABHD5 bait. The numbers of clones and their Predicted Biological Scores (PBS) of interaction confidence were determined for both libraries for each prey protein (GORASP2, golgi-reassembly stacking protein-2; ATF6, activating transcription factor-6). Segments of each protein involved in the interaction are schematized on the right. (b) PLIN3 and ABHD5 proximity-ligation assays showed interactions (red dots) in the HaCaT-cell cytoplasm (bar = 10 μ m) and epidermal stratum corneum (SC) (bar = 15 μ m). (c) PLIN3 immunofluorescence in the skin of one healthy, four DCS and one X-linked ichthyosis subject. Areas between dotted lines represent the SC (bar = 25 μ m).

Figure 5. *ABHD5*-mutation spectrum identified in our cohort of Dorfman–Chanarin syndrome patients vs. the literature. ABHD5 protein-domain structures include adipose triacylglycerol lipase-binding site (ABS; amino acids 1–30, orange rectangle) and α/β -hydrolase domain (amino acids 104–345, blue rectangle). The seven individual *ABHD*-gene exons (E1–7) are represented as numbered yellow boxes. Missense (black) and non-sense (green) mutations are above the diagram and the insertion (Ins) deletion (del), splice sites and frameshift (orange) are below it. Mutations identified in our cohort are highlighted in grey.

Page 250 of rad of Investigative Dermatology











Page 29 of 40

Journal of Investigative Dermatology

Perilipin-3, a new ABHD5 protein partner, may be involved in ichthyosis pathophysiology in Dorfman–Chanarin syndrome

Benjamin Roussel¹, Catherine Prost-Squarcioni^{2,3,4}, Annie Levy², Gérôme Bohelay⁴, Gilles Safa⁵, Estelle Breton⁶, Liliane Laroche⁴, Pierre-Olivier Schischmanoff⁷ and Frédéric Caux^{1,4} ¹INSERM UMR1125, Paris 13 University, Sorbonne Paris Cité, Bobigny, France; ²Department of Pathology, Avicenne Hospital, APHP, Bobigny, France; ³Laboratory of Histology, Paris 13 University, Sorbonne Paris Cité, Bobigny, France; ⁴Referral Center for Genetic Skin Diseases, Department of Dermatology, Avicenne Hospital, APHP, Bobigny, France; ⁵Dermatology Unit, Saint-Brieuc Hospital, Saint-Brieuc, France; ⁶Department of Pediatrics, Saint-Brieuc Hospital, Saint-Brieuc, France; and ⁷Laboratory of Biochemistry, Avicenne Hospital, APHP, Bobigny, France

Correspondence: Frédéric Caux, INSERM UMR1125, Paris 13 University, Sorbonne Paris Cité, 74, rue Marcel-Cachin, 93000 Bobigny, France, or Referral Center for Genetic Skin Diseases, Department of Dermatology, Avicenne Hospital, APHP, 125, rue de Stalingrad, 93009 Bobigny, France. Phone: +33 (0)1 48 95 51 89; Fax: +33 (0)1 48 95 51 87; Email: frederic.caux@aphp.fr

SUPPLEMENTARY MATERIALS AND METHODS

Subjects

Our studies were conducted in accordance with the Declaration of Helsinki Principles. All patients gave their written informed consent for blood testing and skin biopsy, except for anonymized archived-tissue samples.

Genetic analysis

Genomic DNA was isolated from peripheral blood mononuclear cells (PBMC) using the QIAamp DNA Blood Maxi Kit (Qiagen, Courtaboeuf, France). PCR used the HotStart Taq Master Mix kit (Qiagen, Courtaboeuf, France). RNA was extracted from PBMC with the TriReagent RNA/DNA/Protein isolation reagent (Euromedex, Souffelweyersheim, France) and reverse transcription used SuperScript III reverse transcriptase (18080-044, Invitrogen, Cergy-Pontoise, France). The primers, all used at 5 pmol/µl, are listed in Tables S2 and S3. The following protocol was applied: initial heat activation at 95°C for 15 minutes, followed by 35 cycles of denaturation at 94°C for 40 seconds; annealing, temperature varied depending on the primer pairs (see Table S2 below) for 30 seconds; and elongation at 72°C for 30 seconds, with a terminal elongation step at 72°C for 10 minutes. PCR amplicons were purified with the Exosap-IT reagent (GE Healthcare, Orsay, France) and subjected to direct sequencing using the ABI PRISM Big Dye Terminator V.1.1 Kit on an ABI PRISM 3100 genetic analyzer (Life Technologies, Saint-Aubin, France). The oligonucleotide primers and PCR conditions used to amplify α/β -hydrolase domain-containing protein-5 (ABHD5)-exon regions were previously described (Lefèvre et al., 2001), except for exon-1, which was amplified with Advantage-GC Genomic LA Polymerase Mix (Ozyme, Saint-Quentin-en-Yvelines, France) and the primers used

were associated with M13 tails (see Table S2 below).

Quantitative real-time RT-PCR (QRT-PCR) used specific ABHD5 primers; the reference gene was β-actin gene (Table S3). Primers were designed through the websites http://biotools.umassmed.edu/bioapps/primer3_www.cgi and http://www.roche-appliedscience.com/shop/CategoryDisplay?catalogId=10001&tab=&identifier=Universal+Probe+Librar y#tab-3 (panel "Assay design center"). We used LightCyclerFastStart DNA MasterPlus SYBR Green I kit (Roche, Meylan, France) and LightCycler system 1.5 (Roche) for QRT-PCR. The following protocol was used: initial heat activation at 94°C for 10 seconds, then 45 cycles of denaturation at 94°C for 10 seconds; annealing, temperature varied according to the primer pairs (see Table S3 below) for 10 seconds; and elongation at 72°C for 12 seconds.

Yeast two-hydrid (Y2H) screening

Hybrigenics Services (S.A.S., Paris, France) conducted the Y2H screening. A DNA fragment encoding human ABHD5 (amino acids 1–349) was PCR amplified and cloned into, respectively, pB29 or pB43 for N-terminal fusion to LexA (N-ABHD5–LexA-C) and GAL4 (N-ABHD5– GAL4-C) DNA-binding domains. These plasmids were used as bait to screen random-primed human reconstituted skin Episkin® and human placenta cDNA libraries. Colonies were selected using medium without tryptophan, leucine and histidine; 13 and 49 His+ clones were found with the Episkin® and placental libraries, respectively. The prey fragments of those clones were amplified by PCR and sequenced at their 5' and 3' junctions. The interacting proteins were deduced from the sequences using the GenBank database and the Predicted Biological Score, which indicates the degree of confidence in the interaction, was determined. That score relies on two different levels of analysis. First, a local score takes into account the redundancy and

 $\begin{array}{c}1\\2\\3\\4\\5\\6\\7\\8\\9\\10\\11\\12\\13\\14\\15\end{array}$

16 17

18 19

Journal of Investigative Dermatology

independency of prey fragments, and the distribution of reading frames and stop codons in overlapping fragments. Second, a global score takes into account the interactions found in all the Hybrigenics screenings using the same library. This global score represents the probability of an interaction being nonspecific. For practical use, the scores were divided into four categories: A, . confi. es were pos. very high confidence; B, high confidence; C, good confidence; and D, moderate confidence. The Predicted Biological Scores were positively associated with the biological importance of

interactions.

20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 31 32 33 34 35 36 37 38 $\begin{array}{r} 39\\ 40\\ 41\\ 42\\ 43\\ 44\\ 45\\ 46\\ 47\\ 48\\ 49\\ 50\\ 51\\ 52\\ 54\\ 55\\ 56\\ 57\\ 58\end{array}$ 59

60

106

SUPPLEMENTARY TABLES

Table S1. ABHD5 mutations in Dorfman-Chanarin syndrome patients and their predictied

consequences

Patient	Ethnic origin	Nucleotide change	Predicted protein change	Mutation type	
A	Turk	c.594insC	p.R199QfsX10	Frameshift	
В	Tunisian	c.774-1G>A		Frameshift	
С	Tunisian 🧹	c.774-1G>A		Frameshift	
D- 1	Iraqi	c.776G>A	p.Gly259Asp	Missense	
D-2	Iraqi	c.776G>A	p.Gly259Asp	Missense	
D-3	Iraqi	c.776G>A	p.Gly259Asp	Missense	
E	Moroccan	g.43726376_43742311		Large deletion	
		del15935+ins46			

NONIT

Page 35 of 40

Journal of Investigative Dermatology

Table S2. List of PCR primers

		Annealing	Amplicon
Primer pair	5'-Sequence-3'	temp, °C	size, bp
ABHD5 exon-1 F	TGTAAAACGACGGCCAGTGGGAGAACTAGTGCATGCTG	(0)	105
ABHD5 exon-1 R	CAGGAAACAGCTATGACCAGTCCGGCTCAGACACCTC	60	495
ABHD5 exon-2 F	CCATGCTTTGTGCATGTTAG		
ABHD5 exon-2 R	AAACAAATTCCTTGGGGTC	61	491
ABHD5 exon-3 F	TGAGGTAGGTCTTCCCCTTT		
ABHD5 exon-3 R	AGAGAATGTCTGCCTTGTGG	61	693
ABHD5 exon-4 F	CGTGAAGGTTTTTGAAGGTG		
ABHD5 exon-4 R	GGGTTCAGGGTTTTCTTGTT	61	377
ABHD5 exon-5 F	AATGTGTGCTTTTTCCCACC		
ABHD5 exon-5 R	GACCTGGGGTCAGAAGTTCA	64	616
ABHD5 exon-6 F	CTTAGGTGCTGGAAAAGCTA		
ABHD5 exon-6 R	GTAGTTCACGGTTTGGACAT	59	492
ABHD5 exon-7 F	TTTAAATACAGTGGCTCTCACTT	60	572

Journal of Investigative Dermatology

Page 36 of 40

6

ABHD5 exon-7 R	TCAGAAATCACTTCCTAAATTGG		
–2-kb ABHD5 F	GGAGCAGGCATCTTACATGA	50	(11
–2-kb ABHD5 R	GGAGACAAATCCAGCTTGTCA	59	011
–4-kb ABHD5 F	TGGTAGAGATGGGGTCTTGC	50	102
–4-kb ABHD5 R	TGTTCCTACTGCCAATCAGC	59	402
-5-kb ABHD5 F	GTAGGGACATTCCCCACTGA	50	501
-5-kb ABHD5 R	TGAGAGCTCCGCATAGTTGA	59	501
–7-kb ABHD5 F	ССАСТБСТСААТБАААСАААА	50	500
–7-kb ABHD5 R	AAGGTGTAAGGAAGGGTTCCA	28	508
–10-kb ABHD5 F	GATACTGTGGGAGGGTGGAG	50	610
–10-kb ABHD5 R	GCTGCCTTTTGTTTGGCTAT	59	512
–20-kb ABHD5 F	TATGGCTGGTAGCACAGTGG	50	(02
–20-kb ABHD5 R	GGGATTAGTCCTGTCTTACATGG	59	603
–40-kb ABHD5 F	CAAAGGATTTCTGGGTCAGG	50	(0.1
–40-kb ABHD5 R	TTGGGTTGAATAGAACTGAATGA	29	604
–7-kb ABHD5 F	CCACTGCTCAATGAAACAAAA	57	1,597*
Page 37 of 40

Journal of Investigative Dermatology

ABHD5 intron-2 R	GAGCAAGTTTACCCAAGTATATGGA		
ABHD5 intron-2 F	TCAGAGCAAGCAGCCTTGTA		
ABHD5 intron-2 R	59	903	
ABHD5 intron-1 F	CGTGAAACCCCGTCTGTATT	50	0.50
ABHD5 intron-1 R	GGGTGACAGAGCAAGAACCT	59	850

* Only patient E's genomic DNA with a large deletion, unlike normal DNA, was amplified.

Journal of Investigative Dermatology

Page 38 of 40

		Annealing	Amplicon size, bp	
Primer pair	5' - Sequence - 3'	temp, °C		
ABHD5 exon-1 F	GAGGAGGAGGAGGAGGTGGACTC	(0)	(52	
ABHD5 exon-4 R	CAAAGGGTCCTGCAATCCT	60	052	
ABHD5 exon-1 F	GAGGAGGAGGAGGTGGACTC	60	1040	
ABHD5 exon-7 R	CAGTCCACAGTGTCGCAGAT	00	1040	
ABHD5 qPCR F	GGACAAATTGATCTTGCTTG	50	107	
ABHD5 qPCR R	CCCAAGGCTCCACTAAAATG	39	107	
Actin QRT-PCR F	CCAACCGCGAGAAGATGA	50	07	
Actin QRT-PCR R	CCAGAGGCGTACAGGGATAG	58	97	
Actin F	ATCTGGCACCACACCTTGTACATTGAGCTG	50	775	
Actin R	CGTCATACTCCTGCTTGCTGATCCACATCTGC	58	115	

Page 39 of 40

17

18 19



mutation c.776G>A. (a) RT-PCR revealed no change of amplicon sizes for patient D-2, his father and a healthy control when paired primers amplifying exons-1-7 were used. β-Actin served as a loading control. (b) QRT-PCR detected no change in mRNA quantity in the same three subjects.

10



Figure S2. Investigation of patient E's *ABHD5*-deletion borders. (a) DNA amplifications with primers for intron-1 and -2, and -2-kb, -4-kb, -5-kb upstream from the *ABHD5* start codon were negative for the patient but positive for his mother and one control. Amplifications were positive for the three subjects when primers from -7 kb to -40 kb upstream from the *ABHD5* ATG were used. (b) Amplification was possible for the patient and his mother using one -7-kb primer and one primer at the end of intron-2 that identified the deletion borders. No amplicons were detected for the healthy control, probably attributable to a too long sequence to be amplified by PCR. Control (C), mother (M), patient (P).

B. Étude d'ABHD5 en condition physiologique

1. Description d'un nouveau transcrit alternatif d'ABHD5

chez la souris

En 2010, un transcrit court ne comportant pas les exons 2 et 3 ($\Delta 2$,3) et dont la partie codante est de 597 pb a été identifié dans 3 tissus murins (103). Nous avons réalisé une analyse en RT-PCR d'ABHD5 dans le cerveau de souris ; nous avons choisi le cerveau puisque l'expression d'ABHD5 est intense dans ce tissu. En utilisant pour la PCR des primers sens dans l'exon 1 et antisens dans l'exon 7, trois bandes ont été identifiées: une bande migrant à environ 1200 pb correspondant probablement à la forme complète de l'ARNm d'*ABHD5* (« full-length », FL, forme complète) d'ABHD5, le transcrit alternatif déjà décrit migrant à environ 650 pb ($\Delta 2$,3) et une troisième bande (n°3) inconnue à environ 1100 pb (Figure 7).





La bande n°3 a été extraite du gel d'agarose puis purifiée et séquencée. L'analyse de sa séquence montre une absence de l'exon 2 (Figure 8), donc l'existence d'un épissage alternatif d'ABHD5 chez la souris. Ce nouveau transcrit alternatif sera appelé $\Delta 2$. Sa taille moléculaire est de 970 pb théorique, car la forme complète de l'ARNm codant de souris a une taille de 1056 pb et l'exon 2 de 86 pb.



Figure 8. Chromatogramme montrant la jonction nucléotidique entre l'exon 1 et l'exon 3. Ce chromatogramme est issu du séquençage de la bande n°3 en gel d'agarose. Le trait noir indique la fin de l'exon 1 et le trait rouge le début de l'exon 3, montrant ainsi l'existence d'un ARNm sans exon 2 (Δ 2) chez la souris.

Ce transcrit $\Delta 2$ a été recherché et identifié dans 31 tissus de la souris.

Nous avons ensuite choisi de nouvelles amorces afin de permettre l'amplification spécifique de $\Delta 2,3$ (une amorce qui chevauche l'exon 1 et 4 en sens et une dans l'exon 7 en anti-sens) et du transcrit $\Delta 2$ (une amorce sens dans l'exon 1 et une anti-sens dans l'exon 3). La présence de $\Delta 2,3$ et de $\Delta 2$ étaient retrouvée de façon ubiquitaire dans les 31 tissues testés (Figure 9). Le ratio entre la FL d'ABHD5, $\Delta 2$ et $\Delta 2,3$ a été mesurée de façon semi quantitative dans chaque tissu par analyse des images de migration de PCR. Nous avons observé une faible abondance de la forme courte $\Delta 2,3$ par rapport à la FL d'ABHD5 dans certains tissus (vésicule séminale, glande de Tyson, cerveau, testicule, peau, foie et prostate) et une absence quasi-complète dans le foie et la prostate. Le transcrit $\Delta 2,3$ est presque aussi abondant que la FL d'ABHD5 dans l'estomac, le vagin, la langue, la graisse péri-testiculaire et la graisse hypodermique.

Le rapport ABHD5 FL par rapport à $\Delta 2$ montre que le transcrit $\Delta 2$ est peu exprimé dans le testicule, la glande de Tyson, la graisse péri-utérine, le foie, la peau, le vagin et l'utérus, tandis qu'il l'est plus dans la graisse hypodermique, le cœur, le cerveau, le cervelet, l'œil, l'épididyme et la glande surrénale.



Figure 9. Électrophorèses des RT-PCR d'ABHD5 dans 31 organes et tissus de souris. **A**: amplification de l'exon 1 à l'exon 7, **B**: amplification spécifique de $\Delta 2,3$ avec une amorce sens présente au niveau de la zone de chevauchement des exons 1 et 4,C: amplification spécifique du nouveau transcrit alternatif $\Delta 2$ en utilisant une amorce anti-sens dans l'exon 3. FL = forme complète d'ABHD5, Tes = testicule, Ov = ovaire, Ty1/5 = glande de Tyson diluée au 5^{ème}, Vesi = vésicule séminale, Pro = prostate, Sur = glande surrénale, Ty = glande de Tyson, GrA = graisse abdominale, GrR = graisse péri-rénale, GrP = graisse de la peau, GrT = graisse péri-testiculaire, GrU = graisse péri-utérine, Mus = muscle, Coe = cœur, Lan = langue, Cerv = cerveau, Cert = cervelet, Ut = utérus, Vag = vagin, Pou = poumon, Thy = thymus, Col = colon, Est = estomac, Oes = œsophage, Vess = vessie et Tra = trachée.

2. Description de quatre nouveaux transcrits alternatifs d'ABHD5

chez l'homme

La découverte de nouveaux transcrits dans d'autres espèces que l'Homme (cf. Introduction) ainsi que la présence de $\Delta 2$ chez la souris nous ont conduit à rechercher l'existence d'un épissage alternatif chez l'Homme. En utilisant des ARNm issus de cellules mononuclées sanguines de 3 sujets sains, nous avons réalisé des RT-PCR amplifiant les transcrits d'ABHD5 avec des couples d'amorces dans les exons 1 et 4, et dans les exons 1 et 7 (figure 10). Nous avons observé la présence de deux bandes supplémentaires sous la FL d'ABHD5 lorsque l'ADNc était amplifié des exons 1 à 7. La première était plus courte d'environ 50 pb (encadrée en bleue) et la seconde d'environ 150 pb (encadrée en jaune). Ces deux bandes supplémentaires n'étaient pas détectées avec le couple d'amorces exon 1 - exon 4.

Nous avons donc supposé qu'il existait des transcrits alternatifs avec un épissage dans les exons 4 à 7 d'*ABHD5* puiqu'aucune bande supplémentaire n'était observée en amplifiant les exons 1 à 4 en RT-PCR.



Figure 10. Électrophorèse sur gel d'agarose des produits de RT-PCR issus de l'amplification d'ABHD5 (exons 1 à 4 et 1 à 7) à partir d'ARNm de cellules mononuclées sanguines de 3 sujets sains (S1, S2 et S3). On observe deux bandes supplémentaires sous la forme longue d'ABHD5 (amplification du gène desexons 1 à 7). La première bande supplémentaire est encadrée de couleur bleue, la deuxième de couleur jaune.

Nous avons réalisé des RT-PCR en amplifiant les exons 4 à 7 ou 5 à 7 d'ABHD5 en utilisant des ARNm issus de 5 types de cellules et tissus (fibroblastes cutanés, kératinocytes, cellules mononuclées du sang, leucocytes et graisse sous-cutanée) (Figure 11A). Au moins quatre bandes supplémentaires ont été identifiées : 600 pb (encadrée en jaune) et 400 pb (encadrée en rouge), 380 pb (encadrée en vert) et 370 pb (encadrée en bleue) lorsque l'ADNc issu des 5 échantillons biologiques différents était amplifié respectivement entre les exons 4 et 7, et les exons 4 et 6 (Figure 11B). Ces quatre bandes ont été extraites des gels d'agarose puis séquencées.



Figure 11. Électrophorèse des RT-PCR d'ABHD5 dans 5 types de tissus et cellules humaines. **A** : amplification de l'ADNc des 5 types de tissus et cellules des exons 4 à 7 et des exons 5 à 7.

Des bandes supplémentaires en dessous de la FL sont observables. **B** : Les pistes sont les produits issus d'amplification par PCR de l'ADNc des cellules mononuclées du sang. La piste de gauche montre le résultat de RT-PCR avec des amorces dans les exons 4 et 7, tandis que celle de droite avec des amorces dans les exons 4 et 6. Plusieurs bandes sont observées en dessous de la FL. Sont encadrés, les bandes supplémentaires qui ont été séquencées. FL =forme complète d'ABHD5, P = cellules mononuclées du sang, F = fibroblastes, G = graisse sous-cutanée, K = kératinocytes et L = leucocytes.

Le séquençage de la première bande identifiée (bande n°1) montrait une absence de l'exon 6 et a été appelée $\Delta 6$. Le séquençage de la bande n°2 montrait une absence des exons 5 et 6 et a été nommée $\Delta 5$,6. Ensuite, le séquençage de la bande n°3 révélait une absence du début de l'exon 6 et a été appelée Δ intra6. Enfin le séquençage de la bande n°4 montrait une absence d'exon 5 et a été nommée $\Delta 5$ (Figure 12).

Ces résultats de séquençage mettaient en évidence l'existence de 4 nouveaux transcrits d'ABHD5, en rapport avec des épissages alternatifs chez l'Homme.



Figure 12. Chromatogrammes du séquençage des produits de RT-PCR (4 bandes de la figure 10B) centrés sur les nouvelles zones crées par l'épissage alternatif A : Chromatogramme de la bande n°1, épissage de l'exon 6 ; B : chromatogramme de la bande n°2, épissage des exons 5 et 6 ; C : chromatogramme de la bande n°3, épissage du début de l'exon 6 et D : chromatogramme de la bande n°4, épissage de l'exon 5.

Ces résultats ont été validés par une seconde méthode, à savoir des RT-PCR utilisant de nouvelles amorces hybridant sur les régions nucléotidiques nouvellement créées par les épissages alternatifs (zone de chevauchement des exons qui restent) (13A).

Pour chacun des 4 nouveaux transcrits alternatifs, une seule bande a retrouvé dans les 5 types de tissus et cellules. Chaque amplicon retrouvé en RT-PCR spécifique pour chacun des transcrits alternatifs était au poids moléculaire attendu après migration en gel d'agarose. Le poids moléculaire du transcrit Δ 5,6 était de 160 pb, de Δ 5 de 161 pb, de Δ 6 est de 269 pb et de Δ intra6 de 272 pb (Figure 13B). L'intensité des amplicons était supérieure à ce qui était observé lors de l'amplification avec le couple de primers exon 4 – exon 7. La taille moléculaire de l'amplicon pour un transcrit alternatif donné était la même entre les différents tissus et cellules humains.



Figure 13. Amplification spécifique des 4 transcrits alternatifs d'ABHD5 chez l'Homme. **A** : Représentation schématique des exons qui constituent les différents transcrits. Les cercles de couleur indiquent la région où les amorces sens ont été disposées pour amplifier spécifiquement les transcrits alternatifs. **B** : Electrophorèse des RT-PCR amplifiant spécifiquement les transcrits alternatifs d'ABHD5. L'amorce sens est située sur la région de chevauchement des exons restants et l'amorce anti-sens est dans l'exon 7. P = Cellules mononuclées du sang, F = fibroblastes, G = graisse sous-cutanée, K = kératinocytes et L = Leucocytes.

3. <u>Caractérisation protéique d'ABHD5 et ses isoformes chez</u> <u>l'Homme</u>

Des transcrits alternatifs humains d'ABHD5 ayant été identifiés par 2 méthodes distinctes, nous avons souhaité rechercher si ceux-ci étaient traduits en protéines.

Les séquences en a.a. des isoformes potentielles ont été obtenues en réalisant une traduction *in silico* des ARNm alternatifs (Figure 14).

Protéine ABHD5 FL (39 kDa théorique, migre à 45 kDa ; pl = 6.16)

MAAEEEEVDSADTGERSGWLTGWLPTWCPTSISHLKEAEEKMLKCVPCTYKKEPVRISNGNKIWTLKFSHNISNKT PLVLLHGFGGGLGLWALNFGDLCTNRPVYAFDLLGFGRSSRPRFDSDAEEVENQFVESIEEWRCALGLDKMILLGH NLGGFLAAAYSLKYPSRVNHLILVEPW<mark>GFPERPDLADQDRPIPVWIRALGAALTPFNPLAGLRIAGPFGLSLVQ</mark>RLRP DFKRKYSSM<mark>FEDDTVTEYIYHCNVQTPSGETAFKNMTIPYGWAKRPMLQRIGKMHPDIPVSVIFGARSCIDGNSGT SIQSLRPHSYVKTIAILGAGHYVYADQPEEFNQKVK</mark>EICDTVD

Protéine ABHD5 Δ6 (isoforme prédite, 31 kDa ; pl = 6.33)

MAAEEEEVDSADTGERSGWLTGWLPTWCPTSISHLKEAEEKMLKCVPCTYKKEPVRISNGNKIWTLKFSHNISNKT PLVLLHGFGGGLGLWALNFGDLCTNRPVYAFDLLGFGRSSRPRFDSDAEEVENQFVESIEEWRCALGLDKMILLGH NLGGFLAAAYSLKYPSRVNHLILVEPW<mark>GFPERPDLADQDRPIPVWIRALGAALTPFNPLAGLRIAGPFGLSLVQ</mark>RLRP DFKRKYSSM<mark>FEDDTVTEYIYHCNVQTP</mark>RLFLGQDIMYMQINQKNSTRK

Protéine ABHD5 Δ5 (isoforme prédite, 25 kDa ; pl = 5.98)

MAAEEEEVDSADTGERSGWLTGWLPTWCPTSISHLKEAEEKMLKCVPCTYKKEPVRISNGNKIWTLKFSHNISNKT PLVLLHGFGGGLGLWALNFGDLCTNRPVYAFDLLGFGRSSRPRFDSDAEEVENQFVESIEEWRCALGLDKMILLGH NLGGFLAAAYSLKYPSRVNHLILVEPW<mark>GFPERPDLADQDRPIPVWIRALGAALTPFNPLAGLRIAGPF</mark>VVRQLSRI

Protéine ABHD5 Δ5,6 (isoforme prédite, 28 kDa ; pl = 7)

MAAEEEEVDSADTGERSGWLTGWLPTWCPTSISHLKEAEEKMLKCVPCTYKKEPVRISNGNKIWTLKFSHNISNKT PLVLLHGFGGGLGLWALNFGDLCTNRPVYAFDLLGFGRSSRPRFDSDAEEVENQFVESIEEWRCALGLDKMILLGH NLGGFLAAAYSLKYPSRVNHLILVEPW<mark>GFPERPDLADQDRPIPVWIRALGAALTPFNPLAGLRIAGPF</mark>GYSWGRTLCI CRSTRRIQPESKGDLRHCGLNTLKL

Protéine ABHD5 Δintra6 (isoforme prédite, 37 kDa ; pl = 6.79)

MAAEEEEVDSADTGERSGWLTGWLPTWCPTSISHLKEAEEKMLKCVPCTYKKEPVRISNGNKIWTLKFSHNISNKT PLVLLHGFGGGLGLWALNFGDLCTNRPVYAFDLLGFGRSSRPRFDSDAEEVENQFVESIEEWRCALGLDKMILLGH NLGGFLAAAYSLKYPSRVNHLILVEPW<mark>GFPERPDLADQDRPIPVWIRALGAALTPFNPLAGLRIAGPFGLSLVQ</mark>RLRP DFKRKYSSM<mark>FEDDTVTEYIYHCNVQTP</mark>SFSDLWRPILHRWQFWHQHPVLTTTFICEDNSYSWGRTLCICRSTRRIQP ESKGDLRHCGLNTLKL

Figure 14. Séquences protéiques d'ABHD5 FL et de ses isoformes prédites ainsi que les a.a. potentiellement détectés par les anticorps sélectionnés. En vert, les a.a. potentiellement reconnus par l'anticorps anti-ABHD5 E1, en jaune les a.a. potentiellement reconnus par l'anticorps anti-ABHD5 4B12. Les séquences complètes d'a.a. potentiellement reconnus par les anticorps sont celles indiquées sur la protéine ABHD5 FL. Le poids moléculaire de chaque forme d'ABHD5 est indiqué ainsi que le point isoélectrique (pI). FL = « Full length », forme protéique complète.

En fonction des séquences obtenues, deux anticorps monoclonaux dirigés contre ABHD5 humain ont été sélectionnés.

Nous avons tenu compte de la séquence polypeptidique d'ABHD5 qui avait été utilisée pour réaliser l'immunisation nécessaire à la production des anticorps monoclonaux. Le premier anticorps, E1, pourrait éventuellement reconnaître toutes les formes d'ABHD5 (FL et isoformes prédites) tandis que le second, 4B12, détecterait uniquement FL (et très hypothétiquement 2 isoformes). Ce sont tous deux des IgG de souris.

a. Révélation d'ABHD5 par western blot à partir d'extraits protéiques totaux

Nous avons ensuite réalisé, avec les anticorps sélectionnés, un western-blot avec un extrait protéique issu de graisse sous-cutanée (la protéine ABHD5 est moins rare dans ce tissu que dans l'épiderme). Comme attendu, la forme complète d'ABHD5 était détectée avec les deux anticorps et migrait à 45 kDa. Avec l'anticorps E1 qui pourrait reconnaître toutes les isoformes prédites, il existait de multiples bandes supplémentaires sous la bande FL (environ 20, 25, 28, 29 et 30 Kda). En revanche, avec l'anticorps 4B12 qui reconnait FL (et potentiellement 2 isoformes), il existait une seule bande supplémentaire (environ 30 Kda, Figure 15). Certaines bandes étaient à un poids moléculaire compatible avec les prédictions bioinformatiques du poids moléculaire des isoformes (Figure 14).



Figure 15. Western blot utilisant un extrait de protéines de graisse sous-cutanée humaine. La première piste est révélée avec l'anticorps 4B12 (reconnait essentiellement ABHD5 FL), la seconde piste avec l'anticorps E1 (reconnait toutes les formes prédites d'ABHD5) et la troisième est un contrôle négatif avec du sérum de souris. La forme complète d'ABHD5 est indiquée par la flèche FL et migre à environ 45kDa. Des bandes accessoires sous la FL pourraient être les isoformes prédites. FL = « Full length », forme complète de la protéine ABHD5.

Un western blot a également été effectué en utilisant d'autres extraits protéiques, à savoir des protéines extraites de cellules HaCaT et d'épiderme humain sain (Figure 16). Avec l'anticorps E1, ABHD5 FL était observée dans l'épiderme et les cellules HaCaT ; des bandes accessoires pouvant être des isoformes étaient visibles dans l'extrait protéique de l'épiderme mais disparaissait dans l'extrait HaCaT. L'anticorps 4B12 détectait la FL d'ABHD5 dans l'épiderme et les cellules HaCaT ainsi que de nombreuses bandes non spécifiques.



Figure 16. Western blot utilisant des extraits protéiques issus de cellules HaCaT et d'épiderme humain sain. Avec l'extrait de protéines épidermiques et l'anticorps anti-ABHD5 E1, on observe la FL d'ABHD5 à 45 kDa ainsi que des bandes accessoires pouvant être des isoformes. L'anticorps 4B12 retrouve la FL d'ABHD5 mais avec un marquage non spécifique fort. Avec l'extrait de protéines des cellules HaCaT, on retrouve uniquement la FL d'ABHD5 avec l'anticorps E1. L'anticorps 4B12 met en évidence aussi la FL d'ABHD5 mais de nouveau avec plusieurs bandes non spécifiques. Le contrôle négatif effectué avec du sérum de souris montre une bande aspécifique en dessous de la FL d'ABHD5. Entre les pointillés rouges, la région de la FL d'ABHD5. FL = « Full length », forme complète de la protéine ABHD5, E. = Epiderme et Ha. = cellules HaCaT.

Ces résultats ne permettant pas d'établir avec certitude qu'il existe une traduction des ARNm alternatifs d'ABHD5, nous avons tenté de détecter directement ces isoformes en utilisant plusieurs protocoles de spectrométrie de masse (SmM). Cette technique devait permettre de valider définitivement l'existence de ces isoformes.

b. Identification d'ABHD5 par gels 2D à partir d'extraits protéiques totaux

À partir d'un extrait protéique de graisse sous-cutanée humaine, les protéines ont été soumises à une migration en gel SDS-PAGE. La proximité des masses moléculaires d'ABHD5 et de l'albumine dans l'extrait protéique nous a conduits à faire une séparation par electrophorèse plus longue afin que l'albumine soit le plus possible séparée d'ABHD5. De plus, ABHD5 étant une protéine minoritaire, nous avons déposé une grande quantité d'extrait protéique (1mg d'extrait protéique sur toute la largeur du gel SDS-PAGE). Puis, après migration, nous avons découpé les bandes de gel correspondantes aux masses moléculaires d'ABHD5, et extrait les protéines du gel par élution passive. Ainsi, les éluats obtenus étaient plus concentrés en protéines d'intérêt sans risque de contamination par l'albumine.

Les régions d'intérêts correspondant à la forme longue (FL) d'ABHD5 (zone entre 50 et 37 kDa) et aux isoformes d'ABHD5 (zone entre 37 et 25 kDa) ont été découpées puis les protéines ont été extraites du gel par élution passive. Afin de mieux séparer l'ensemble des protéines situées à ces masses moléculaires, chaque éluat protéique a ensuite été séparé sur deux gels 2D. Le premier gel 2D a été utilisé pour réaliser un western blot et ainsi localiser toutes les tâches polypeptidiques (nous utiliserons le terme anglais « spots ») pouvant correspondre à ABHD5. Le second gel 2D a été coloré au bleu de Coomassie afin de prélever les spots d'intérêt et les identifier par spectrométrie de masse.

Les images des western blots et des gels 2D obtenues sont présentées figure 17. Après superposition des images, plusieurs spots sur les gels 2D correspondaient aux spots détectés par western blot après révélation par l'anticorps anti-ABHD5 E1.

Concernant la zone de la FL d'ABHD5, 7 spots du gel 2D coloré au bleu de Coomassie se superposaient parfaitement aux spots donnant un signal sur le western blot (Figure 17A et 17B). Les points isoélectriques (pl) retrouvés étaient d'environ 3 et 6. Le pl de 6 était conforme au pl prédit en bioinformatique de 6,16 pour la FL d'ABHD5 (Figure 14). Le signal se situant au pl de 3 était inattenduet semblait non-spécifique car aucune modification post-traductionelle d'ABHD5 ne permettrait d'expliquer un pl aussi acide. Ces spots ont été découpés pour une identification par spectrométrie de masse nanoLC-MS/MS. À partir de ces spots, 9 protéines différentes (Tableau supplémentaire 1) ont été identifiées.

124

Ces protéines correspondaient majoritairement à de l'actine. Aucune protéine correspondant à ABHD5 FL n'a été identifiée.

Concernant la zone correspondant aux isoformes d'ABHD5, 11 spots du gel 2D coloré au bleu de Coomassie se superposaient parfaitement aux spots donnant un signal sur le western blot (Figure 17C et 17D). Les pl retrouvés situés entre 6 et 7 étaient en accord avec les prédictions bioinformatiques pour les isoformes potentielles d'ABHD5 (Figure 14). Ces spots ont été découpés pour une identification par spectrométrie de masse nanoLC-MS/MS. À partir de ces spots, 24 protéines différentes (Tableau supplémentaire 1) ont été identifiées. Ces protéines correspondaient majoritairement à des enzymes (anhydrase et déshydrogénase). Aucune protéine correspondant à ABHD5 FL ou à une de ses isoformes potentielles n'a été identifiée.



Figure 17. Gels 2D et western blot révélés avec l'anticorps E1 à partir d'extraits protéiques totaux de graisse sous-cutanée humaine. **A** : Gels colorés au bleu de Coomassie et grossissement de la zone d'intérêt (50-37kDa). Les spots à découper sont entourés de rouge, il y en a sept. **B** : western blot associé pour localiser ABHD5 dans la zone d'intérêt (50-37kDa). Les spots à découper, encadrées en jaune et bleu foncé. **C** : Gels colorés au bleu de Coomassie et grossissement de la zone d'intérêt (50-37kDa). Les spots à découpe, encadrées en jaune et bleu foncé. **C** : Gels colorés au bleu de Coomassie et grossissement de la zone d'intérêt (50-37kDa). Les spots à découper sont entourés de rouge, il y en a 11. **D** : western blot associé pour localiser ABHD5 dans la zone d'intérêt. Deux zones de marquage sont utilisées pour la découpe, encadrées en jaune et bleu foncé pour localiser ABHD5 dans la zone d'intérêt. Deux zones de marquage sont utilisées pour la découpe, encadrées en jaune et bleu associé pour localiser ABHD5 dans la zone d'intérêt. Deux zones de marquage sont utilisées pour la découpe, encadrées en jaune et bleu associé pour localiser ABHD5 dans la zone d'intérêt. Deux zones de marquage sont utilisées pour la découpe, encadrées en bleu clair et vert.

c. Identification d'ABHD5 par immunoprécipitation

L'échec d'identification d'ABHD5 en spectrométrie de masse à partir d'extraits protéiques totaux nous a conduits à réaliser des immunoprécipitations pour purifier de façon spécifique ABHD5. Le protocole d'immunoprécipitation utilisé correspondait à celui où seul l'anticorps anti ABHD5 E1 a été immobilisé (protocole E1)

Dans un premier temps, des extraits protéiques obtenus à partir de graisse sous-cutanée humaine ont été utilisés. Après immunoprécipitation, l'éluat protéique a été séparé sur gel SDS-PAGE suivant la même stratégie que pour les gels 2D : un gel pour faire un western blot révélant ABHD5 grâce à l'anticorps E1 et un gel coloré au bleu de Coomassie pour la spectrométrie de masse.

L'immunoprécipitation à partir de graisse sous-cutanée montrait bien la présence d'ABHD5 FL (Figure 18A) révélée par l'anticorps E1. La superposition avec le gel SDS-PAGE coloré au bleu de Coomassie a permis de localiser 2 bandes d'intérêt numérotées 1 et 2 (Figure 18B).



Figure 18. Gel SDS-PAGE et western blot utilisés pour identifier ABHD5 par immunoprécipitation dans un extrait protéique issu de graisse sous-cutanée. **A** : western blot identifiant ABHD5 FL, la piste de gauche correspond à l'immunoprécipitation, celle de droite à l'extrait protéique de graisse sous-cutanée humaine. **B** : gel duquel ont été extraites les bandes 1 et 2 sélectionnées par superposition avec le western blot pour SmM. IP = immunoprécipitation révélée avec l'anticorps E1, Brut = extrait protéique de graisse sous-cutanée humaine.

L'analyse de ces deux bandes par spectrométrie de masse MALDI-TOF a conduit à retrouver 37 protéines différentes (Tableau supplémentaire 2).

Pour la bande 1, 8 protéines ont été identifiées (majoritairement de la kératine) et 29 protéines pour la bande 2 (principalement des Immunoglobulines). Parmi ces protéines, aucune ne correspondait à ABHD5.

Dans un deuxième temps, des extraits protéiques obtenus à partir de kératinocytes différenciées immortalisées (HaCaT) ont été utilisés pour les immunoprécipitations. Le protocole d'immunoprécipitation utilisé correspondait à celui où deux anticorps anti ABHD5, E1 et 4B12, ont été immobilisés (protocole E1 + 4B12). Cette double immobilisation permettait d'augmenter la sélection spécifique de la protéine ABHD5 de l'extrait de cellules HaCaT. Cette colonne a été validée par western blot comme présenté figure 19. Trois échantillons ont été testés : la fraction protéique non retenue par la colonne d'immunoprécipitation (exclu), la fraction protéique retenue par la colonne (IP) puis élué, et l'extrait protéique brut des cellules HaCaT (HaCaT). La FL d'ABHD5 était présente dans les 3 pistes, signifiant qu'ABHD5 était isolée de l'extrait protéique par immunoprécipitation. Nous expliquons cette fraction non retenue par le fait que nous avons mis une quantité importante de protéines dans la colonne d'immunoprécipitation.



Figure 19. Western blot révélé par l'anticorps E1 dirigé contre ABHD5 après immunoprécipitation d'un extrait protéique de cellules HaCaT. La première piste correspond à la fraction non retenue par la colonne (Exclu), la deuxième est le produit d'immunoprécipitation (IP) élué et la troisième est l'extrait protéique brut de cellules HaCaT (HaCaT). La FL d'ABHD5 est observée dans les 3 puits. IP = immunoprécipitation.

Pour augmenter la quantité de protéines retenues par la colonne de chromatographie d'affinité, les éluats de 10 immunoprécipitations ont été collectés, rassemblés, puis précipités en solvants organiques. Après resolubilisation du culot protéique, une partie du volume a été déposé sur gel SDS-PAGE (Figure 20).



Figure 20. Gel d'acrylamide avec dépôt d'une partie de la concentration de 10 immunoprécipitations. Dans ce gel coloré au bleu de Coomassie, 2 bandes ont été selectionnées pour être extraites puis analysées en SmM : bandes 1 et 2.

Après migration sur gel d'acrylamide et coloration au bleu de Coomassie, le gel révèlait deux bandes d'intérêts situées entre 50 et 37 kDa dont une qui migrait autour de 45 kDa (FL d' ABHD5). Celles-ci ont été prélevées puis analysées par MALDI-TOF.

Un total de 35 protéines a été identifié dans ces 2 bandes (18 dans la bande 1 et 17 dans la bande n°2). Les protéines correspondaient surtout à des immunoglobulines et des histones. ABHD5 n'a été identifiée dans aucune de ces deux bandes (Tableau supplémentaire 3).

Le culot protéique restant a ensuite été digéré directement en solution par de la trypsine et analysé par spectrométrie de masse nanoLC-MS/MS. Cette analyse a conduit à l'identification de 45 protéines différentes sans qu'aucune ne corresponde à ABHD5 (Tableau supplémentaire 4).

En conclusion, les analyses par SmM n'ont pas permis d'identifier la protéine ABHD5 dans les extraits de tissu adipeux humain.

4. <u>Recherche d'une glcosylation et de phosphorylations de la</u> protéine ABHD5

L'écart de poids moléculaire entre la théorie (39 kDa) et l'expérimental (45 kDa) suggère que ABHD5 puisse être la cible d'une modification post-traductionnelle comme une glycosylation. C'est pourquoi, nous avons recherché des modifications post-traductionnelles de la forme native d'ABHD5.

a. Recherche de glycosylation d'ABHD5

Nous avons recherché une N-glycosylation d'ABHD5 car deux sites potentiels de Nglycosylation ont été prédits, l'un sur la sérine 73 et l'autre sur la thréonine 267 (NetNglyc 1.0 server). La recherche de glycosylation a été faite à partir d'une immunoprécipitation d'ABHD5 provenant de la graisse sous-cutanée humaine.

Le contrôle positif utilisé était la fétuine, qui est une protéine fortement N-glycosylée. Celleci a été mise en suspension dans le même tampon que celui utilisé pour l'élution de l'immunoprécipitation afin de vérifier que la digestion par la Glycopeptidase-F était effective dans ce dernier.

La digestion par laglycopeptidase-F avait la même efficacité (le poids moléculaire de la fétuine de 56 kDa diminue à 49 kDa après digestion) dans l'eau, dans le tampon d'immunoprécipitation et dans le tampon d'extraction protéique (Figure 21).



Figure 21. Digestion de la fétuine par la Glycopeptidase F. Gel d'acrylamide avec dépôts de fétuine dans différents tampons. Dans les 2 premières pistes la fétuine est dans de l'eau, dans les 2 secondes dans le tampon de l'immunoprécipitation et dans les 2 derniers dans le tampon d'extraction des protéines. + : en présence de glycopeptidase-F, - : en absence de glycopeptidase-F. On observe que pour les 3 pistes sans glycopeptidase-F la fétuine a un poids moléculaire de 56 kDa et qu'après digestion, la bande migre autour de 49 kDa. Tp IP = Tampon dans lequel ABHD5 est immunoprécipitée, Tp ext. prot. = tampon dans lequel sont extraites les protéines de la graisse sous-cutanée humaine.

Deux produits d'immunoprécipitation ont été utilisés pour ce test de déglycosylation. Nous avons constaté qu'ABHD5 avait un poids moléculaire apparent de 45 kDa sans glycopeptidase-F (comme attendu) qui restait identique à 45 kDa après digestion enzymatique. Ainsi, ABHD5 n'est pas N-glycosylée (Figure 22).



Figure 22. Test de déglycosylation d'ABHD5 et contrôle positif avec la fétuine. **A** : bleu de Coomassie avec dépôts de la fétuine avec (+, piste de droite) ou sans (-, piste de gauche) digestion par la glycopeptidase-F. Après digestion par la glycopeptidase-F, le poids moléculaire de la fétuine diminue passant de 56 kDa à 49 kDa (piste 2). **B** : western blot révélé par l'anticorps E1 anti-ABHD5 des produits d'immunoprécipitation d'ABHD5. Aucune différence de poids moléculaire d'ABHD5 n'est observée avec (+) ou sans (-) glycopeptidase-F. Bleu de C. = bleu de Coomassie, WB = western blot, +Glycopep = présence de glycopeptidase-F, -Glycopep = absence de glycopeptidase-F.

b. Recherche de phosphorylations d'ABHD5

Pour rechercher la présence d'une phosphorylation, processus qui joue un rôle important dans la régulation cellulaire, nous avons étudié s'il existait des groupes phosphates sur une tyrosine, une sérine ou une thréonine d'ABHD5. De plus, selon certains logiciels de prédiction (NetPhos 3.1 server), plusieurs sérines, thréonines et tyrosines d'ABHD5 pourraient être phosphorylées par certaines kinases. Pour cela, ont été réalisés des western blots révélés avec différents anticorps anti-acide aminé phosphorylé et utilisant des échantillons d'immunoprécipitation d'ABHD5 obtenus à partir de protéines de graisse souscutanée humaine. Les dépôts d'extraits bruts et d'immunoprécipitations issus de graisse sous-cutanée montraient tous une bande à 45 kDa en utilisant l'anticorps anti-ABHD5 E1, comme attendu (Figure 23). Après révélation des western blots avec les anticorps anti-P-Sérine, anti-P-Thréonine et anti-P-Tyrosine, certaines bandes étaient visibles mais aucune bande à 45 kDa n'apparaissait (Figure 23). Ce résultat suggère que la protéine ABHD5 dans le tissu adipeux humain à l'état natif n'est pas phosphorylée.



Figure 23. Recherche d'une phosphorylation d'ABHD5 dans un extrait protéique de graisse sous-cutanée humaine par western blot. Ont été déposés un extrait protéique de graisse sous-cutanée (Brut) et des produits d'immunoprécipitation (IP). En utilisant l'anticorps anti-ABHD5 (E1), une bande à 45 kDa apparaissait correspondant à la FL d'ABHD5. Pour les pistes révélées par un anticorps anti-phospho-sérine (P-Ser), anti-phospho-thréonine (P-Thr) et anti-phospho-tyrosine (P-Tyr), aucune bande de 45 kDa comigrant avec ABHD5 FL n'était visible. Encadrée en rouge, la région d'intérêt où migre la forme complète d'ABHD5. FL = « Full length », forme complète de la protéine ABHD5.

DISCUSSION

A. Étude d'ABHD5 en condition pathologique

Nous avons analysé pendant ce travail de thèse 7 patients porteurs d'un SDC. La caractérisation moléculaire de ces malades a permis d'identifier de façon constante une mutation du gène ABHD5. Nous avons retrouvé 4 mutations distinctes dont 2 nouvelles. La première de ces 4 mutations était une insertion, 594insC. La deuxième mutation touchait un site d'épissage (774-1 G>A). Les deux nouvelles comportaient une mutation ponctuelle (776G>A) et une délétion large avec insertion (g. 43726376_43742311del15935+ins46). Ainsi, notre travail permet d'accroître de deux le nombre de mutations distinctes d'ABHD5 responsables du SDC et qui se monte à ce jour à 36 mutations.

594insC : C'est la mutation la plus décrite dans le SDC (Tableau 5). Elle a été rapportée chez 13 patients, majoritairement d'origine Turque. Elle provoque l'apparition d'un codon stop prématuré (p.R199QfsX10).

774-1 G>A : Cette mutation a été décrite chez 4 patients. L'analyse *in silico* des conséquences de cette mutation prédisait la perte du site d'épissage à la jonction intron 5 / exon 6 et l'apparition d'un site cryptique d'épissage 95 nucléotides en aval conduisant à la perte des 95 premiers nucléotides de l'exon 6. Ceci a été confirmé expérimentalement dans un travail antérieur (92). Nous avons montré de nouveau un transcrit majoritaire d'une taille plus petite que celle d'ABHD5 FL chez la malade et son séquençage a montré que les 95 premiers nucléotides de l'exon 6 étaient manquants (Figure 24).



Figure 24. Electrophorèse des RT-PCR d'ABHD5 chez une personne saine et le patient porteur de la mutation 774-1 G>A. Le transcrit FL d'ABHD5 a une taille moléculaire plus petite chez le patient que chez une personne saine. S = Sain, P = Patient et FL = « Full length », forme complète de l'ARNm d'ABHD5.

De plus, cette mutation induisait une baisse de la quantité du transcript muté d'ABHD5 comme nous l'avons observé en RT-qPCR. Cette baisse d'intensité est provoquée par le système NMD ("non-sens mediated mRNA decay").

Cette mutation a été retrouvée dans la littérature chez 3 patients Tunisiens (dont 1 rapporté à nouveau dans notre manuscrit) et nous rapportons une quatrième patiente porteuse de cette même mutation qui est également d'origine Tunisienne. Il est donc probable qu'il existe pour cette mutation un effet fondateur dans cette population.

776G>A : Nous avons identifié une nouvelle mutation dans une famille de Kurdes d'Irak dont trois enfants sur quatre sont atteints. Cette mutation c.776G>A conduisait au remplacement de la glycine 259 par un acide aspartique (p.G259D). Une étude *in silico* permettait de montrer des changements majeurs dans la protéine une fois traduite. En effet, la substitution de la glycine 259 par un acide aspartique remplaçait un a.a. de petite taille apolaire par un a.a. plus gros et acide. Ceci conduisait à des modifications au niveau de la structure secondaire, ainsi que de la structure tridimensionnelle de la protéine, prédites en bioinformatique et présentées dans la figure 25.



Figure 25. Prédictions bioinformatiques de la protéine ABHD5 mutée G259D. **A** : Séquences en a.a. d'ABHD5 normale et mutée de 235 à 275 (région de la mutation) avec en dessous de chacune, les structures secondaires. L'a.a. muté est en rouge. Les structures secondaires modifiées dans ABHD5 mutée sont indiquées par des flèches et en rouge. Respectivement, les structures secondaires concernées pour ABHD5 normale sont en gras. **B** : Structure 3D d'ABHD5 normale et mutée en G259D. Dans un cercle bleu est indiquée la région C-terminale, dans un carré jaune l'a.a. 259. On observe des changements importants dans la structure 3D de la protéine mutée. Le logiciel utilisé pour la prédiction de structure secondaire est SSPro8, disponible sur http://scratch.proteomics.ics.uci.edu/. Pour la structure 3D, le logiciel Discovery Studio 3.5, disponible sur http://accelrys.com/products/collaborative-science/biovia-discovery-studio a été utilisé. H = « Helix » ou hélice alpha, C = « Coil » ou boucle et T = « Turn » ou coude.

Il est important de noter que la glycine 259 est hautement conservée parmi les espèces, depuis l'espèce humaine jusqu'aux plantes et aux bactéries (Figure 26).

Homo sapiens	249	IYH	CNV	QTP	SG	EΤΖ	ASK	NMT	IPY	270
Sus scrofa	249	IYH	CNV	QTP	'SG	ΕTΖ	λF K	NMT	ΙPΥ	270
Mus musculus	251	IYH	CNV	QTP	°SG	ΕTΖ	4FΚ	NMT	IPY	272
Rattus norvegicus	251	IYH	CNV	QTP	°SG	ΕTΖ	λF K	NMT	ΙPΥ	272
Xenopus tropicalis	271	IYH	CNA	QSP	°SG	ΕTΖ	AF R	NMT	VPY	292
Tetraodon nigroviridis	179	IYH	CNA	QAP	°SG	EVO	FR.	AMS	ESL	200
Aedes aegypti	251	IHQ	CNA	QNР	TG	EG	YE.H	TMM	KDF	272
Drosophila melanogaster	221	THO	CNA	QИР	SG	ESA	YE.H	TMM	QSF.	242
Oryza satiya	279	T XH.	L PY	AKA	SG		LK	HIF	SFG	300
<u>A</u> răbidopsis thaliana	293	VYH	L'LA	AKA	SG	БГС	LK	YIE	SFG.	314
Pseudomonas aeruginosa	191	-YS	LINW	K T P	GG		- LR	GGF	EHY	208

Figure 26. Alignement des a.a. d'ABHD5 chez 11 espèces avec ClustalW2. La glycine en position 259 chez l'homme (*Homo sapiens*) est conservée chez le porc (*Sus scrofa*), la souris (*Mus musculus*), le rat (*Rattus norvegicus*), l'amphibien (*Xenopus tropicalis*), le poisson (*Tetraodon nigroviridis*), le moustique (*Aedes aegypti*), la drosophile (*Drosophila melanogaster*), le riz (*Oryza sativa*), une plante (*Arabidopsis thaliana*) et une bactérie (*Pseudomonas aeruginosa*).

Sur le plan fonctionnel, une mutation proche, située sur l'a.a. 260 a des conséquences importantes sur la protéine ABHD5 conduisant à un défaut de localisation et à une perte de sa capacité d'interaction avec ATGL, PLIN2 et PLIN1 (137)(78).

Cette mutation n'est probablement pas limitée à une seule famille car nous l'avons retrouvée chez un autre patient Irakien vivant dans la même région que la famille D, qui avait une érythrodermie ichtyosiforme mais que nous n'avons pas pu examiner (résultat non montré).

g. 43726376_43742311del15935+ins46 : À ce jour, 3 autres délétions larges ont été rapportées, l'une de 1487 pb, une autre de 1058 pb et plus récemment une de 3955 pb (68)(66). Les mécanismes associés aux délétions font intervenir des séquences hautement répétées comme des transposons (séquences Alu) et des rétrotransposons (séquence LINE-1) (161). La première délétion de 1487 pb d'*ABHD5* est expliquée par l'intervention de séquences Alu, la deuxième de 1058 pb par des séquences LINE-1 et la dernière n'est pas expliquée par des séquences répétées (Figure 27).

Délétion de :



Figure 27. Les 3 délétions larges d'ABHD5 décrites à ce jour. Figure 2 de (66) et figure 4 de (68). pb = paire de bases.

Actuellement, la mutation g.43726376_43742311del15935+ins46 que nous avons identifiée est la plus large parmi toutes les délétions décrites dans le SDC. Le mécanisme des délétions génomiques fait souvent intervenir des séquences nucléotidiques hautement répétées dans le génome, qui peuvent être des éléments transposables (séquences Alu) ou rétrotransposables (séquences LINE-1). Nous pensons qu'elle est provoquée par un mécanisme rare de recombinaison non-homologue qui fait appel à des séquences répétées Alu-Sb1 et LINE-1 PA4 (Figure 28).



Figure 28. Présence des séquences Alu et LINE-1 dans la région génomique d'*ABHD5* chez l'homme. Les séquences LINE-1 sont indiquées par des traits rouges, les séquences Alu sont indiquées par des flèches. * = bordure 3' de la délétion (LINE-1PA4), # = bordure 5' de la délétion (Alu-Sb1).

La recombinaison non-homologue se fait entre 2 fragments d'ADN dont les séquences nucléotidiques sont différentes. Dans notre cas, la bordure 3' (Alu-Sb1) de la délétion est différente de la bordure 5' (LINE-1PA4). Ce type de recombinaison utilisant une séquence Alu et LINE-1 a été rapporté à 2 reprises, chez un patient atteint d'une dystrophie de Duchenne (162) et chez un patient atteint de maladie du sirop d'érable (163).

Cette délétion large provoquant une absence totale de l'ARNm et de la protéine ABHD5, nous avons saisi l'opportunité de ce patient pour travailler sur une sorte de « knock-out » d'*ABHD5* chez l'homme. Nous avons donc étudié les effets de cette extinction d'ABHD5 sur la peau du patient et l'avons comparé à d'autres patients atteints de SDC et d'autres maladies dermatologiques avec un trouble de la différenciation (psoriasis, syndrome de Netherton et ichtyose liée à l'X).

Céramides : Nous avons constaté une absence complète de certains céramides à chaîne courte ou très longue (notamment CER NS, NP et AS) dans le SC du patient E et une forte baisse chez les 6 autres patients atteints de SDC. Ces résultats sont en accord avec ceux rapportant une diminution du céramide EOS dans le SC en chromatographie et imagerie en SmM (Figure 29) chez un patient SDC porteur de la mutation p.Iso72Thr (65)(64). En effet, il existait une diminution de l'espèce Acyl-CER EOS et des céramides OS et OH en cas de poussée d'ichtyose dans la peau du patient.



Figure 29. Figure 4A de (65). Imagerie par SmM illustrant une diminution des Acyl-CER chez un patient atteint de SDC (c.215T>C, p.Iso72Thr).

Nous avons constaté une très forte diminution des céramides reconnus par l'anticorps MAB_0011 en immunofluorescence chez les 2 patients atteints de psoriasis et celui porteur d'une ichtyose liée à l'X. Une diminution des CER EOS, NS, NP, AS et AP a déjà été montrée par chromatographie dans les squames de patients porteurs d'un psoriasis (15). De plus, en cas de défaut de synthèse des céramides comme chez les souris déficientes en sérine palmitoyltransférase (enzyme impliquée dans la synthèse des bases sphingoïdes des CER), il existe une inflammation cutanée psoriasiforme (164). Nos résultats observés chez les patients psoriasiques sont en accord avec ces données. Le patient atteint d'un syndrome de Netherton n'a pas montré une diminution de quantité des CER alors que les CER à chaines longues ont été montrés comme diminués chez au moins 2 patients atteints de ce syndrome (22). Cela peut s'expliquer par la différence d'espèces de CER étudiée entre notre résultat et celui des auteurs de la référence 49. De plus, les méthodes utilisées sont différentes, nous utilisons l'immunofluorescence sur coupes de peau tandis qu'ils utilisent la chromatographie échangeuse d'ions.

La diminution des céramides pourrait être associée à une perte d'interaction d'ABHD5 avec des acteurs enzymatiques de la voie de synthèse de céramides. La protéine ABHD5 a été proposée comme intervenant dans la biosynthèse de lipides épidermiques (25)(47).

Nous avons recherché si ABHD5 pouvait influencer l'expression des enzymes impliquées dans la biosynthèse des céramides et avons étudié la TGM1, GBA, ELOVL4 et l'ALOXE3 chez les patients atteints de SDC, de psoriasis, de syndrome de Netherton et d'ichtyose liée à l'X.

TGM1 : Une apparition membranaire prématurée de TGM1 était observée dans l'épiderme hyperplasique des patients DCS. Ce résultat est superposable à un résultat de l'activité enzymatique de cette protéine au niveau épidermique démontrée en 2003 chez un patient SDC (mutation 552A>G, figure 30) (61) mais aussi à ce qui est observé dans l'ichtyose lamellaire avec mutations de *ALOX12B* et *NIPAL4* (42). Cette observation n'est pas spécifique au SDC car le même marquage plus étendu dans l'épiderme a été observé chez les patients atteints de psoriasis (165). Chez ces patients et ceux atteints de syndrome de Netherton, une apparition prématurée de la TGM1 a été observée dans la peau lésée par rapport à la peau saine.



Figure 30. Figure 4 de (61). Panel a : peau d'un patient atteint de SDC (mutation 552A>G). L'activité enzymatique *in situ* de la TGM1 plus étendue dans le SG et SS comparé à la peau saine. Panel b : peau saine.

GBA : Nous avons constaté une discrète diminution de l'expression épidermique de GBA chez deux patients SDC alors qu'elle était normale chez les 5 autres patients atteints de SDC. Le patient atteint d'une ichtyose liée à l'X avait un marquage plus intense que la peau saine tandis que dans la peau issue d'un syndrome de Netherton ou de psoriasis, le marquage était moins intense.

Cette baisse d'expression de GBA a déjà été décrite dans la peau psoriasique (166). En revanche, nous n'avons pas retrouvé un marquage moins diffus de la GBA comme observé précédemment dans le syndrome de Netherton (22).

ELOVL4 : Cette enzyme apparaissait prématurément dans l'épiderme mais avec une intensité comparable à la peau saine chez les patients atteints de SDC et le patient atteint de syndrome de Netherton. Pour le psoriasis et l'ichtyose liée à l'X, le marquage de l'ELOVL4 était plus intense que la peau saine. Le patient atteint de syndrome de Netherton avait un marquage normal mais prématuré de l'ELOVL4 par rapport à la peau saine. L'expression de l'ELOVL4 a été montrée comme diminuée dans un modèle de dermatite atopique chez la souris parallèlement à une baisse des céramides à très longues chaînes (167). Aucune autre donnée concernant l'expression de l'ELOVL4 dans la peau de maladies cutanées humaines n'est rapportée.

ALOXE3 : Le marquage membranaire de cette enzyme était diminué chez 5 patients SDC sur les 7 testés. À contrario, il a été montré que l'expression d'ALOXE3 est augmentée dans l'épiderme de patients avec des ichtyoses associées à des mutations des gènes *TGM1*, *ALOX12B* et *ALOXE3*. Un défaut de localisation de l'ALOXE3 dans le SC a été observée chez les patients qui avaient une mutation de *NIPAL4* (42). L'apparition d'un marquage nucléolaire dans les kératinocytes des patients atteints de psoriasis est surprenante et difficilement interprétable.

Au total, l'interprétation de ces résultats est difficile car peu de données sont disponibles dans la littérature, d'une part en termes d'analyse de ces enzymes dans la peau de patients porteurs d'une ichtyose avec caractérisation génétique et d'autre part en termes d'interactions entre ces différentes enzymes du métabolisme des céramides. Globalement, aucune différence majeure et constante de ces enzymes n'a été observée dans le SDC.

La recherche de nouveaux partenaires en Y2H a été réalisée en utilisant deux banques, l'une issue d'épiderme humain reconstruit (Episkin) et l'autre issue de placenta humain. Plusieurs protéines capables d'interagir avec ABHD5 ont été identifiées: PLIN1, PLIN2, PLIN3, GORASP2 et ATF6. Les interactions d'ABHD5 avec PLIN1 et PLIN2 ont déjà été décrites dans les adipocytes de rat à la surface des vacuoles lipidiques (101)(137).

143

L'interaction ABHD5-PLIN1 a également déjà été rapportée dans les pré-adipocytes humains (111). Cependant, cette interaction détectée dans une banque issue de kératinocytes de peau reconstruite ne doit pas avoir lieu in vivo dans l'épiderme humain car PLIN1 ne semble pas être exprimée dans ce tissu (résultat non montré). Concernant PLIN3, l'interaction ABHD5-PLIN3 a été mise en évidence en 2013 par immunoprécipitation dans le muscle squelettique de rat (110). PLIN3 est une protéine ubiquitaire présente dans le cytosol et sur les vacuoles lipidiques des adipocytes mais aussi dans les corps lamellaires des kératinocytes (168). Cette protéine assure le transport des vésicules endosomales tardives via sa liaison à la protéine Rab9 (169) et une disparition de Rab9 déstabilise PLIN3 dans les cellules HeLa (170). Le complexe PLIN3-Rab9 est aussi impliqué dans le transport du virus de l'hépatite C (145). Il a également été montré que PLIN3 agit en tant qu'adaptateur du transport des protéines Env et Gag du virus HIV-1 pendant sa morphogenèse (171). D'autre part, la présence d'ABHD5 a été observée dans les corps lamellaires qui fusionnent avec la membrane plasmique pour libérer leur contenu à l'interface du SG et du SC (172). En 2016, il a été montré qu'ABHD5 est présente sur les vacuoles lipidiques et dans le trans-Golgi des cellules Lunet N hCD81 et est impliquée dans l'assemblage des particules virales du virus de l'hépatite C et dans leur libération en dehors des cellules (146). Lorsque la protéine ABHD5 est mutée ou absente, nous avons observé une disparition de PLIN3 dans les kératinocytes alors que l'expression de PLIN3 n'est pas modifiée dans un autre type d'ichtyose (ichtyose liée à l'X) en utilisant la technique de PLA (test de proximité protéique). De plus, la présence d'une mutation d'ABHD5 induit une diminution ou une absence de PLIN3 dans les kératinocytes. C'est pourquoi, nous émettons l'hypothèse que le complexe ABHD5-PLIN3 pourrait être impliqué dans le transport des corps lamellaires guidé par Rab9.

Nous pensons que Rab9 pourrait servir de moteur pour le transport vésiculaire du complexe ABHD5-PLIN3. En effet, les protéines Rab appartenant à la famille des GTP-ases sont connues pour leur rôle dans le transport des vésicules (31). De plus, Rab9 est localisée sur les endosome tardifs (173) mais aussi sur le trans-Golgi comme ABHD5. Rab9 a été impliquée dans le transport intracellulaire des lactosylcéramides dans les fibroblastes de patients porteurs d'une maladie de Niemann-Pick type C (174) et la surexpression de Rab9 dans ces cellules est capable de corriger l'anomalie du transport des lactosylcéramides (175).
Récemment, une autre protéine Rab, Rab11a, a été impliquée dans la biogenèse et la mobilisation des corps lamellaires des kératinocytes. Ainsi, il a été montré que l'inhibition de Rab11a induit un défaut de la barrière épidermique (30).

Lorsque la protéine ABHD5 est mutée dans le SDC, les corps lamellaires des kératinocytes ont une forme anormale et sont présents en plus grand nombre (61). Cette anomalie quantitative et qualitative pourrait être expliquée par la déstabilisation de Rab9 dans les kératinocytes. En effet, en cas de mutation de certaines protéines Rab, les organites transportés peuvent être altérés en nombre ou en forme. Ainsi, dans un modèle murin de syndrome d'Hermansky-Pudlak, la souris chocolat, qui est porteuse d'une mutation G19V de Rab38, les mélanosomes présentsdans les cellules de l'épithélium pigmentaire de rétinesont moins nombreux et plus petits (176). Dans un autre modèle animal, les souris ayant une absence complète de la protéine Rab38 ont des corps lamellaires des pneumocytes de type Il ayantune taille plus grande que la normale (177). De la même façon, en cas de mutation de la protéine Rab27A qui est impliquée en association avec la myosine Va et la mélanophiline dans le transport des mélanosomes dans les mélanocytes (syndrome de Griscelli), les mélanosomes ne sont plus localisés dans les dendrites mais s'accumulent en périnucléaire. Enfin, dans le syndrome d'Hermansky-Pudlak humain, il existe une absence de granules denses dans les plaquettes et les mélanosomes des mélanocytes sont anormaux. Certains types de syndrome d'Hermansky-Pudlak sont en rapport avec des mutation des protéines hsp-1 et hsp-4 qui font partie des complexes cytosoliques impliqués dans la genèse des organites provenant des lysosomes (BLOC pour Biogenesis of Lysosome-related Organelles Complex); ces protéines hsp-1 et hsp-4 sont impliquées dans le transport vésiculaire et interagissent directement avec Rab9 (178).

Au total et selon notre hypothèse, le complexe ABHD5-PLIN3-Rab9 serait déstabilisé en cas de mutation de la protéine ABHD5 lors du SDC. Ceci pourrait conduire à une dégradation de la protéine PLIN3 ou à une réduction de sa synthèse et avoir également des conséquences sur la protéine Rab9. Le complexe ABHD5-PLIN3-Rab9 n'assurant plus sa fonction de transport des corps lamellaires, ceux-ci s'accumuleraient dans les kératinocytes de la couche granuleuse (Figure 31). La libération des lipides, en particulier des céramides et des enzymes contenus dans ces vacuolesserait altérée.

145

Cela induirait un trouble de la barrière épidermique qui conduirait à une hyperkératose orthokératosique réactionnelle, c'est-à-dire à l'ichtyose. L'érythrodermie du SDC serait en rapport avec la production de certaines cytokines, en particulier l'interleukine 17 comme cela a été montré en 2016 dans d'autres érythrodermies ichtyosiformes (179).



Figure 31. Schéma illustrant le rôle possible du complexe ABHD5-PLIN3-Rab9 dans le transport des corps lamellaires des kératinocytes. **A** : A l'état normal, le transport des corps lamellaires est assuré par le complexe ABHD5-PLIN3-Rab9. Les lipides et enzymes des corps lamellaires sont libérés dans l'espace intercornéocytaire. **B** : Lorsque la protéine ABHD5 est mutée, PLIN3 est absente des kératinocytes, le transport des corps lamellaires est défectueux, les corps lamellaires s'accumulent et la libération des lipides et enzymes ne se fait pas correctement dans l'espace extracellulaire. SG = *Stratum granulosum*, SC = *Stratum corneum*, SDC = Syndrome de Dorfman-Chanarin.

B. Étude d'ABHD5 en condition physiologique

Nos résultats démontrent l'existence de nouveaux transcrits alternatifs d'ABHD5 chez la souris et chez l'Homme.

Chez la souris, un transcrit alternatif a été décrit en 2010 (103). Sur l'image de RT-PCR de l'article, au moins 4 bandes sont visibles: la FL d'ABHD5 de 1053 pb, le transcrit alternatif décrit de 594 pb (épissage des exons 2 et 3, c'est à dire $\Delta 2$,3) et 2 bandes supplémentaires d'intensité plus faible (Figure 32).



Figure 32. Figure 1A de la référence (103). À 1053 pb, présence de la FL d'ABHD5, à 594 pb de $\Delta 2,3$ et 2 bandes visibles non analysées dans l'article indiquées par les flèches bleues.

Nous avons trouvé le même profil de RT-PCR (Figure 8A) avec la présence 4 bandes qui sont disposées de la même manière. Nous avons analysée la bande supplémentaire de poids moléculaire d'environ 1100 pb et montré qu'elle était en rapport avec un l'épissage alternatif de l'exon 2 (Δ 2). Dans l'article de Yang et al., cette bande est présente mais est difficile à voir car elle se situe juste en dessous de la FL. La migration électrophorétique que nous avons réalisée étant plus longue, la séparation est meilleure permettant de mieux distinguer le transcrit Δ 2 du transcrit FL. Nous n'avons pas caractérisé l'autre bande qui correspond probablement à un autre transcrit alternatif. Ces deux nouveaux transcrits sont ubiquitaires (présence dans 31 tissus et organes de la souris).

Chez l'Homme, nous avons retrouvé plusieurs bandes accessoires de poids moléculaire plus faible que la forme FL d'ABHD5 en RT-PCR dans 5 types de tissus et cellules.

Nous avons identifié 4 transcrits alternatifs ($\Delta 6$, $\Delta 5$, Δ intra6 et $\Delta 5$,6) et avons également pu les amplifier spécifiquement avec des primers adaptés. Certains de ces transcrits alternatifs d'ABHD5 ont déjà été identifiés chez des sujets contrôles dans deux articles mais interprétés comme des erreurs d'amplification ou des aberrations de transcription. Dans le travail de Badeloe et al., ont été identifiés $\Delta 6$ et $\Delta 5$,6 (97) tandis que dans l'article de Redaeli et al., c'est $\Delta 5$ et $\Delta 5$,6 qui ont été caractérisés (68) (Figure 33). Cependant, dans les deux profils de RT-PCR présentés dans ces articles, il existe une bande visible non étudiée qui correspond respectivement dans un cas à $\Delta 5$ et dans l'autre cas à $\Delta 6$. Si ces articles confirment les résultats que nous avons trouvés, nous rapportons en revanche pour la première fois un nouveau transcrit alternatif, Δ intra6. Celui-ci a pu être négligé par les auteurs précédents car il migre à proximité de $\Delta 5$.



Figure 33. Figure 2 de (97) (**A**) et Figure 3A de (68) (**B**). **A** : ligne 1 = poids moléculaires, ligne 2 = patient atteint de DCS et ligne 3 = personne saine. Les bandes indiquées ont été extraites puis séquencées. Elles montrent 2 ARNm alternatifs ($\Delta 6$ et $\Delta 5$,6). **B** : M = poids moléculaires, II-1, II-2, I-1 et I-2 = patients atteints de DCS et C = personne saine. Les bandes ont été extraites et correspondaient à 2 transcrits alternatifs ($\Delta 5$ et $\Delta 5$,6).

Nous avons ensuite souhaité savoir si ces ARNm alternatifs étaient traduits en isoformes protéiques d'ABHD5. Pour cela, nous avons réalisé des western blots avec 2 anticorps monoclonaux reconnaissant deux régions différentes d'ABHD5.

La présence de bandes supplémentaires sous la FL d'ABHD5 a été détectée avec l'anticorps E1 reconnaissant la partie centraled'ABHD5 (et théoriquement les isoformes protéiques d'ABHD5). Ce résultat a été obtenu dans la graisse sous-cutanée et dans l'épiderme. L'autre anticorps 4B12 reconnaissant la partie C-terminale d'ABHD5 (détectant la FL d'ABHD5 et très hypothétiquement 2 isoformes) a détecté principalement la FL d'ABHD5 dans la graisse souscutanée.

Ces résultats d'immunoblot sont compatibles avec une traduction des ARNm alternatifs. Cependant, ils ne permettent pas de l'affirmer. C'est pourquoi, nous avons recherché à valider ces résultats en détectant des peptides prédits des isoformes potentielles. Nous sommes passés par une étude d'électrophorèse 2D et avons objectivé la forme FL d'ABHD5, ainsi que d'autres spots dans la zone des isoformes en immunoblot. De façon intéressante, trois ou quatre isoformes probables d'ABHD5 ont déjà été retrouvées dans le tissu adipeux de souris par immunoblot avec un anticorps polyclonal sur électrophorèse 2D, ce qui converge avec nos résultats concernant l'existence d'isoformes d'ABHD5 (107).

Cependant, lors du passage en spectrométrie de masse, nous n'avons détecté ni la forme FL d'ABHD5, ni aucune des isoformes potentielles. Ceci peut s'expliquer par le fait que plus il y a de protéines différentes lors d'une analyse en spectrométrie de masse, plus il y aura de peptides à analyser. Chaque peptide ayant une capacité à s'ioniser différente, plus ou moins sensible, afin d'être analysable en spectrométrie de masse, une compétition entre les peptides peut s'instaurer entre ceux plus facilement ionisables que d'autres. En plus de cette variété intrinsèque des différents peptides, la protéine ABHD5 est présente en faible quantité dans les tissus biologiques. L'analyse en western blot permet de cibler une seule protéine spécifiquement tandis que la spectrométrie de masse va identifier tous les peptides d'un échantillon. Au total, une faible abondance d'ABHD5, une réponse différente à l'ionisation des peptides pour l'analyse en spectrométrie de masse et une haute spécificité du western blot *versus* la spectrométrie de masse sont des éléments d'explication pour l'absence d'identification d'ABHD5 dans les différentes expériences de spectrométrie de masse.

La détection d'ABHD5 a toujours été difficile et a nécessité le plus souvent des méthodes d'enrichissement ou de stimulation de sa production cellulaire.

150

Ainsi lorsqu'elle a été identifiée pour la première fois en 2004 par Liu et al., les cellules CHO étaient stimulées par de l'acide oléique puis un fractionnement des vacuoles lipidiques était réalisé (180). De la même façon, elle a été identifiée par spectrométrie de masse dans les cellules 3T3-L1 (pré-adipocytes de souris) après stimulation de la lipolyse dans les vacuoles lipidiques isolées (101)(181). Enfin ABHD5 a aussi été identifiée par SmM mais sous forme recombinante (107). Nous avons également adopté une stratégie d'enrichissement en utilisant la coIP avec la fixation de deux anticorps dirigés contre deux régions différentes d'ABHD5, en poolant les éluats et en les concentrant par précipitation. Travaillant sur un tissu humain natif, nous n'avons pas pu réaliser de stimulation cellulaire. Au total, nous ne pouvons pas conclure définitivement sur l'existence de ces isoformes protéiques d'ABHD5.

Concernant les modifications post-traductionnelles d'ABHD5, il a été montré que la protéine ABHD5 recombinante de souris est phosphorylée sur un résidu conservé parmi les vertébrés, la sérine 239 (Figure 34). Cette phosphorylation est réalisée par la protéine kinase A (PKA).



Figure 34. Figure 1 de (107). **A**: alignement des séquences en a.a. de 6 espèces différentes montrant la conservation de la sérine en position 239 chez les vertébrés (encadré en rouge). **B**: migration en électrophorèse SDS-PAGE de la forme phosphorylée d'ABHD5 **C**: électrophorèse bidimensionnelle avec un dépôt d'ABHD5 mis en présence de PKA et d'ATP marqué radioactivement par du 32P et hydrolysé par 6N HCl. La place des standards des P-Ser. P-Ser = Phospho-sérine, P-Thr = Phospho-thréonine et P-Tyr = Phospho-tyrosine est notée.

Nous n'avons pas retrouvé de phosphorylation de la protéine ABHD5 isolée du tissu adipeux humain par immunoprécipitation.

Ceci pourrait être lié à la faible sensibilité des anticorps utilisés. Cependant, il est plus probable qu'ABHD5 soit à l'état basal non phosphorylée. En effet, dans l'article de Sahu-Osen *et al.* (107), le tissu adipeux murin devait être stimulé par un activateur indirect de la protéine kinase A pour que la forme phosphorylée d'ABHD5 soit détectable.

CONCLUSIONS

Dans la première partie de cette thèse, nous avons étudié ABHD5 dans le cadre du syndrome de Dorfman-Chanarin (SDC). Nous avons analysé 7 patients porteurs de cette maladie et avons identifié 4 mutations d'*ABHD5* distinctes. Deux mutations étaient nouvelles, une faux sens (p.Gly259Asp) et une délétion large de 15,9 kb (g.43726376_43742311del15935+ins46) associée à une insertion de 46 pb. Cette dernière qui est la délétion la plus large décrite à ce jourdans ce gène fait intervenir un mécanisme de recombinaison non-homologue rare entre une séquence Alu et une séquence LINE-1. Elle conduit à une absence totale de transcrit et de protéine ABHD5.

Nous avons ensuite montré une absence complète ou une réduction quantitative importante de certains céramides dans l'épiderme des sept patients atteints de SDC. La protéine ABHD5 ayant été proposée comme intervenant directement dans la biosynthèse des céramides, nous avons étudié l'expression de certaines des enzymes impliquées dans cette voie de synthèse. Nous n'avons pas constaté de modifications majeures et constantes de ces enzymes (ELOVL4, GBA, ALOXE3, TGM1). Nous avons ensuite recherché des partenaires d'ABHD5 par technique du double hybride en utilisant des banques d'épiderme reconstruit et de placenta humain et avons identifié PLIN1, -2 et -3. PLIN3 étant un nouveau partenaire d'ABHD5 chez l'Homme, nous avons démontré par un test de lien entre protéines, qu'ABHD5 et PLIN3 étaient physiquement proches dans le SC de l'épiderme. De plus, dans la peau de patients porteurs d'un SDC, l'expression de PLIN3 était réduite. PLIN3 ayant un rôle dans le transport des vésicules intracellulaires, avec notamment l'intervention de la protéine Rab9, nous proposons l'hypothèse que le complexe ABHD5-PLIN3-Rab9 pourrait être impliqué dans le transport normal des corps lamellaires dans les kératinocytes.

Dans la seconde partie de nos travaux, nous avons cherché à analyser ABHD5 en condition physiologique. Nous avons identifié de nouveaux transcrits alternatifs d'*ABHD5*. Chez la souris, nous avons observé un nouveau transcrit correspondant à l'épissage alternatif de l'exon 2 (Δ 2). Chez l'Homme, nous avons caractérisé quatre nouveaux transcrits alternatifs (Δ 6, Δ 5, Δ intra6 et Δ 5,6). L'existence d'une traduction de ces nouveaux transcrits en isoforme protéique a été fortement suggérée par nos résultats de western blot et d'électrophorèse bidimensionnelle dans la graisse sous-cutanée et l'épiderme humains.

Cependant, nous n'avons pas réussi à identifier la protéine ABHD5 ou ses isoformes protéiques potentielles en spectrométrie de masse dans la graisse humaine malgré différents protocoles. Enfin, aucune modification post-traductionnelle d'ABHD5 n'a été mise en évidence.

BIBLIOGRAPHIE

- 1. Pincelli C, Marconi A. Keratinocyte stem cells: Friends and foes. J Cell Physiol. 2010 Nov 1;225(2):310–5.
- 2. Nemes Z, Steinert PM. Bricks and mortar of the epidermal barrier. Exp Mol Med. 1999 Mar 31;31(1):5–19.
- 3. Nishifuji K, Yoon JS. The stratum corneum: the rampart of the mammalian body. Vet Dermatol. 2013 Feb;24(1):60-72-16.
- 4. Wertz PW. Current understanding of skin biology pertinent to skin penetration: skin biochemistry. Skin Pharmacol Physiol. 2013;26(4–6):217–26.
- 5. Menon GK, Cleary GW, Lane ME. The structure and function of the stratum corneum. Int J Pharm. 2012 Oct 1;435(1):3–9.
- 6. Michaels AS, Chandrasekaran SK, Shaw JE. Drug permeation through human skin: Theory and invitro experimental measurement. AIChE J. 1975 Sep 1;21(5):985–96.
- 7. Sahle FF, Gebre-Mariam T, Dobner B, Wohlrab J, Neubert RHH. Skin diseases associated with the depletion of stratum corneum lipids and stratum corneum lipid substitution therapy. Skin Pharmacol Physiol. 2015;28(1):42–55.
- 8. Feingold KR, Elias PM. Role of lipids in the formation and maintenance of the cutaneous permeability barrier. Biochim Biophys Acta. 2014 Mar;1841(3):280–94.
- Elias PM, Williams ML, Choi E-H, Feingold KR. Role of cholesterol sulfate in epidermal structure and function: lessons from X-linked ichthyosis. Biochim Biophys Acta. 2014 Mar;1841(3):353– 61.
- 10. Baroni A, Buommino E, De Gregorio V, Ruocco E, Ruocco V, Wolf R. Structure and function of the epidermis related to barrier properties. Clin Dermatol. 2012 Jun;30(3):257–62.
- 11. Wertz PW, Downing DT. Ceramides of pig epidermis: structure determination. J Lipid Res. 1983 Jun;24(6):759–65.
- 12. Breiden B, Sandhoff K. The role of sphingolipid metabolism in cutaneous permeability barrier formation. Biochim Biophys Acta. 2014 Mar;1841(3):441–52.
- 13. Masukawa Y, Narita H, Shimizu E, Kondo N, Sugai Y, Oba T, et al. Characterization of overall ceramide species in human stratum corneum. J Lipid Res. 2008 Jul;49(7):1466–76.
- 14. t'Kindt R, Jorge L, Dumont E, Couturon P, David F, Sandra P, et al. Profiling and characterizing skin ceramides using reversed-phase liquid chromatography-quadrupole time-of-flight mass spectrometry. Anal Chem. 2012 Jan 3;84(1):403–11.
- 15. Motta S, Monti M, Sesana S, Caputo R, Carelli S, Ghidoni R. Ceramide composition of the psoriatic scale. Biochim Biophys Acta. 1993 Sep 8;1182(2):147–51.
- 16. Ponec M, Weerheim A, Lankhorst P, Wertz P. New acylceramide in native and reconstructed epidermis. J Invest Dermatol. 2003 Apr;120(4):581–8.
- 17. Hill J, Paslin D, Wertz PW. A new covalently bound ceramide from human stratum corneum omega-hydroxyacylphytosphingosine. Int J Cosmet Sci. 2006 Jun;28(3):225–30.

- 18. Farwanah H, Wohlrab J, Neubert RHH, Raith K. Profiling of human stratum corneum ceramides by means of normal phase LC/APCI-MS. Anal Bioanal Chem. 2005 Oct;383(4):632–7.
- 19. Farwanah H, Pierstorff B, Schmelzer CEH, Raith K, Neubert RHH, Kolter T, et al. Separation and mass spectrometric characterization of covalently bound skin ceramides using LC/APCI-MS and Nano-ESI-MS/MS. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci. 2007 Jun 1;852(1–2):562–70.
- 20. Rabionet M, Bayerle A, Marsching C, Jennemann R, Gröne H-J, Yildiz Y, et al. 1-O-acylceramides are natural components of human and mouse epidermis. J Lipid Res. 2013 Dec;54(12):3312–21.
- 21. van Smeden J, Janssens M, Gooris GS, Bouwstra JA. The important role of stratum corneum lipids for the cutaneous barrier function. Biochim Biophys Acta. 2014 Mar;1841(3):295–313.
- 22. van Smeden J, Janssens M, Boiten WA, van Drongelen V, Furio L, Vreeken RJ, et al. Intercellular skin barrier lipid composition and organization in Netherton syndrome patients. J Invest Dermatol. 2014 May;134(5):1238–45.
- 23. Kihara A. Synthesis and degradation pathways, functions, and pathology of ceramides and epidermal acylceramides. Prog Lipid Res. 2016 Apr 20;
- 24. Uchida Y, Holleran WM. Omega-O-acylceramide, a lipid essential for mammalian survival. J Dermatol Sci. 2008 Aug;51(2):77–87.
- 25. Rabionet M, Gorgas K, Sandhoff R. Ceramide synthesis in the epidermis. Biochim Biophys Acta. 2014 Mar;1841(3):422–34.
- 26. Krieg P, Fürstenberger G. The role of lipoxygenases in epidermis. Biochim Biophys Acta. 2014 Mar;1841(3):390–400.
- Elias PM, Gruber R, Crumrine D, Menon G, Williams ML, Wakefield JS, et al. Formation and functions of the corneocyte lipid envelope (CLE). Biochim Biophys Acta. 2014 Mar;1841(3):314– 8.
- 28. Rassner U, Feingold KR, Crumrine DA, Elias PM. Coordinate assembly of lipids and enzyme proteins into epidermal lamellar bodies. Tissue Cell. 1999 Oct;31(5):489–98.
- 29. Wasano K, Hirakawa Y. Lamellar bodies of rat alveolar type 2 cells have late endosomal marker proteins on their limiting membranes. Histochemistry. 1994 Nov;102(5):329–35.
- Reynier M, Allart S, Gaspard E, Moga A, Goudounèche D, Serre G, et al. Rab11a Is Essential for Lamellar Body Biogenesis in the Human Epidermis. J Invest Dermatol. 2016 Jun;136(6):1199– 209.
- 31. Zhen Y, Stenmark H. Cellular functions of Rab GTPases at a glance. J Cell Sci. 2015 Sep 1;128(17):3171–6.
- 32. Wu L, Xu D, Zhou L, Xie B, Yu L, Yang H, et al. Rab8a-AS160-MSS4 regulatory circuit controls lipid droplet fusion and growth. Dev Cell. 2014 Aug 25;30(4):378–93.
- 33. Feingold KR. Lamellar Bodies: The Key to Cutaneous Barrier Function. J Invest Dermatol. 2012 Aug 1;132(8):1951–3.
- 34. Uchida Y, Hara M, Nishio H, Sidransky E, Inoue S, Otsuka F, et al. Epidermal sphingomyelins are precursors for selected stratum corneum ceramides. J Lipid Res. 2000 Dec;41(12):2071–82.

- 35. Elias PM, Wakefield JS. Mechanisms of abnormal lamellar body secretion and the dysfunctional skin barrier in patients with atopic dermatitis. J Allergy Clin Immunol. 2014 Oct;134(4):781–791.e1.
- 36. Haftek M. Epidermal barrier disorders and corneodesmosome defects. Cell Tissue Res. 2015 Jun;360(3):483–90.
- 37. Nemes Z, Marekov LN, Fésüs L, Steinert PM. A novel function for transglutaminase 1: attachment of long-chain omega-hydroxyceramides to involucrin by ester bond formation. Proc Natl Acad Sci USA. 1999 Jul 20;96(15):8402–7.
- 38. Elias PM, Schmuth M, Uchida Y, Rice RH, Behne M, Crumrine D, et al. Basis for the permeability barrier abnormality in lamellar ichthyosis. Exp Dermatol. 2002 Jun;11(3):248–56.
- 39. Takeichi T, Akiyama M. Inherited ichthyosis: Non-syndromic forms. J Dermatol. 2016 Mar;43(3):242–51.
- 40. Zuo Y, Zhuang DZ, Han R, Isaac G, Tobin JJ, McKee M, et al. ABCA12 maintains the epidermal lipid permeability barrier by facilitating formation of ceramide linoleic esters. J Biol Chem. 2008 Dec 26;283(52):36624–35.
- 41. Mitsutake S, Suzuki C, Akiyama M, Tsuji K, Yanagi T, Shimizu H, et al. ABCA12 dysfunction causes a disorder in glucosylceramide accumulation during keratinocyte differentiation. J Dermatol Sci. 2010 Nov;60(2):128–9.
- 42. Li H, Loriè EP, Fischer J, Vahlquist A, Törmä H. The expression of epidermal lipoxygenases and transglutaminase-1 is perturbed by NIPAL4 mutations: indications of a common metabolic pathway essential for skin barrier homeostasis. J Invest Dermatol. 2012 Oct;132(10):2368–75.
- 43. Melnik B, Küster W, Hollmann J, Plewig G, Traupe H. Autosomal dominant lamellar ichthyosis exhibits an abnormal scale lipid pattern. Clin Genet. 1989 Feb;35(2):152–6.
- 44. Paige DG, Morse-Fisher N, Harper JI. Quantification of stratum corneum ceramides and lipid envelope ceramides in the hereditary ichthyoses. Br J Dermatol. 1994 Jul;131(1):23–7.
- 45. Lavrijsen AP, Bouwstra JA, Gooris GS, Weerheim A, Boddé HE, Ponec M. Reduced skin barrier function parallels abnormal stratum corneum lipid organization in patients with lamellar ichthyosis. J Invest Dermatol. 1995 Oct;105(4):619–24.
- 46. Epp N, Fürstenberger G, Müller K, de Juanes S, Leitges M, Hausser I, et al. 12R-lipoxygenase deficiency disrupts epidermal barrier function. J Cell Biol. 2007 Apr 9;177(1):173–82.
- 47. Krieg P, Rosenberger S, de Juanes S, Latzko S, Hou J, Dick A, et al. Aloxe3 knockout mice reveal a function of epidermal lipoxygenase-3 as hepoxilin synthase and its pivotal role in barrier formation. J Invest Dermatol. 2013 Jan;133(1):172–80.
- 48. Yoneda K. Inherited ichthyosis: Syndromic forms. J Dermatol. 2016 Mar;43(3):252–63.
- 49. Fartasch M, Williams ML, Elias PM. Altered lamellar body secretion and stratum corneum membrane structure in netherton syndrome: Differentiation from other infantile erythrodermas and pathogenic implications. Arch Dermatol. 1999 Jul;135(7):823–32.
- 50. Nakajima K, Sano S, Uchida Y, Akiyama M, Morita Y, Shimizu H. Altered lipid profiles in the stratum corneum of Sjögren-Larsson syndrome. J Dermatol Sci. 2011 Jul;63(1):64–6.

- 51. Bosen F, Celli A, Crumrine D, vom Dorp K, Ebel P, Jastrow H, et al. Altered epidermal lipid processing and calcium distribution in the KID syndrome mouse model Cx26S17F. FEBS Lett. 2015 Jul 8;589(15):1904–10.
- 52. Weeda G, Eveno E, Donker I, Vermeulen W, Chevallier-Lagente O, Taïeb A, et al. A mutation in the XPB/ERCC3 DNA repair transcription gene, associated with trichothiodystrophy. Am J Hum Genet. 1997 Feb;60(2):320–9.
- 53. Hadj-Rabia S, Baala L, Vabres P, Hamel-Teillac D, Jacquemin E, Fabre M, et al. Claudin-1 gene mutations in neonatal sclerosing cholangitis associated with ichthyosis: a tight junction disease. Gastroenterology. 2004 Nov;127(5):1386–90.
- 54. Feldmeyer L, Huber M, Fellmann F, Beckmann J s., Frenk E, Hohl D. Confirmation of the origin of NISCH syndrome. Hum Mutat. 2006 May 1;27(5):408–10.
- 55. Baala L, Hadj-Rabia S, Hamel-Teillac D, Hadchouel M, Prost C, Leal SM, et al. Homozygosity Mapping of a Locus for a Novel Syndromic Ichthyosis to Chromosome 3q27–q28. J Invest Dermatol. 2002 Jul 1;119(1):70–6.
- Chan A, Holleran WM, Ferguson T, Crumrine D, Goker-Alpan O, Schiffmann R, et al. Skin ultrastructural findings in type 2 Gaucher disease: diagnostic implications. Mol Genet Metab. 2011 Dec;104(4):631–6.
- 57. Bourassa CV, Raskin S, Serafini S, Teive HAG, Dion PA, Rouleau GA. A New ELOVL4 Mutation in a Case of Spinocerebellar Ataxia With Erythrokeratodermia. JAMA Neurol. 2015 Aug;72(8):942–3.
- 58. Cadieux-Dion M, Turcotte-Gauthier M, Noreau A, Martin C, Meloche C, Gravel M, et al. Expanding the clinical phenotype associated with ELOVL4 mutation: study of a large French-Canadian family with autosomal dominant spinocerebellar ataxia and erythrokeratodermia. JAMA Neurol. 2014 Apr;71(4):470–5.
- 59. Mir H, Raza SI, Touseef M, Memon MM, Khan MN, Jaffar S, et al. A novel recessive mutation in the gene ELOVL4 causes a neuro-ichthyotic disorder with variable expressivity. BMC Med Genet. 2014;15:25.
- 60. Fischer J, Lefèvre C, Morava E, Mussini J-M, Laforêt P, Negre-Salvayre A, et al. The gene encoding adipose triglyceride lipase (PNPLA2) is mutated in neutral lipid storage disease with myopathy. Nat. Genet. 2007 Jan;28–30.
- 61. Akiyama M, Sawamura D, Nomura Y, Sugawara M, Shimizu H. Truncation of CGI-58 Protein Causes Malformation of Lamellar Granules Resulting in Ichthyosis in Dorfman-Chanarin Syndrome. J Invest Dermatol. 2003;1029–34.
- 62. Demerjian M, Crumrine DA, Milstone LM, Williams ML, Elias PM. Barrier dysfunction and pathogenesis of neutral lipid storage disease with ichthyosis (Chanarin-Dorfman syndrome). J Invest Dermatol. 2006 Sep;126(9):2032–8.
- 63. Elias PM, Williams ML. Neutral lipid storage disease with ichthyosis: Defective lamellar body contents and intracellular dispersion. Arch Dermatol. 1985 août;121(8):1000–8.
- 64. Uchida Y, Cho Y, Moradian S, Kim J, Nakajima K, Crumrine D, et al. Neutral Lipid Storage Leads to Acylceramide Deficiency, Likely Contributing to the Pathogenesis of Dorfman-Chanarin Syndrome. J Invest Dermatol. 2010;2497–9.

- 65. Goto-Inoue N, Hayasaka T, Zaima N, Nakajima K, Holleran WM, Sano S, et al. Imaging mass spectrometry visualizes ceramides and the pathogenesis of dorfman-chanarin syndrome due to ceramide metabolic abnormality in the skin. PLoS ONE. 2012;7(11):e49519.
- 66. Missaglia S, Valadares ER, Moro L, Faguntes EDT, Quintão Roque R, Giardina B, et al. Early onset of Chanarin-Dorfman syndrome with severe liver involvement in a patient with a complex rearrangement of ABHD5 promoter. BMC Med Genet. 2014;15:32.
- 67. Lefèvre C, Jobard F, Caux F, Bouadjar B, Karaduman A, Heilig R, et al. Mutations in CGI-58, the gene encoding a new protein of the esterase/lipase/thioesterase subfamily, in Chanarin-Dorfman syndrome. Am J Hum Genet. 2001 Nov;1002–12.
- 68. Redaelli C, Coleman RA, Moro L, Dacou-Voutetakis C, Elsayed SM, Prati D, et al. Clinical and genetic characterization of chanarin-dorfman syndrome patients: first report of large deletions in the ABHD5 gene. Orphanet J Rare Dis. 2010;33.
- 69. Cakir M, Bruno C, Cansu A, Cobanoglu U, Erduran E. Liver cirrhosis in an infant with Chanarin– Dorfman syndrome caused by a novel splice-site mutation in ABHD5. Acta Paediatr. 2010;1592– 1594.
- 70. Ronchetti A, Prati D, Pezzotta MG, Tavian D, Colombo R, Callea F, et al. Severe steatohepatitis in a patient with a rare neutral lipid storage disorder due to ABHD5 mutation. J Hepatol. 2008 Sep;49(3):474–7.
- Huigen MCDG, van der Graaf M, Morava E, Dassel ACM, van Steensel MAM, Seyger MMB, et al. Cerebral lipid accumulation in Chanarin-Dorfman Syndrome. Mol Genet Metab. 2015 Jan;114(1):51–4.
- 72. Bruno C, Bertini E, Di Rocco M, Cassandrini D, Ruffa G, De Toni T, et al. Clinical and genetic characterization of Chanarin-Dorfman syndrome. Biochem Biophys Res Commun. 2008 May 16;369(4):1125–8.
- 73. Molecular analysis of Chanarin-Dorfman syndrome (CDS) patients: Identification of novel mutations in the ABHD5 gene. European Journal of Medical Genetics; 2010.
- 74. Ujihara M, Nakajima K, Yamamoto M, Teraishi M, Uchida Y, Akiyama M, et al. Epidermal triglyceride levels are correlated with severity of ichthyosis in Dorfman–Chanarin syndrome. J Dermatol Sci. 2010 février;102–7.
- 75. Schleinitz N, Fischer J, Sanchez A, Veit V, Harle JR, Pelissier JF. Two New Mutations of the ABHD5 Gene in a New Adult Case of Chanarin Dorfman Syndrome: An Uncommon Lipid Storage Disease. Archives of dermatology. 2005 Jun;141(6):798–800.
- 76. Gupta N, Gothwal S, Satpathy AK, Missaglia S, Tavian D, Das P, et al. Chanarin Dorfman syndrome: a case report with novel nonsense mutation. Gene. 2016 Jan 10;575(2 Pt 1):359–62.
- Ben Selma Z, Yilmaz S, Schischmanoff PO, Blom A, Ozogul C, Laroche L, et al. A novel S115G mutation of CGI-58 in a Turkish patient with Dorfman-Chanarin syndrome. J Invest Dermatol. 2007 Sep;127(9):2273–6.
- 78. Lass A, Zimmermann R, Haemmerle G, Riederer M, Schoiswohl G, Schweiger M, et al. Adipose triglyceride lipase-mediated lipolysis of cellular fat stores is activated by CGI-58 and defective in Chanarin-Dorfman Syndrome. Cell Metab. 2006 may;309–19.

- 79. Ünlüsoy-Aksu A, Sarı S, Eğritaş-Gürkan Ö, Dalgıç B. Chanarin-Dorfman syndrome: a novel mutation in a Turkish girl. The Turkish Journal of Pediatrics. 2015 Jun;57(3):300–3.
- 80. Srinivasaraghavan R, Krishnamurthy S, Chandar R, Cassandrini D, Mahadevan S, Bruno C, et al. Acitretin-responsive ichthyosis in Chanarin-Dorfman syndrome with a novel mutation in the ABHD5/CGI-58 gene. Pediatr Dermatol. 2014 Oct;31(5):612–4.
- 81. Gaeta M, Minutoli F, Toscano A, Celona A, Musumeci O, Racchiusa S, et al. Opposed-phase MR imaging of lipid storage myopathy in a case of Chanarin-Dorfman disease. Skeletal Radiol. 2008 Nov;37(11):1053–7.
- 82. Samuelov L, Fuchs-Telem D, Sarig O, Sprecher E. An exceptional mutational event leading to Chanarin-Dorfman syndrome in a large consanguineous family. Br J Dermatol. 2011 Jun;1390–2.
- Takeda K, Tanaka K, Kumamoto T, Morioka D, Endo I, Togo S, et al. Living Donor Liver Transplantation for Dorfman-Chanarin Syndrome With 1 Year Follow-up: Case Report. Transplant Proc. 2010 Nov;3858–61.
- Cakmak E, Alagozlu H, Yonem O, Ataseven H, Citli S, Ozer H. Steatohepatitis and liver cirrhosis in Chanarin-Dorfman syndrome with a new ABDH5 mutation. Clin Red Hepatol Gastroenterol. 2012 Apr;e34-37.
- 85. Gomez-Moyano E, Godoy-Diaz DJ, Ponce-Verdugo L, Sanz-Trelles A, Vera-Casaño A, Sierra-Salinas C. Chanarin-Dorfman syndrome in three siblings in a non-consanguineous family. J Eur Acad Dermatol Venereol. 2016 Jan;30(1):157–9.
- Arslansoyu Çamlar S, Gençpınar P, Makay B, Yüzbaşıoğlu A, Arslan N, Emre Dökmeci S, et al. Chanarin-dorfman syndrome with multi-system involvement in two siblings. Turk J Haematol. 2013 Mar;30(1):72–5.
- 87. Nur BG, Gencpinar P, Yuzbasioglu A, Emre SD, Mihci E. Chanarin-Dorfman syndrome: Genotype-Phenotype Correlation. Eur J Med Genet. 2015 Apr;58(4):238–42.
- Pujol R m., Gilaberte M, Toll A, Florensa L, Lloreta J, González-Enseñat M a., et al. Erythrokeratoderma variabilis-like ichthyosis in Chanarin–Dorfman syndrome. Br J Dermatol. 2005;838–841.
- 89. Pike GN, Jones S, Coassin S, Kronenberg F, Will A. Jordan's anomaly in a case of Chanarin-Dorfman syndrome. Br J Haematol. 2011 Nov;412.
- Takeichi T, Sugiura K, Tso S, Simpson MA, McGrath JA, Akiyama M. Bi-allelic nonsense mutations inABHD5 underlie a mild phenotype of Dorfman-Chanarin syndrome. J Dermatol Sci. 2016 Feb;81(2):134–6.
- 91. Srinivasan R, Hadžić N, Fischer J, Knisely A. Steatohepatitis and unsuspected micronodular cirrhosis in Dorfman-Chanarin syndrome with documented ABHD5 mutation. J Pediatr. 2004 may;662–5.
- 92. N. Bouzaiene, P.-O. Schischmanoff, Z. Ben Selma, A. Blom, L. Laroche, F. Caux. Nonsensemediated mRNA decay is involved in the degradation of CGI-58 transcript in patients with Dorfman-Chanarin syndrome and 773-1G>A mutation. J Invest Dermatol. 2009.

- 93. Sugiura K, Suga Y, Akiyama M. Dorfman-Chanarin syndrome without mental retardation caused by a homozygous ABHD5 splice site mutation that skips exon 6. J Dermatol Sci. 2014 Sep;75(3):199–201.
- 94. Tamhankar PM, Iyer S, Sanghavi S, Khopkar U. Chanarin-Dorfman syndrome: clinical report and novel mutation in ABHD5 gene. J Postgrad Med. 2014 Sep;60(3):332–4.
- 95. Elitzur S, Yacobovich J, Dgany O, Krasnov T, Rosenbach Y, Tamary H. From Blood Smear to Lipid Disorder: A Case Report. J Pediatr Hematol Oncol. 2012 Oct 4.
- 96. Israeli S, Pessach Y, Sarig O, Goldberg I, Sprecher E. Beneficial effect of acitretin in Chanarin– Dorfman syndrome. Clin Exp Dermatol. 2012.
- 97. Badeloe S, Van Geel M, Nagtzaam I, Rubio-Gozalbo M e., Oei R I., Steijlen P m., et al. Chanarin– Dorfman syndrome caused by a novel splice site mutation in ABHD5. British Journal of Dermatology. 2008;158(6):1378–1380.
- 98. Shagun Aggarwal, Jaswinder Singh Maras, Seema Alam, Rajeev Khanna, Sanjeev Kumar Gupta, Arvind Ahuja. Novel nonsense mutation of ABHD5 in Dorfman Chanarin syndrome with unusual findings: A challenge for genotype phenotype correlation. Eur J Med Genet. 2012 Feb 6;173–7.
- Lai C-H., Chou CY., Ch'ang LY, Liu C.-S., Lin W. Identification of Novel Human Genes Evolutionarily Conserved in Caenorhabditis elegans by Comparative Proteomics. Genome Res. 2000 May 1;703–13.
- 100. Bickel PE, Tansey JT, Welte MA. PAT proteins, an ancient family of lipid droplet proteins that regulate cellular lipid stores. Biochim Biophys Acta. 2009 Jun;419–40.
- 101. Subramanian V, Rothenberg A, Gomez C, Cohen AW, Garcia A, Bhattacharyya S, et al. Perilipin A Mediates the Reversible Binding of CGI-58 to Lipid Droplets in 3T3-L1 Adipocytes. J Biol Chem. 2004 Oct 1;42062–71.
- 102. Park S, Gidda SK, James CN, Horn PJ, Khuu N, Seay DC, et al. The α/β hydrolase CGI-58 and peroxisomal transport protein PXA1 coregulate lipid homeostasis and signaling in Arabidopsis. Plant Cell. 2013 May;25(5):1726–39.
- 103. Yang X, Lu X, Liu J. Identification of a novel splicing isoform of murine CGI-58. FEBS Lett. 2010 Mar 5;584(5):903–10.
- Li X, Suh Y, Kim E, Moeller SJ, Lee K. Alternative splicing and developmental and hormonal regulation of porcine comparative gene identification-58 (CGI-58) mRNA. J Anim Sci. 2012 Dec;90(12):4346–54.
- 105. Schweiger M, Lass A, Zimmermann R, Eichmann TO, Zechner R. Neutral lipid storage disease: genetic disorders caused by mutations in adipose triglyceride lipase/PNPLA2 or CGI-58/ABHD5. Am J Physiol Endocrinol Metab. 2009 Apr 28;E289–96.
- 106. Ghosh AK, Ramakrishnan G, Chandramohan C, Rajasekharan R. CGI-58, the causative gene for Chanarin-Dorfman syndrome, mediates acylation of lysophosphatidic acid. J Biol Chem. 2008 Sep 5;24525–33.

- Sahu-Osen A, Montero-Moran G, Schittmayer M, Fritz K, Dinh A, Chang Y-F, et al. CGI-58/ABHD5 is phosphorylated on Ser239 by protein kinase A: control of subcellular localization. J Lipid Res. 2015 Jan;56(1):109–21.
- 108. Cornaciu I, Boeszoermenyi A, Lindermuth H, Nagy HM, Cerk IK, Ebner C, et al. The Minimal Domain of Adipose Triglyceride Lipase (ATGL) Ranges until Leucine 254 and Can Be Activated and Inhibited by CGI-58 and GOS2, Respectively. PLoS One. 2011 Oct 19;e26349.
- 109. Radner FPW, Streith IE, Schoiswohl G, Schweiger M, Kumari M, Eichmann TO, et al. Growth retardation, impaired triacylglycerol catabolism, hepatic steatosis, and lethal skin barrier defect in mice lacking comparative gene identification-58 (CGI-58). J Biol Chem. 2010 Mar 5;285(10):7300–11.
- 110. MacPherson REK, Ramos SV, Vandenboom R, Roy BD, Peters SJ. Skeletal muscle PLIN proteins, ATGL and CGI-58, interactions at rest and following stimulated contraction. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol. 2013 Apr 15;304(8):R644-650.
- 111. Gandotra S, Lim K, Girousse A, Saudek V, O'Rahilly S, Savage DB. Human Frame Shift Mutations Affecting the Carboxyl Terminus of Perilipin Increase Lipolysis by Failing to Sequester the Adipose Triglyceride Lipase (ATGL) Coactivator AB-hydrolase-containing 5 (ABHD5). J Biol Chem. 2011 Jul 12;34998–5006.
- 112. Montero-Moran G, Caviglia JM, McMahon D, Rothenberg A, Subramanian V, Xu Z, et al. CGI-58/ABHD5 is a coenzyme A-dependent lysophosphatidic acid acyltransferase. J Lipid Res. 2009 Oct 2;709–19.
- 113. McMahon D, Dinh A, Kurz D, Shah D, Han G-S, Carman GM, et al. Comparative gene identification 58/α/β hydrolase domain 5 lacks lysophosphatidic acid acyltransferase activity. J Lipid Res. 2014 May 30;55(8):1750–61.
- 114. Zhang J, Xu D, Nie J, Han R, Zhai Y, Shi Y. Comparative gene identification-58 (CGI-58) promotes autophagy as a putative lysophosphatidylglycerol acyltransferase. J Biol Chem. 2014 Nov 21;289(47):33044–53.
- Brown JM, Chung S, Das A, Shelness GS, Rudel LL, Yu L. CGI-58 Facilitates the Mobilization of Cytoplasmic Triglyceride for Lipoprotein Secretion in Hepatoma Cells. J Lipid Res. 2007 Oct 1;2295–305.
- 116. Caviglia JM, Sparks JD, Toraskar N, Brinker AM, Yin TC, Dixon JL, et al. ABHD5/CGI-58 facilitates the assembly and secretion of apolipoprotein B lipoproteins by McA RH7777 rat hepatoma cells. Bioch Biophys Acta. 2009 Mar;1791(3):198–205.
- 117. Zimmermann R, Strauss JG, Haemmerle G, Schoiswohl G, Birner-Gruenberger R, Riederer M, et al. Fat mobilization in adipose tissue is promoted by adipose triglyceride lipase. Science. 2004 Nov 19;306(5700):1383–6.
- 118. Villena JA, Roy S, Sarkadi-Nagy E, Kim K-H, Sul HS. Desnutrin, an adipocyte gene encoding a novel patatin domain-containing protein, is induced by fasting and glucocorticoids: ectopic expression of desnutrin increases triglyceride hydrolysis. J Biol Chem. 2004 Nov 5;279(45):47066–75.
- 119. Jenkins CM, Mancuso DJ, Yan W, Sims HF, Gibson B, Gross RW. Identification, cloning, expression, and purification of three novel human calcium-independent phospholipase A2

family members possessing triacylglycerol lipase and acylglycerol transacylase activities. J Biol Chem. 2004 Nov 19;279(47):48968–75.

- 120. Yamaguchi T. Crucial role of CGI-58/alpha/beta hydrolase domain-containing protein 5 in lipid metabolism. Biol Pharm Bull. 2010;33(3):342–5.
- 121. Zimmermann R, Lass A, Haemmerle G, Zechner R. Fate of fat: the role of adipose triglyceride lipase in lipolysis. Biochim Biophys Acta. 2009 Jun;494–500.
- 122. Listenberger LL, Ostermeyer-Fay AG, Goldberg EB, Brown WJ, Brown DA. Adipocyte differentiation-related protein reduces the lipid droplet association of adipose triglyceride lipase and slows triacylglycerol turnover. J Lipid Res. 2007 Dec 1;48(12):2751–61.
- 123. Warner A, Mittag J. Breaking BAT: can browning create a better white? J Endocrinol. 2016 Jan;228(1):R19-29.
- 124. Morigny P, Houssier M, Mouisel E, Langin D. Adipocyte lipolysis and insulin resistance. Biochimie. 2015 Nov 2;
- 125. Eichmann TO, Kumari M, Haas JT, Farese RV Jr, Zimmermann R, Lass A, et al. Studies on the Substrate and Stereo/Regioselectivity of Adipose Triglyceride Lipase, Hormone-sensitive Lipase, and Diacylglycerol-O-acyltransferases. J Biol Chem. 2012 Nov 30;287(49):41446–57.
- 126. Yang X, Lu X, Lombès M, Rha GB, Chi Y-I, Guerin TM, et al. The G0/G1 Switch Gene 2 Regulates Adipose Lipolysis through Association with Adipose Triglyceride Lipase. Cell Metabolism. 2010 Mar 3;11(3):194–205.
- 127. Schweiger M, Schoiswohl G, Lass A, Radner FPW, Haemmerle G, Malli R, et al. The C-terminal Region of Human Adipose Triglyceride Lipase Affects Enzyme Activity and Lipid Droplet Binding. J Biol Chem. 2008 Jun 20;283(25):17211–20.
- 128. Gruber A, Cornaciu I, Lass A, Schweiger M, Poeschl M, Eder C, et al. The N-terminal Region of Comparative Gene Identification-58 (CGI-58) Is Important for Lipid Droplet Binding and Activation of Adipose Triglyceride Lipase. J Biol Chem. 2010 Feb 17;12289–98.
- 129. Laurens C, Badin P-M, Louche K, Mairal A, Tavernier G, Marette A, et al. G0/G1 Switch Gene 2 controls adipose triglyceride lipase activity and lipid metabolism in skeletal muscle. Mol Metab. 2016 Apr 22;5(7):527–37.
- 130. Turnbull PC, Ramos SV, MacPherson REK, Roy BD, Peters SJ. Characterization of Lipolytic Inhibitor G(0)/G(1) Switch Gene-2 Protein (G0S2) Expression in Male Sprague-Dawley Rat Skeletal Muscle Compared to Relative Content of Adipose Triglyceride Lipase (ATGL) and Comparitive Gene Identification-58 (CGI-58). PLoS One. 2015 Mar 26;10(3).
- 131. Lu X, Yang X, Liu J. Differential control of ATGL-mediated lipid droplet degradation by CGI-58 and GOS2. Cell Cycle. 2010 Jul 15;2719–25.
- 132. Sztalryd C, Kimmel AR. Perilipins: Lipid Droplet Coat Proteins Adapted for Tissue-Specific Energy Storage and Utilization, and Lipid Cytoprotection. Biochimie. 2014 Jan;96:96–101.
- 133. Guo Y, Cordes KR, Farese RV, Walther TC. Lipid droplets at a glance. J Cell Sci. 2009 Mar 15;122(6):749–52.

- 134. Walther TC, Farese RV. Lipid Droplets And Cellular Lipid Metabolism. Annu Rev Biochem. 2012;81:687–714.
- 135. Granneman JG, Moore H-PH, Krishnamoorthy R, Rathod M. Perilipin Controls Lipolysis by Regulating the Interactions of AB-Hydrolase Containing 5 (Abhd5) and Adipose Triglyceride Lipase (Atgl). J Biol Chem. 2009 Dec 11;34538–44.
- 136. Khor VK, Shen W-J, Kraemer FB. Lipid droplet metabolism. Curr Opin Clin Nutr Metab Care. 2013 Nov;16(6):632–7.
- 137. Yamaguchi T, Omatsu N, Matsushita S, Osumi T. CGI-58 Interacts with Perilipin and Is Localized to Lipid Droplets Possible involvement of CGI-58 mislocalization in Chanarin-Dorfman syndrome. J Biol Chem. 2004 Jul 16;30490–7.
- 138. Ruggles KV, Turkish A, Sturley SL. Making, baking, and breaking: the synthesis, storage, and hydrolysis of neutral lipids. Annu Rev Nutr. 2013;33:413–51.
- 139. Bickel PE, Tansey JT, Welte MA. PAT proteins, an ancient family of lipid droplet proteins that regulate cellular lipid stores. Biochim Biophys Acta. 2009 Jun;1791(6):419–40.
- 140. Yamaguchi T, Omatsu N, Omukae A, Osumi T. Analysis of interaction partners for perilipin and ADRP on lipid droplets. Mol Cell Biochem. 2006 Mar;167–73.
- 141. Díaz E, Pfeffer SR. TIP47: a cargo selection device for mannose 6-phosphate receptor trafficking. Cell. 1998 May 1;93(3):433–43.
- 142. Liu M, Qi L, Zeng Y, Yang Y, Bi Y, Shi X, et al. Transient Scrotal Hyperthermia Induces Lipid Droplet Accumulation and Reveals a Different ADFP Expression Pattern between the Testes and Liver in Mice. PLoS One. 2012 Oct 4;7(10).
- 143. Wolins NE, Rubin B, Brasaemle DL. TIP47 Associates with Lipid Droplets. J Biol Chem. 2001 Feb 16;276(7):5101–8.
- 144. Skinner JR, Shew TM, Schwartz DM, Tzekov A, Lepus CM, Abumrad NA, et al. Diacylglycerol Enrichment of Endoplasmic Reticulum or Lipid Droplets Recruits Perilipin 3/TIP47 during Lipid Storage and Mobilization. J Biol Chem. 2009 Nov 6;284(45):30941–8.
- 145. Ploen D, Hafirassou ML, Himmelsbach K, Schille SA, Biniossek ML, Baumert TF, et al. TIP47 is associated with the hepatitis C virus and its interaction with Rab9 is required for release of viral particles. Eur J Cell Biol. 2013 Dec;92(12):374–82.
- 146. Vieyres G, Welsch K, Gerold G, Gentzsch J, Kahl S, Vondran FWR, et al. ABHD5/CGI-58, the Chanarin-Dorfman Syndrome Protein, Mobilises Lipid Stores for Hepatitis C Virus Production. PLoS Pathog. 2016 Apr;12(4):e1005568.
- 147. Granneman JG, Moore H-PH, Mottillo EP, Zhu Z. Functional Interactions between Mldp (LSDP5) and Abhd5 in the Control of Intracellular Lipid Accumulation. J Biol Chem. 2008 Dec 2;3049–57.
- 148. Granneman JG, Moore H-PH, Mottillo EP, Zhu Z, Zhou L. Interactions of Perilipin-5 (Plin5) with Adipose Triglyceride Lipase. J Biol Chem. 2011 Feb 18;286(7):5126–35.
- 149. Wang H, Bell M, Sreenevasan U, Hu H, Liu J, Dalen K, et al. Unique Regulation of Adipose Triglyceride Lipase (ATGL) by Perilipin 5, a Lipid Droplet-associated Protein. J Biol Chem. 2011 May 6;286(18):15707–15.

- 150. Zechner R, Zimmermann R, Eichmann TO, Kohlwein SD, Haemmerle G, Lass A, et al. FAT SIGNALS--lipases and lipolysis in lipid metabolism and signaling. Cell Metab. 2012 Mar 7;15(3):279–91.
- 151. Hotamisligil GS, Bernlohr DA. Metabolic functions of FABPs--mechanisms and therapeutic implications. Nat Rev Endocrinol. 2015 Oct;11(10):592–605.
- 152. Smathers RL, Petersen DR. The human fatty acid-binding protein family: evolutionary divergences and functions. Hum Genomics. 2011 Mar;5(3):170–91.
- 153. Hofer P, Boeszoermenyi A, Jaeger D, Feiler U, Arthanari H, Mayer N, et al. Fatty Acid-binding Proteins Interact with Comparative Gene Identification-58 Linking Lipolysis with Lipid Ligand Shuttling. J Biol Chem. 2015 Jul 24;290(30):18438–53.
- 154. Lin Y-Y, Chou C-F, Giovarelli M, Briata P, Gherzi R, Chen C-Y. KSRP and MicroRNA 145 are negative regulators of lipolysis in white adipose tissue. Mol Cell Biol. 2014 Jun;34(12):2339–49.
- 155. Das SK, Stadelmeyer E, Schauer S, Schwarz A, Strohmaier H, Claudel T, et al. Micro RNA-124a regulates lipolysis via adipose triglyceride lipase and comparative gene identification 58. Int J Mol Sci. 2015;16(4):8555–68.
- 156. Ghosh AK, Chauhan N, Rajakumari S, Daum G, Rajasekharan R. At4g24160, a soluble acylcoenzyme A-dependent lysophosphatidic acid acyltransferase. Plant Physiol. 2009 Oct;151(2):869–81.
- 157. James CN, Horn PJ, Case CR, Gidda SK, Zhang D, Mullen RT, et al. Disruption of the Arabidopsis CGI-58 homologue produces Chanarin-Dorfman-like lipid droplet accumulation in plants. Proc Natl Acad Sci USA. 2010 Oct 12;107(41):17833–8.
- 158. Hooks MA, Turner JE, Murphy EC, Johnston KA, Burr S, Jarosławski S. The Arabidopsis ALDP protein homologue COMATOSE is instrumental in peroxisomal acetate metabolism. Biochem J. 2007 Sep 15;406(3):399–406.
- 159. Park S, Keereetaweep J, James CN, Gidda SK, Chapman KD, Mullen RT, et al. CGI-58, a key regulator of lipid homeostasis and signaling in plants, also regulates polyamine metabolism. Plant Signal Behav. 2014 Feb 3;9.
- 160. Miao H, Ou J, Peng Y, Zhang X, Chen Y, Hao L, et al. Macrophage ABHD5 promotes colorectal cancer growth by suppressing spermidine production by SRM. Nat Commun. 2016 May 18;7.
- 161. Cooper DN, Bacolla A, Férec C, Vasquez KM, Kehrer-Sawatzki H, Chen J-M. On the sequencedirected nature of human gene mutation: the role of genomic architecture and the local DNA sequence environment in mediating gene mutations underlying human inherited disease. Hum Mutat. 2011 Oct;32(10):1075–99.
- 162. Suminaga R, Takeshima Y, Yasuda K, Shiga N, Nakamura H, Matsuo M. Non-homologous recombination between Alu and LINE-1 repeats caused a 430-kb deletion in the dystrophin gene: a novel source of genomic instability. J Hum Genet. 2000;45(6):331–6.
- 163. Chi C-S, Tsai C-R, Chen L-H, Lee H-F, Mak BS-C, Yang S-H, et al. Maple syrup urine disease in the Austronesian aboriginal tribe Paiwan of Taiwan: a novel DBT (E2) gene 4.7 kb founder deletion caused by a nonhomologous recombination between LINE-1 and Alu and the carrier-frequency determination. Eur J Hum Genet. 2003 Dec;11(12):931–6.

- 164. Nakajima K, Terao M, Takaishi M, Kataoka S, Goto-Inoue N, Setou M, et al. Barrier abnormality due to ceramide deficiency leads to psoriasiform inflammation in a mouse model. J Invest Dermatol. 2013 Nov;133(11):2555–65.
- 165. Schroeder WT, Thacher SM, Stewart-Galetka S, Annarella M, Chema D, Siciliano MJ, et al. Type I keratinocyte transglutaminase: expression in human skin and psoriasis. J Invest Dermatol. 1992 Jul;99(1):27–34.
- 166. Alessandrini F, Pfister S, Kremmer E, Gerber J-K, Ring J, Behrendt H. Alterations of glucosylceramide-beta-glucosidase levels in the skin of patients with psoriasis vulgaris. J Invest Dermatol. 2004 Dec;123(6):1030–6.
- 167. Park Y-H, Jang W-H, Seo JA, Park M, Lee TR, Park Y-H, et al. Decrease of ceramides with very long-chain fatty acids and downregulation of elongases in a murine atopic dermatitis model. J Invest Dermatol. 2012 Feb;132(2):476–9.
- 168. Raymond A-A, Gonzalez de Peredo A, Stella A, Ishida-Yamamoto A, Bouyssie D, Serre G, et al. Lamellar bodies of human epidermis: proteomics characterization by high throughput mass spectrometry and possible involvement of CLIP-170 in their trafficking/secretion. Mol Cell Proteomics. 2008 Nov;7(11):2151–75.
- 169. Carroll KS, Hanna J, Simon I, Krise J, Barbero P, Pfeffer SR. Role of Rab9 GTPase in facilitating receptor recruitment by TIP47. Science. 2001 May 18;292(5520):1373–6.
- 170. Ganley IG, Carroll K, Bittova L, Pfeffer S. Rab9 GTPase regulates late endosome size and requires effector interaction for its stability. Mol Biol Cell. 2004 Dec;15(12):5420–30.
- Bauby H, Lopez-Vergès S, Hoeffel G, Delcroix-Genête D, Janvier K, Mammano F, et al. TIP47 is required for the production of infectious HIV-1 particles from primary macrophages. Traffic. 2010 Apr;11(4):455–67.
- 172. Akiyama M, Sakai K, Takayama C, Yanagi T, Yamanaka Y, McMillan JR, et al. CGI-58 Is an α/β-Hydrolase within Lipid Transporting Lamellar Granules of Differentiated Keratinocytes. Am J Pathol. 2008 Nov;1349–60.
- 173. Kucera A, Borg Distefano M, Berg-Larsen A, Skjeldal F, Repnik U, Bakke O, et al. Spatiotemporal Resolution of Rab9 and CI-MPR Dynamics in the Endocytic Pathway. Traffic. 2016 Mar;17(3):211–29.
- 174. Choudhury A, Dominguez M, Puri V, Sharma DK, Narita K, Wheatley CL, et al. Rab proteins mediate Golgi transport of caveola-internalized glycosphingolipids and correct lipid trafficking in Niemann-Pick C cells. J Clin Invest. 2002 Jun;109(12):1541–50.
- 175. Narita K, Choudhury A, Dobrenis K, Sharma DK, Holicky EL, Marks DL, et al. Protein transduction of Rab9 in Niemann-Pick C cells reduces cholesterol storage. FASEB J. 2005 Sep;19(11):1558–60.
- 176. Brooks BP, Larson DM, Chan C-C, Kjellstrom S, Smith RS, Crawford MA, et al. Analysis of ocular hypopigmentation in Rab38cht/cht mice. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2007 Sep;48(9):3905–13.
- 177. Zhang L, Yu K, Robert KW, DeBolt KM, Hong N, Tao J-Q, et al. Rab38 targets to lamellar bodies and normalizes their sizes in lung alveolar type II epithelial cells. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol. 2011 Oct;301(4):L461-477.

- 178. Kloer DP, Rojas R, Ivan V, Moriyama K, van Vlijmen T, Murthy N, et al. Assembly of the biogenesis of lysosome-related organelles complex-3 (BLOC-3) and its interaction with Rab9. J Biol Chem. 2010 Mar 5;285(10):7794–804.
- 179. Paller AS, Suarez-Farinas M, Renert-Yuval Y, Oliva M, Huynh T, Esaki H, et al. 395 Disease severity and cutaneous inflammation in ichthyosis are linked to Th17 pathway activation. J Invest Dermatol. 2016 May 1;136(5):S70.
- Liu P, Ying Y, Zhao Y, Mundy DI, Zhu M, Anderson RGW. Chinese hamster ovary K2 cell lipid droplets appear to be metabolic organelles involved in membrane traffic. J Biol Chem. 2004 Jan 30;279(5):3787–92.
- 181. Brasaemle DL, Dolios G, Shapiro L, Wang R. Proteomic analysis of proteins associated with lipid droplets of basal and lipolytically stimulated 3T3-L1 adipocytes. J Biol Chem. 2004 Nov 5;279(45):46835–42.

TABLEAUX SUPPLÉMENTAIRES

Zone	Protéines identifiées
50-37 kDa	Actin cytoplasmic 1
50-37 kDa	Actin cytoplasmic 2
50-37 kDa	Vimentin
50-37 kDa	ATP synthase sub-unit Beta (mitochondrial)
50-37 kDa	Actin (aortic smooth muscle)
50-37 kDa	Actin (alpha cardiac muscle 1)
50-37 kDa	Actin (gamma enteric-smooth muscle)
50-37 kDa	Actin (alpha skeletal muscle)
50-37 kDa	Alpha-1 antitrypsin

37-25 kDa	Prohibitin
37-25 kDa	F-actin-capping protein
37-25 kDa	Cathepsin D
37-25 kDa	Proteasome activator complex subunit 1
37-25 kDa	Platelet-activating factor acetylhydrolase
37-25 kDa	Aortic smooth muscle actin
37-25 kDa	Carbonic anhydrase 1
37-25 kDa	Serum albumin
37-25 kDa	Etyhyl malnoyl-CoA decarboxylase
37-25 kDa	Egl nine homolog 2
37-25 kDa	Annexin 1
37-25 kDa	Collagen alpha 1 (VI) chain
37-25 kDa	Beta nerve growth factor
37-25 kDa	Carbonic anhydrase 2
37-25 kDa	Glyceraldehyde 3 phosphate dehydrogenase
37-25 kDa	Voltage dependent anion selective channelprotein 2
37-25 kDa	Complement C4-A
37-25 kDa	Monoglyceride lipase
37-25 kDa	Keratin type 1 cytoskeletal
37-25 kDa	3 mercapto-pyruvate sulfurtransferase
37-25 kDa	Annexin 2
37-25 kDa	Malate dehydrogenase
37-25 kDa	Glycerol 3 phosphate dehydrogenase
37-25 kDa	L-lactate dehydrogenase A chain

Numéro bande	Protéines identifiées
1	Keratin, type II cytoskeletal 1
1	Keratin, type II cytoskeletal 2 epidermal
1	Keratin, type I cytoskeletal 10
1	lg gamma-3 chain C region
1	Keratin, type I cytoskeletal 9
1	keratin 1
1	cytokeratin 9
1	Chain B, Crystal Structure Of The Trimeric Prefusion Ebola Virus Glycoprotein

2	Keratin, type II cytoskeletal 1
2	Ig kappa chain V-IV region
2	lg gamma-1 chain C region
2	Ig kappa chain C region
2	Hemoglobin subunit beta
2	Keratin, type II cytoskeletal 2 epidermal
2	Keratin, type II cytoskeletal 1b
2	Ig mu chain C region
2	lg gamma-4 chain C region
2	lg gamma-3 chain C region
2	Keratin, type I cuticular Ha6
2	immunoglobulin kappa 4 light chain
2	immunoglobulin heavy chain variable region, partial
2	immunoglobulin light chain variable region
2	anti-HIV-1 gp120 immunoglobulin heavy chain
2	Ig kappa chain NIG26 precursor
2	immunoglobulin light chain
2	Chain L, Lebrikizumab Fab Bound To II-13
2	immunoglobulin light chain
2	Chain L, Crystal Structure Of A Recombinant Ige Fab Fragment
2	immunoglobulin variable region
2	Chain L, Crystal Structure Of A4b7
2	Chain L, Crystal Structure Of A Chimeric Fab'
2	Chain L, Crystal Structure Of Igf-li Antibody Complex
2	epidermal cytokeratin 2
2	immunoglobulin heavy chain variable region
2	immunoglobulin G heavy chain variable region
2	immunoglobulin A heavy chain variable region
2	immunoglobulin heavy chain constant region gamma 4

Numéro bande	Protéines identifiées
1	Actin, cytoplasmic 1 et 2
1	aging-associated gene 9 protein
1	Chain C, Solution Structure Of Human Immunoglobulin M
1	cyclophilin, partial
1	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
1	Histone H1.3
1	lg G1 H Nie
1	lg gamma 2 H chain
1	lg gamma-1 chain C region
1	lg gamma-2 chain C region
1	lg gamma-3 chain C region
1	lg gamma-4 chain C region
1	Ig kappa chain V-III region
1	immunoglobulin heavy chain constant region
1	Immunoglobulin lambda-like polypeptide 5
1	Leucine-rich repeat and fibronectin type III domain-containing protein 1
1	MAX gene-associated protein
1	T cell receptor alpha chain V-J-region, partial

2	Actin, cytoplasmic 1 et 2
2	Beta-actin-like protein 2
2	Chain C, Solution Structure Of Human Immunoglobulin M
2	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
2	Histone H1.2
2	Histone H1.3
2	Histone H1.4
2	lg G1 H Nie
2	lg gamma 2 H chain
2	lg gamma-1 chain C region
2	lg gamma-2 chain C region
2	lg gamma-3 chain C region
2	lg gamma-4 chain C region
2	Ig kappa chain C region
2	immunoglobulin heavy chain constant region
2	Immunoglobulin lambda-like polypeptide 5
2	PTB-containing, cubilin and LRP1-interacting protein

Protéines identifiées
60S ribosomal protein L22
Actin, cytoplasmic
Beta-actin-like protein 2
Cell division cycle 5-like protein
Cytoplasmic dynein 1 heavy chain 1
Dapper homolog 1
F-actin-capping protein subunit beta
Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
Hemoglobin subunit beta
Histone H1.2
Histone H1.3
Histone H1.4
Histone H1.5
Histone H4
Ig gamma-1 chain C region
Ig gamma-2 chain C region
lg gamma-3 chain C region
lg gamma-4 chain C region
Ig kappa chain C region
Ig kappa chain V-I region
Ig kappa chain V-II region
Ig kappa chain V-III region

Ig lambda chain V region
Ig lambda chain V-I region
Ig lambda chain V-III region
Ig lambda-2 chain C region
Immunoglobulin lambda-like polypeptide 5
Integrin alpha-9
Interleukin-27 subunit beta
IsoleucinetRNA ligase, cytoplasmic
Leucine-rich repeat and fibronectin type III domain-containing protein 1
MAX gene-associated protein
Myosin light chain 6B
Myosin light polypeptide 6
Myosin regulatory light chain 12A
Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase B
Protocadherin alpha-C1
PTB-containing, cubilin and LRP1-interacting protein
Serum albumin
Structure-specific endonuclease subunit SLX4
Tropomyosin alpha chaine
Tropomyosin beta chaine
Tubulin polymerization-promoting protein family member 2
Ubiquitin-like modifier-activating enzyme 5
Zinc finger and BTB domain-containing protein 10

ÉTUDE BIOCHIMIQUE D'ABHD5DANS LE SYNDROME DE DORFMAN-CHANARIN ET EN CONDITION PHYSIOLOGIQUE

ABHD5 est mutée dans le syndrome de Dorfman-Chanarin (SDC), maladie de surcharge comportant une ichtyose liée à une acanthose et une hyperkératose orthokératosique, ainsi que des vacuoles lipidiques intrakératinocytaires et des corps lamellaires anormaux. Les mécanismes de l'ichtyose sont mal compris. Certaines ichtyoses étant associées à une anomalie des céramides, nous les avons analysés chez 7 patients. Nous avons identifié 4 mutations différentes, dont 2 nouvelles, 1 faux sens et 1 délétion large de 15,9kb. Chez tous les patients, certains céramides épidermiques étaient très diminués mais l'expression des enzymes impliquées dans leur synthèse était peu modifiée. ABHD5 pouvant intervenir indirectement sur ces céramides, nous avons recherché des partenaires d'ABHD5 et identifié les périlipines 1, 2 et 3 (PLIN3). PLIN3 est un nouveau partenaire d'ABHD5, impliquée dans le transport des endosomes via Rab9. La proximité entre ABHD5 et PLIN3 a été démontrée par PLA (test de proximité protéique) dans l'épiderme humain et PLIN3 était peu exprimée dans l'épiderme du SDC. Ces données suggèrent que l'ichtyose du SDC ferait intervenir un défaut dans le trafic des corps lamellaires. Nous avons identifié de nouveaux transcrits alternatifs d'ABHD5, 1 chez la souris (absence d'exon 2) et 4 chez l'Homme (absence des exons 6, 5, début de l'exon 6, 5 et 6). En western blot, la forme complète d'ABHD5 a été retrouvée, ainsi que des bandes accessoires dans des extraits d'épiderme et d'hypoderme humains. Certaines de ces bandes avaient un poids moléculaire compatible avec celui prédit pour les isoformes protéiques. Mais, ni ces isoformes, ni la forme complète d'ABHD5 n'ont été identifiées par spectrométrie de masse.

ABHD5 BIOCHEMICAL STUDY IN THE DORFMAN-CHANARIN SYNDROME AND IN PHYSIOLOGICAL CONDITION

ABHD5 is a lipase activator whose mutations induce triacylglycerol accumulation called Dorfman–Chanarin syndrome (DCS). DCS is characterized by ichthyosiform erythroderma resulting from acanthosis and orthokeratotic hyperkeratosis. Ultrastructural findings include lipid droplets in basal and granular layers and abnormal lamellar bodies. The ichthyosis pathomechanism is unclear. Because some ichthyoses are associated with defective ceramide syntheses, we examined ceramides in 7 DCS patients. ABHD5 genetic analysis identified 4 different mutations, including 2 original, 1 missense and 1 large deletion. Epidermal ceramides were very low in all DCS patients but expression of ceramide genesisrelated enzymes was minimally changed. Because ABHD5 might act indirectly on ceramides, we tried to identify ABHD5 partners. Three interactors were detected: perilipin-1, -2 and -3 (PLIN3); the latter is a new partner and involved in endosome transport through Rab9. PLA (protein proximity assay) demonstrated PLIN3's physical closeness to ABHD5 in epidermis and PLIN3 was weakly expressed in DCS epidermis. These findings suggest that DCSichthyosis is linked to a trafficking defect of lamellar granules. Then we identified new ABHD5 alternative transcripts, 1 in mice (absence of exon 2) and 4 in human (absence of exon 6, 5, beginning of 6, 5 and 6). The full length ABHD5 and accessory bands were shown by western blot using human epidermis and fat extracts. The molecular weight of some of these bands was compatible with the predicted molecular weight of the isoforms encoded by these alternative transcripts. However, we were unable to identify these isoforms, nor the full length ABHD5 by mass spectrometry.